

## **TEMA 2.-**

Variabilidad genética: Mutación, tipos de mutación. Detección de variación. Diversidad genética en el hombre e identificación molecular de individuos. Reparación. Enfermedades relacionadas con los sistemas de reparación.

El genoma humano no es una entidad estática y sufre cambios hereditarios, es decir mutaciones.

### Categorías de mutaciones:

- **Somáticas:**

Originadas por diferentes causas:

- agentes mutagénicos (físicos o químicos)
- espontáneas (tautomería de bases)
- durante el proceso de replicación del ADN:
  - 1 célula =  $2 \times 6,4 \cdot 10^9$  nucleótidos.
  - Nº de divisiones a lo largo de la vida =  $10^{17}$ .
  - Nº total de nucleótidos incorporados =  $1,28 \times 10^{27}$ .

Tasa de error de la ADN pol =  $10^{-4}$ , con proofreading  $10^{-7}$ , con mecanismos de reparación  $10^{-10}$ .

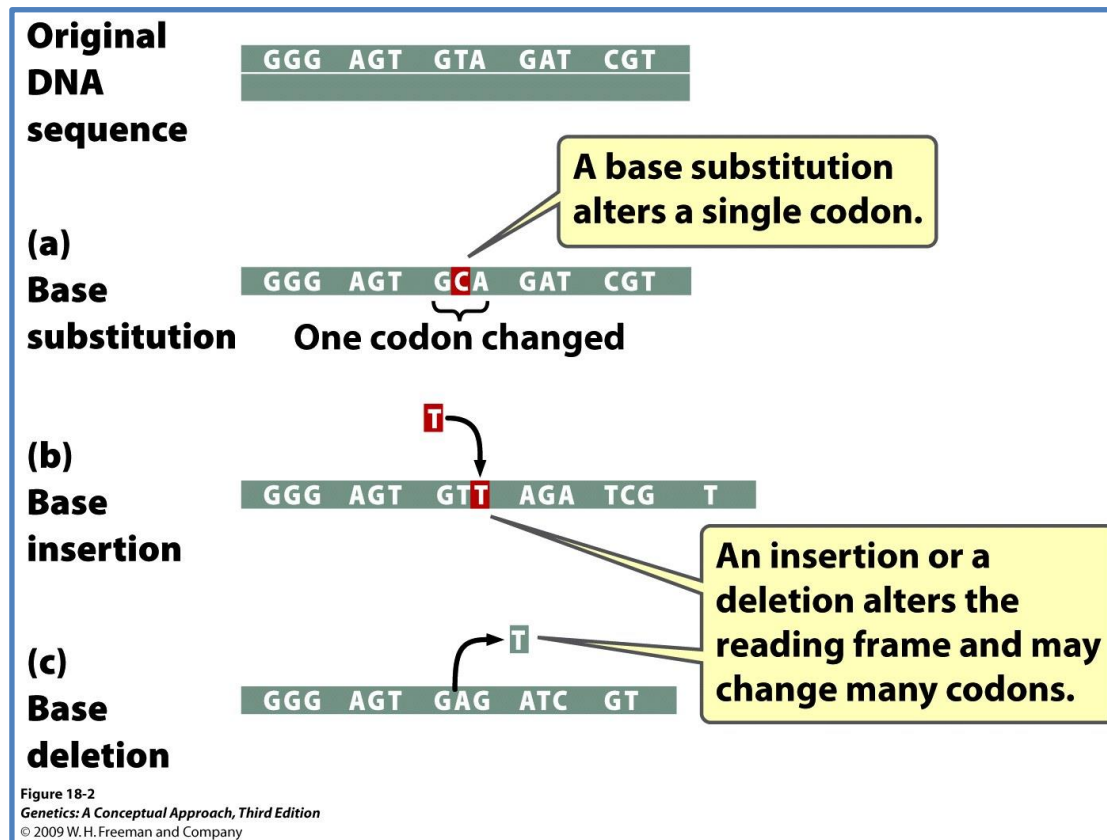
**Conclusión:** La totalidad de las células somáticas contienen alguna mutación.

- **Germinal:** afectan a los gametos y pueden transmitirse a las siguientes generaciones y dar lugar a individuos portadores de las mutaciones en todas sus células somáticas. Su origen es el mismo que el caso de las células somáticas, pero hay que incluir la recombinación durante la meiosis.

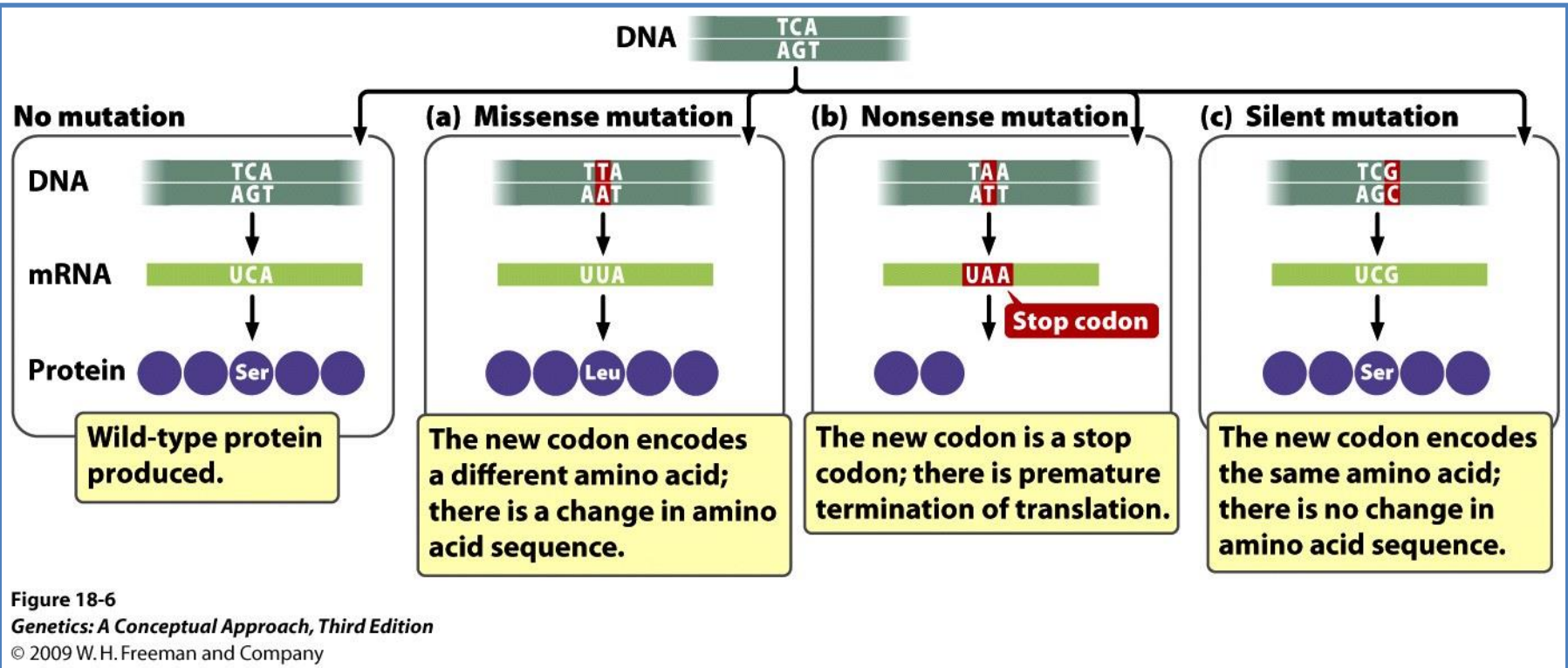
Las mutaciones pueden ser:

- de gran escala: p. ej. pérdida o ganancia de cromosomas, roturas cromosómicas, translocaciones, etc.
- pequeña escala: afectando a uno o pocos nucleótidos.

Las consecuencias funcionales de las mutaciones pueden variar desde no tener ningún efecto a causar una enfermedad grave.



## Consecuencias de mutaciones de tipo puntual en la región codificante de un gen



- La secuencia de ADN de una región concreta del genoma es muy similar en los cromosomas de muchas personas.
- Por término medio un segmento de 1000 pb tiene un par de base diferentes entre los dos cromosomas homólogos que heredamos cada uno de nosotros de nuestros progenitores (si no están emparentados).
- En las poblaciones humanas se han identificado millones de diferencias de un solo nucleótido y más de un millón de variantes de mayor tamaño. A medida que se disponga de más datos podrán detectarse un mayor número de diferencias.
- Alelo natural o común y Alelo variante o mutante

### Polimorfismo genético

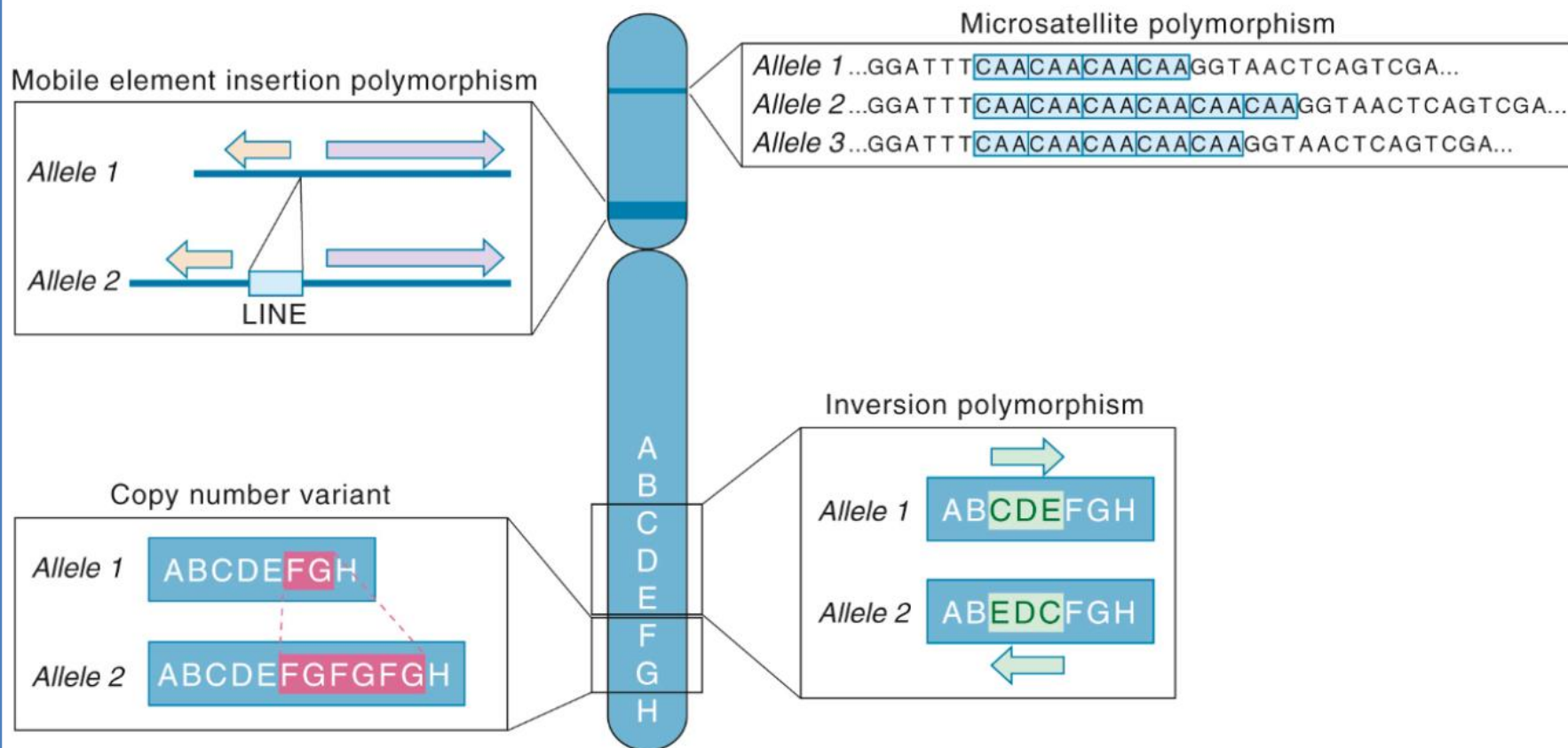
Cuando hay dos o más alelos relativamente frecuentes (por convención: con una frecuencia  $>1\%$ ) en un locus en una población, se dice que el locus presenta polimorfismo en esa población.

**TABLE 4-2 Common Variation in the Human Genome**

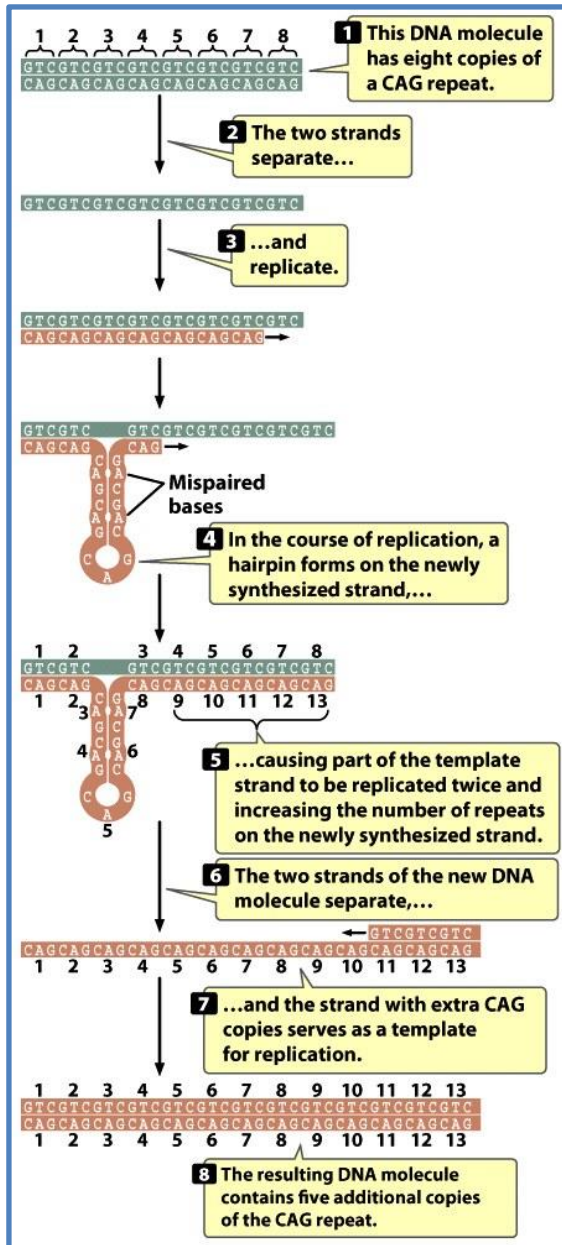
| Type of Variation               | Size Range (approx.) | Basis for the Polymorphism  | Number of Alleles   |
|---------------------------------|----------------------|---|---|
| Single nucleotide polymorphisms | 1 bp                 | Substitution of one or another base pair at a particular location in the genome   | Usually 2   |
| Insertion/deletions (indels)    | 1 bp to > 100 bp     | <i>Simple:</i> Presence or absence of a short segment of DNA 100-1000 bp in length<br><i>Microsatellites:</i> Generally, a 2-, 3-, or 4-nucleotide unit repeated in tandem 5-25 times | <i>Simple:</i> 2<br><i>Microsatellites:</i> typically 5 or more |
| Copy number variants            | 10 kb to > 1 Mb      | Typically the presence or absence of 200-bp to 1.5-Mb segments of DNA, although tandem duplication of 2, 3, 4, or more copies can also occur  | 2 or more   |
| Inversions                      | Few bp to > 1 Mb     | A DNA segment present in either of two orientations with respect to the surrounding DNA   | 2   |

bp, Base pair; kb, kilobase pair; Mb, megabase pair.

# Ejemplos de polimorfismo en el genoma mayores que los SNP



# Mutaciones por expansión de trinucleótidos



Algunas enfermedades humanas se originan como consecuencia de expansiones de triplete

**Table 18.1 Examples of genetic diseases caused by expanding trinucleotide repeats**

| Disease   | Repeated Sequence | Number of Copies of Repeat |               |
|---|-------------------|----------------------------|---------------|
|   |                   | Normal Range               | Disease Range |
| Spinal and bulbar muscular atrophy                  | CAG               | 11–33                      | 40–62         |
| Fragile-X syndrome                                  | CGG               | 6–54                       | 50–1500       |
| Jacobsen syndrome                                   | CGG               | 11                         | 100–1000      |
| Spinocerebellar ataxia (several types)              | CAG               | 4–44                       | 21–130        |
| Autosomal dominant cerebellar ataxia                | CAG               | 7–19                       | 37–220        |
| Myotonic dystrophy                                  | CTG               | 5–37                       | 44–3000       |
| Huntington disease                                  | CAG               | 9–37                       | 37–121        |
| Friedreich ataxia                                   | GAA               | 6–29                       | 200–900       |
| Dentatorubral-pallidoluysian atrophy                | CAG               | 7–25                       | 49–75         |
| Myoclonus epilepsy of the Unverricht-Lundborg type* | CCCGCCCCGCG       | 2–3                        | 12–13         |

\*Technically not a trinucleotide repeat but does entail a multiple of three nucleotides that expands and contracts in similar fashion to trinucleotide repeats.

Table 18-1  
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition  
© 2009 W.H. Freeman and Company



## Variation Detected in a Typical Human Genome

Individuals vary greatly in a wide range of biological functions, determined in part by variation among their genomes. Any individual genome will contain the following:

- ≈5-10 million SNPs (varies by population)
- 25,000-50,000 rare variants (private mutations or seen previously in < 0.5% of individuals tested)
- ≈75 new base pair mutations not detected in parental genomes
- 3-7 new CNVs involving ≈500 kb of DNA
- 200,000-500,000 indels (1-50 bp) (varies by population)
- 500-1000 deletions 1-45 kb, overlapping ≈200 genes
- ≈150 in-frame indels
- ≈200-250 shifts in reading frame
- 10,000-12,000 synonymous SNPs
- 8,000-11,000 nonsynonymous SNPs in 4,000-5,000 genes
- 175-500 rare nonsynonymous variants
- 1 new nonsynonymous mutation
- ≈100 premature stop codons
- 40-50 splice site-disrupting variants
- 250-300 genes with likely loss-of-function variants
- ≈25 genes predicted to be completely inactivated

## Utilidad de la variabilidad del ADN

Las variantes alélicas se pueden utilizar como marcadores para seguir la herencia de un fragmento del genoma en familias y en poblaciones.

- Para identificar la localización de un gen en una región de un cromosoma mediante análisis de ligamiento.
- En el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas.
- En aplicaciones forenses, como las pruebas de paternidad o la identificación de sospechosos a partir de restos biológicos.
- En la medicina personalizada basada en la genómica para determinar si hay más o menos riesgo de desarrollar ciertas enfermedades al ser portador de ciertas variantes; para determinar la seguridad y eficacia de ciertos medicamentos; la tolerancia de alimentos etc.

## Detección de variación a nivel molecular

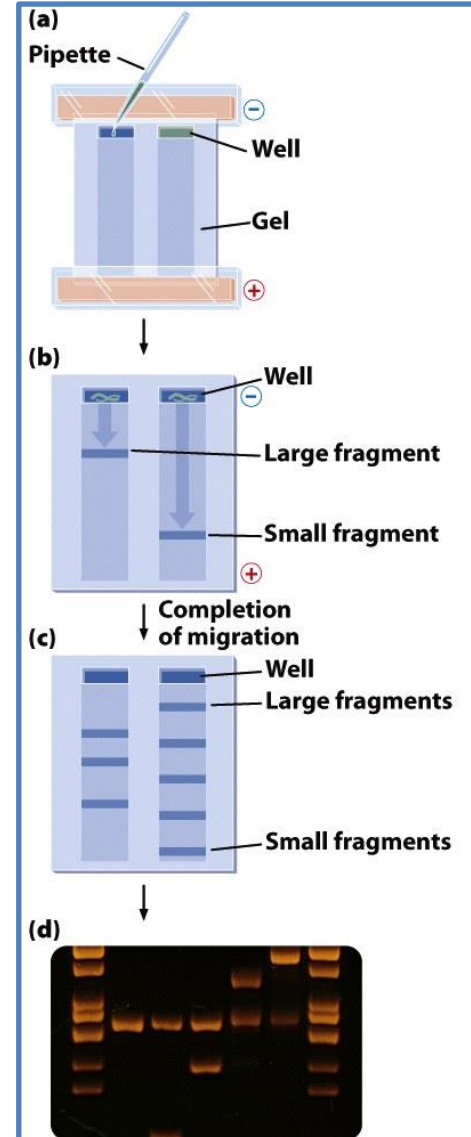
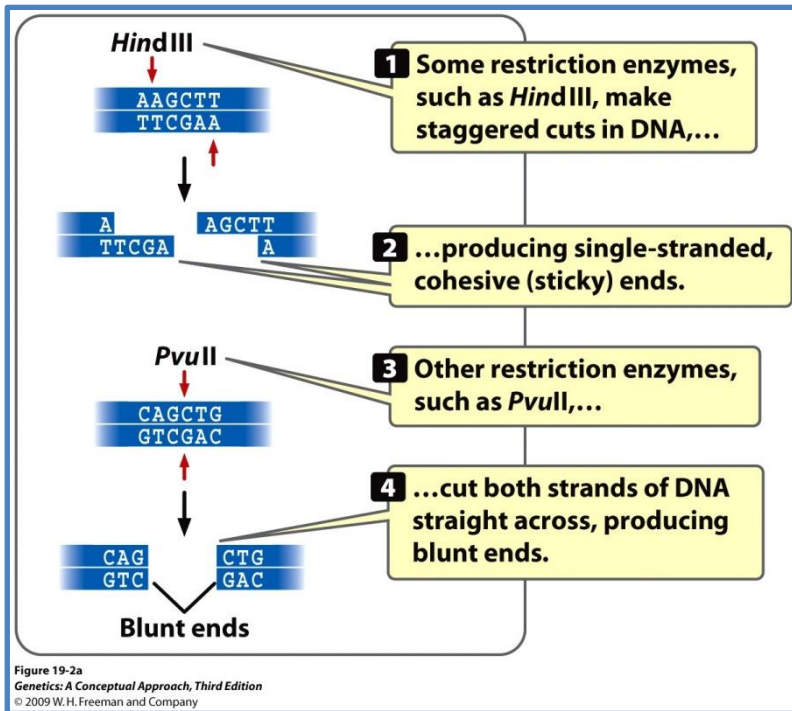
La variabilidad entre las distintas personas se debe a la variación genética + la variación producida por el ambiente.

La variación se puede observar a distintos niveles: morfológico, comportamiento, bioquímico.....a nivel de secuencia del ADN

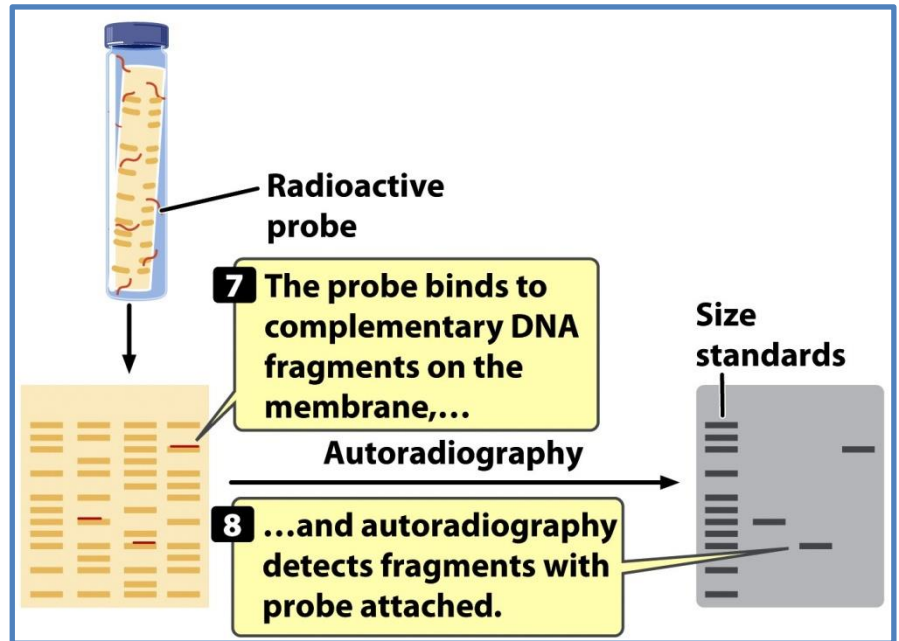
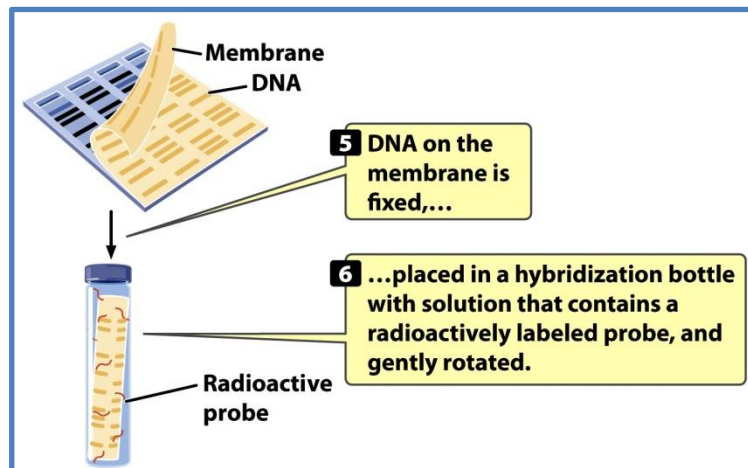
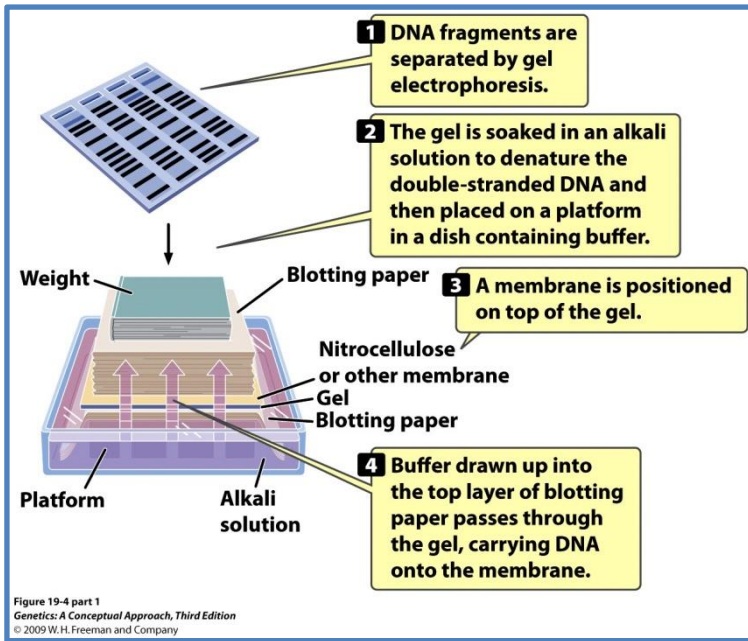
Detección de variación en la secuencia de nucleótidos del genoma:

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- VNTR (Variable Number Tandem Repeats)
- STR (Short Tandem Repeats)
- SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

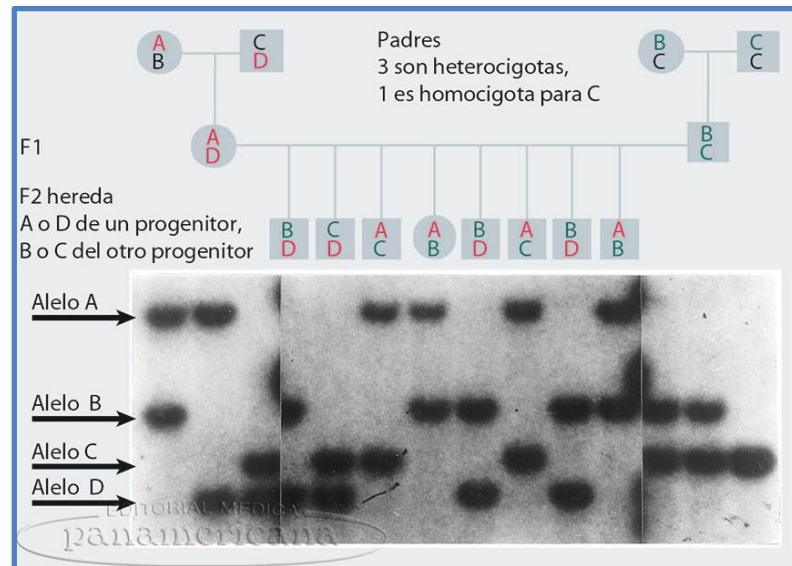
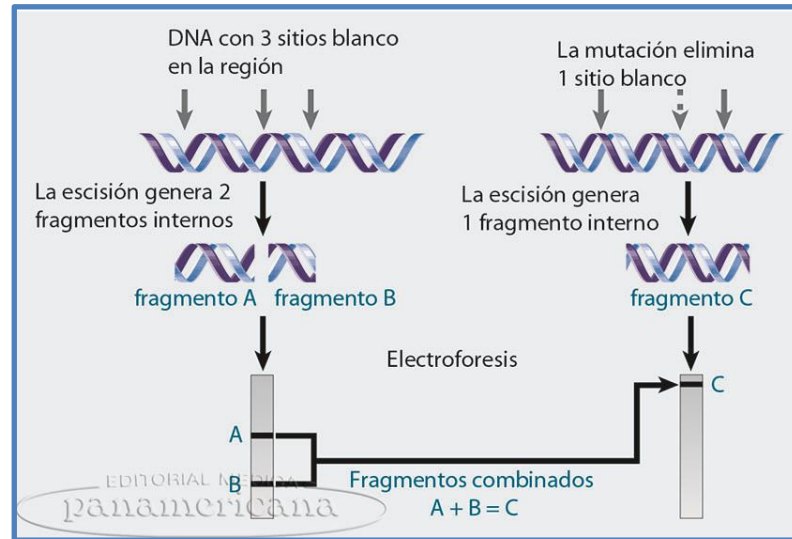
# RFLPs



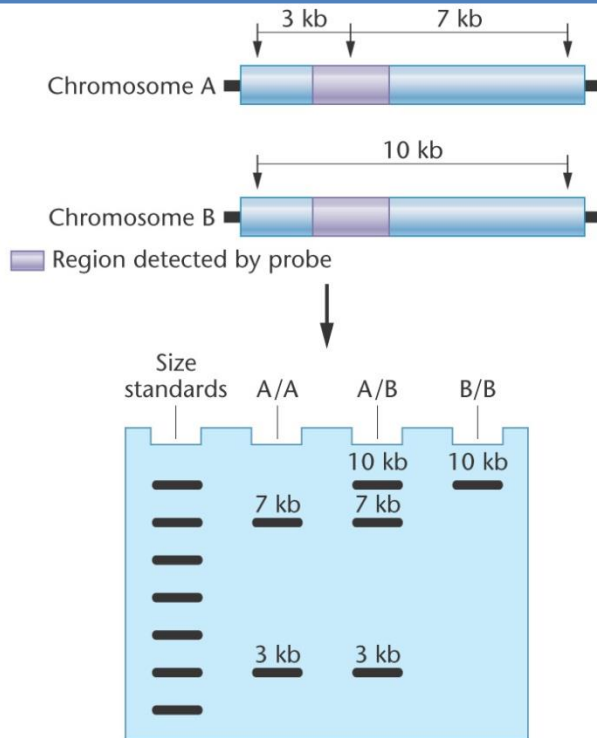
# Técnica de Southern



# RFLPs

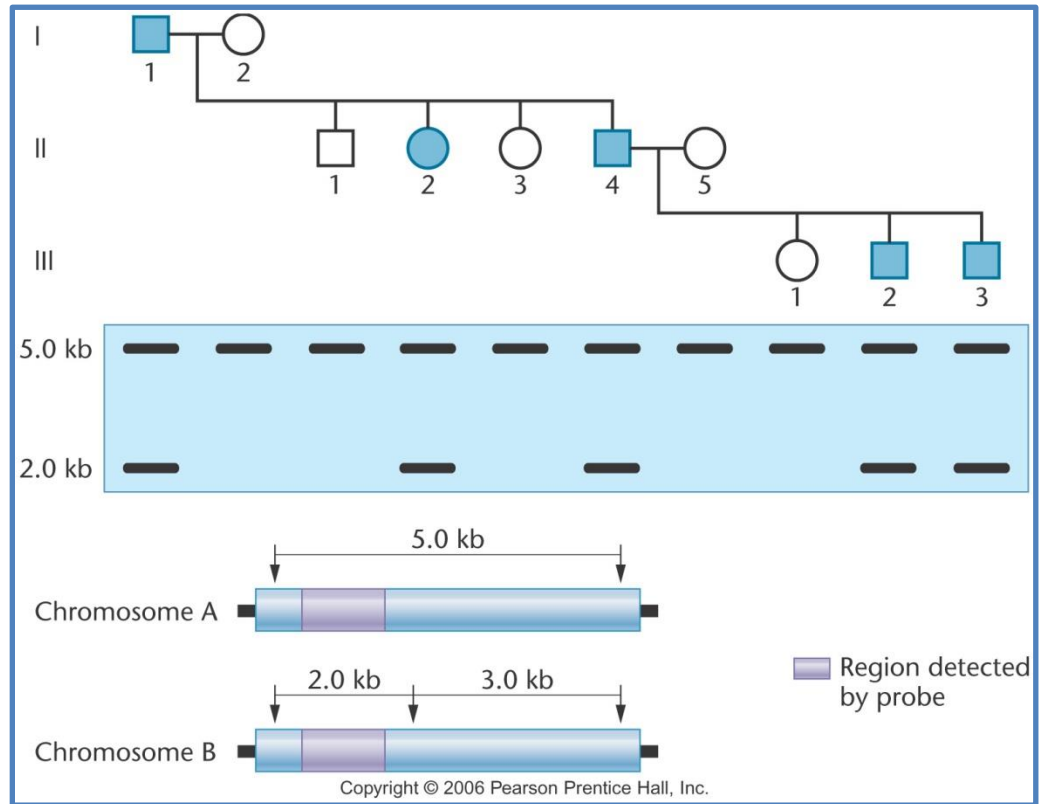


# RFLPs



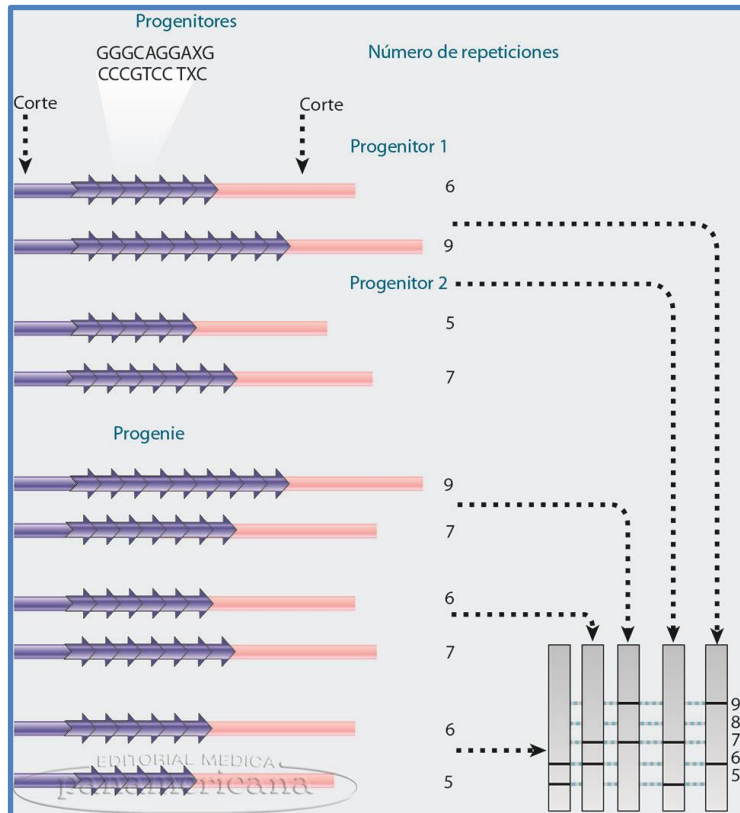
| Genotypes                         | Fragment sizes |
|-----------------------------------|----------------|
| Homozygous for chromosome A (A/A) | 3, 7 kb        |
| Heterozygous (A/B)                | 3, 7, 10 kb    |
| Homozygous for chromosome B (B/B) | 10 kb          |

Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.





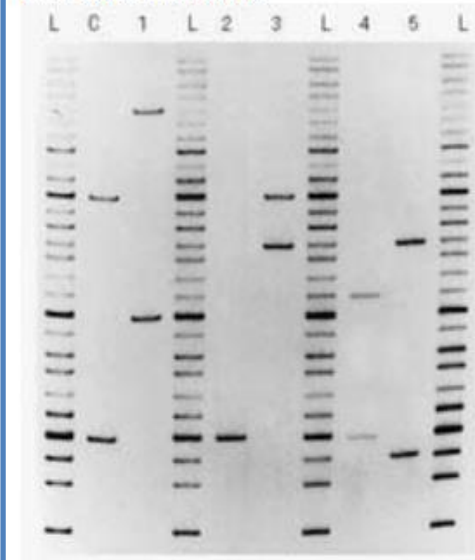
# Repeticiones en tándem de número variable de tipo minisatélite (VNTR)



## D1S80 minisatellite site

PCR based analysis of 6 individuals (C and 1-5)

L = size standards

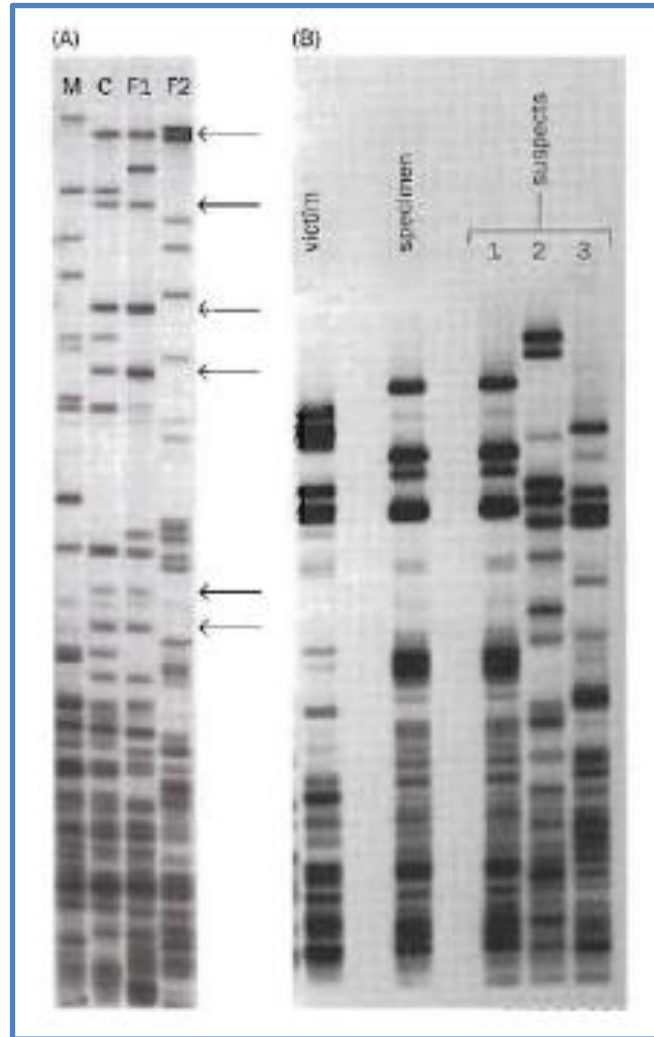


AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification Kit

The AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification Kit amplifies and detects the length polymorphism conferred by the variable number of repeats (VNTR) at the D1S80 locus. The D1S80 repeat unit is 16 base pairs (bp) in length and alleles range from approximately 350 to 1,000 bp.



## Estudios de minisatélites en pruebas de paternidad o en genética forense



## STR o SSR

SSR: simple sequence repeat  
(length polymorphism)



variation between strains in number of repeats  
at a given locus

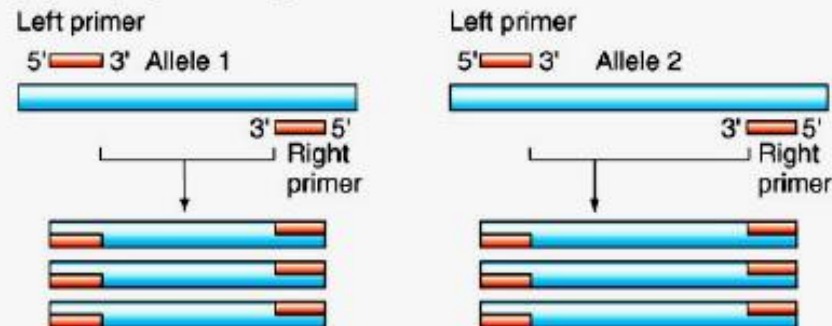
PCR yields products of different size:



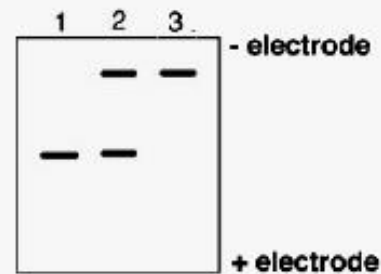
(a) Design primers that anneal to sequence flanking microsatellite region



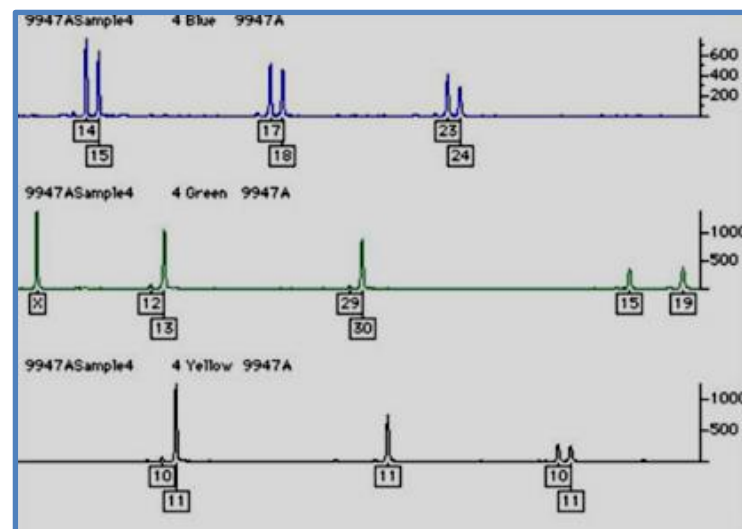
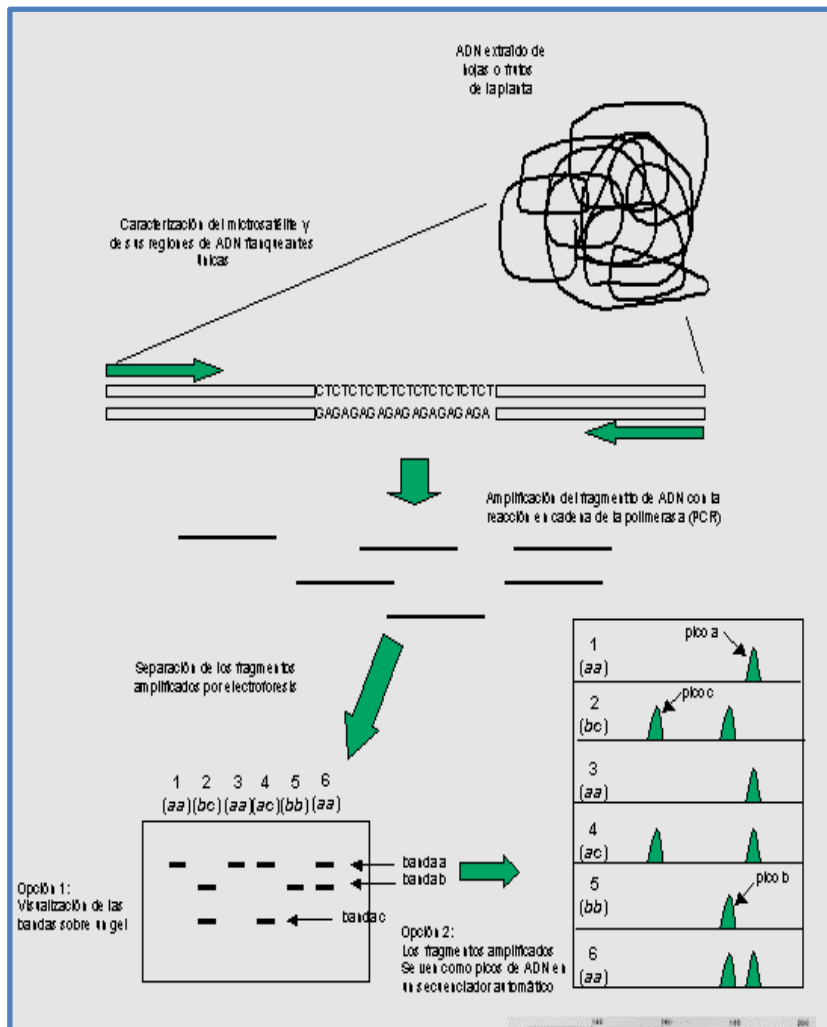
**(b) Amplify alleles by PCR.**



**(c) Analyze PCR products by gel electrophoresis and staining.**

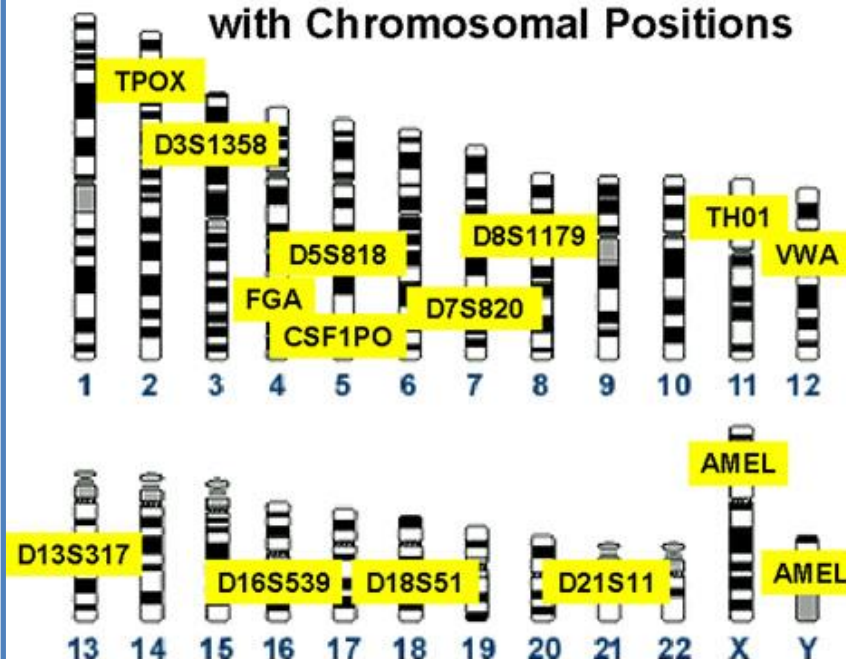


1 is homozygous for allele 1  
2 is heterozygous  
3 is homozygous for allele 2

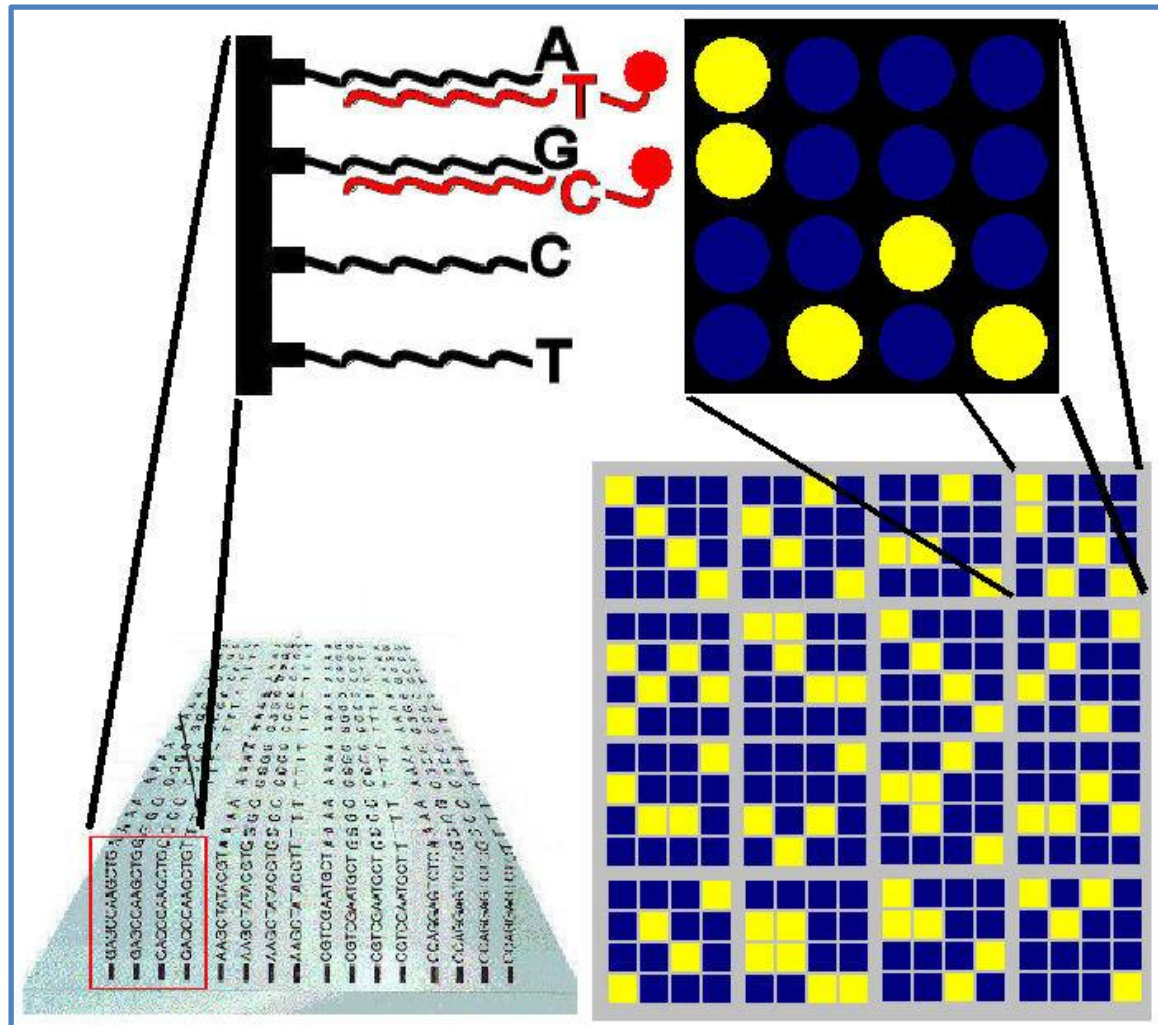




### 13 CODIS Core STR Loci with Chromosomal Positions



| Locus      | D3S1358  | vWA      | FGA      | D8S1179  | D21S11   | D18S51   | D5S818   |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Genotipo   | 15<br>18 | 16<br>16 | 19<br>24 | 12<br>13 | 29<br>31 | 12<br>13 | 11<br>13 |
| Frecuencia | 8,2%     | 4,4%     | 1,7%     | 9,9%     | 2,3%     | 4,3%     | 13%      |
| Locus      | D13S317  | D7S820   | D16S539  | TH01     | TPOX     | CSF1PO   | AMEL     |
| Genotipo   | 11<br>11 | 10<br>10 | 11<br>11 | 9<br>9,3 | 8<br>8   | 11<br>11 | X<br>Y   |
| Frecuencia | 1,2%     | 6,3%     | 9,5%     | 9,6%     | 3,52%    | 7,2%     | (varón)  |



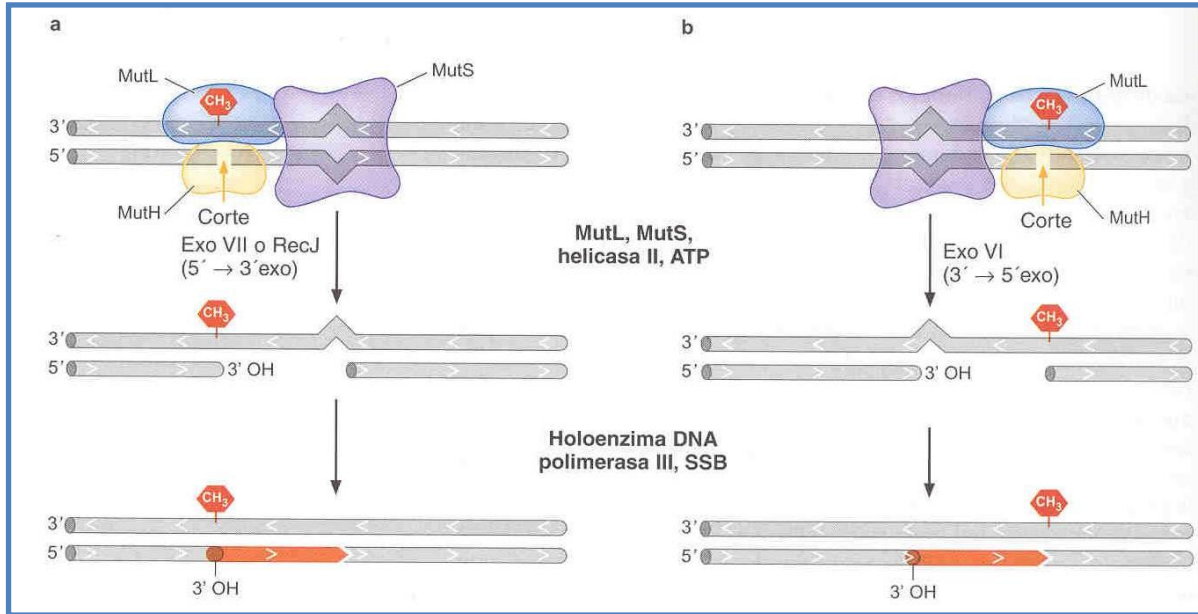
[http://www.mun.ca/biology/scarr/DNA\\_Chips.html](http://www.mun.ca/biology/scarr/DNA_Chips.html)

## Mecanismos de reparación del ADN en el hombre:

- De emparejamientos incorrectos (MMR)
- Por escisión de bases (BER)
- Por escisión de nucleótidos (NER)
- De roturas de la doble hélice (DSB): recombinación homóloga, fusión no homóloga de extremos (NHEJ)
- Por polimerasas capaces de saltar la lesión



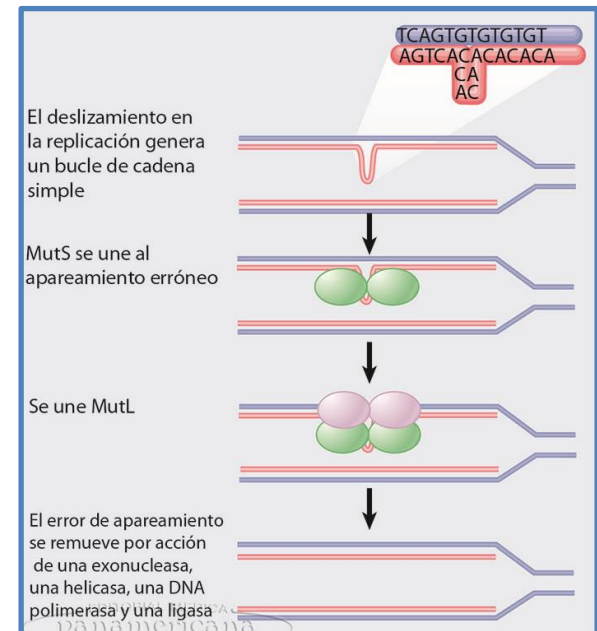
## De emparejamientos incorrectos (mis-match repair: MMR)



Reparación de emparejamientos incorrectos en *E. coli*.

En célula eucariotas hay un sistema similar al mut de *E. coli*. Reparar errores de apareamiento de una sola base y también errores de deslizamiento en la replicación, especialmente en regiones microsatélites.

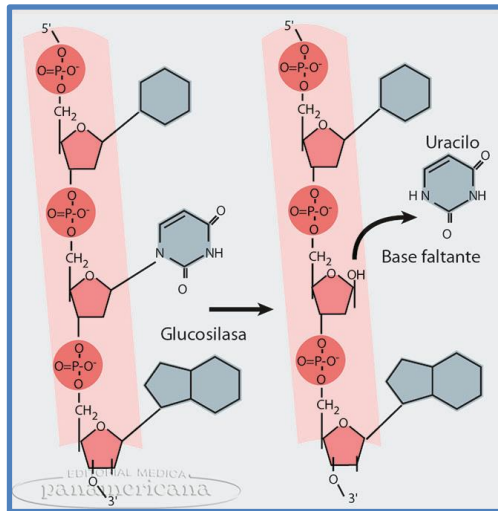
Defectos en la reparación de emparejamientos incorrectos: cáncer colorrectal no polipósico hereditario. Mutaciones en los genes homólogos humanos de *MutS* y *MutL*.



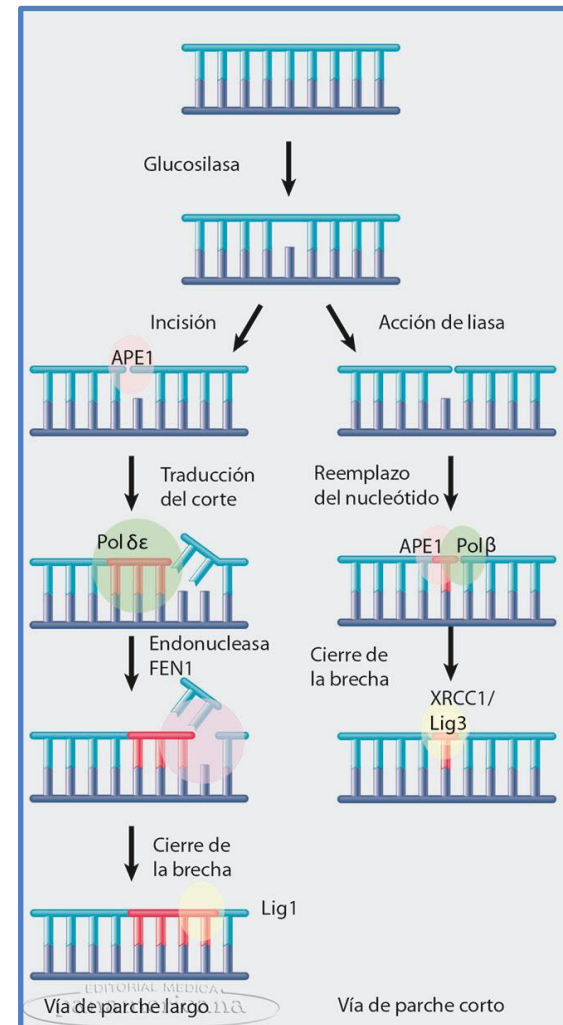


## Por escisión de bases (BER)

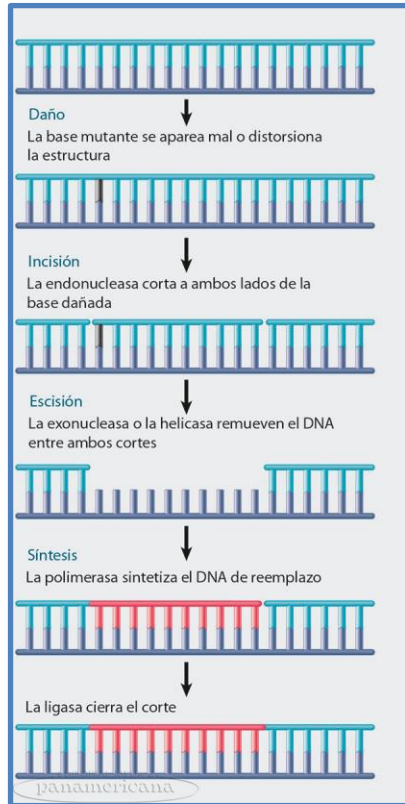
Intervienen glicosilasas eliminando una base del ADN mediante un corte en el enlace con la desoxirribosa



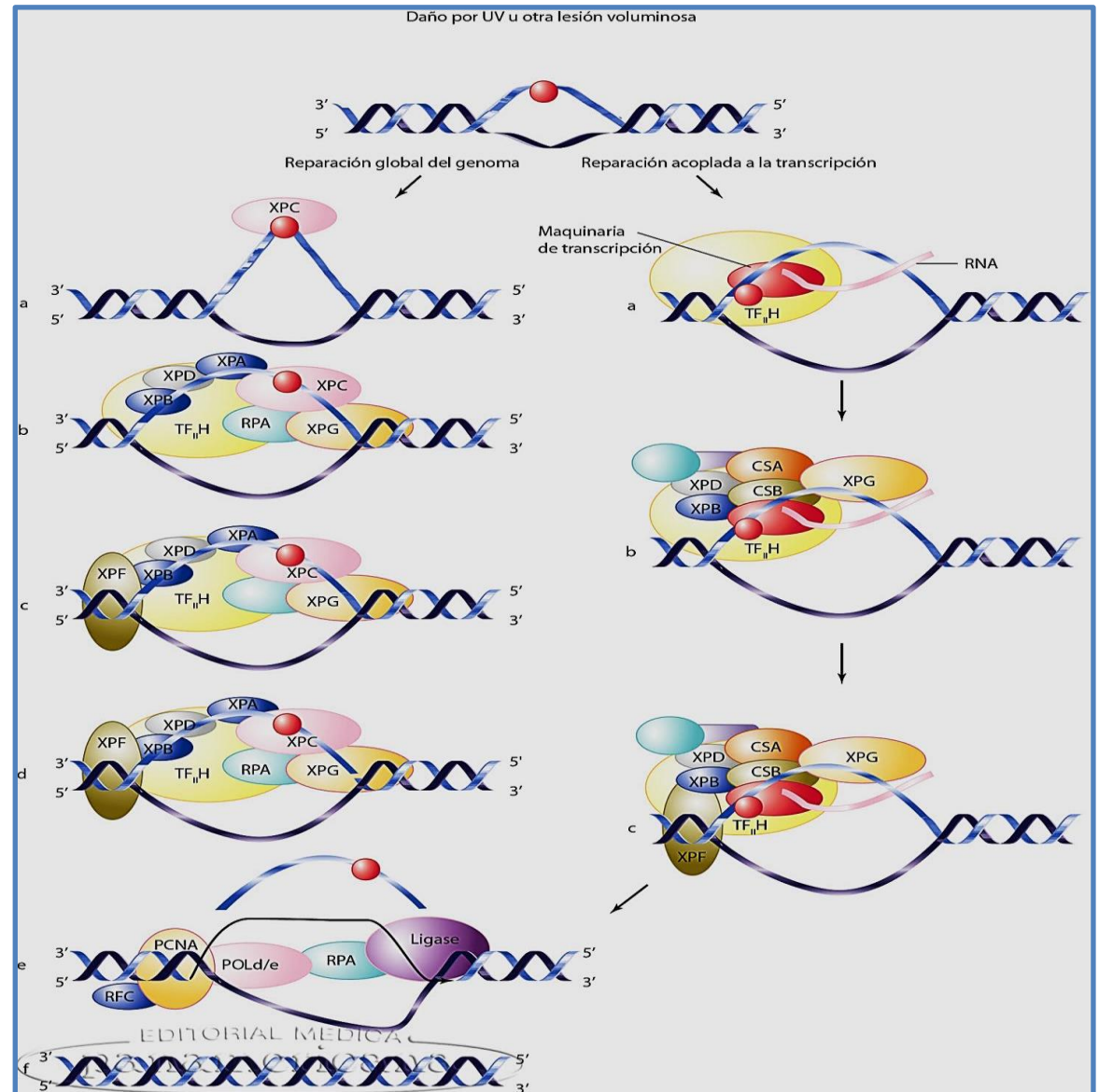
Actúan endonucleasas (APE1), polimerasas y ligasas



# Por escisión de nucleótidos (NER)



Mecanismo general de reparación por escisión de nucleótidos



NER se produce por dos vías principales

La *Xeroderma pigmentosa* (piel seca pigmentada), se produce por alteraciones en el sistema NER, está asociada a una gran sensibilidad a la luz uv, incremento a padecer cáncer de piel y a degeneraciones neurológicas.

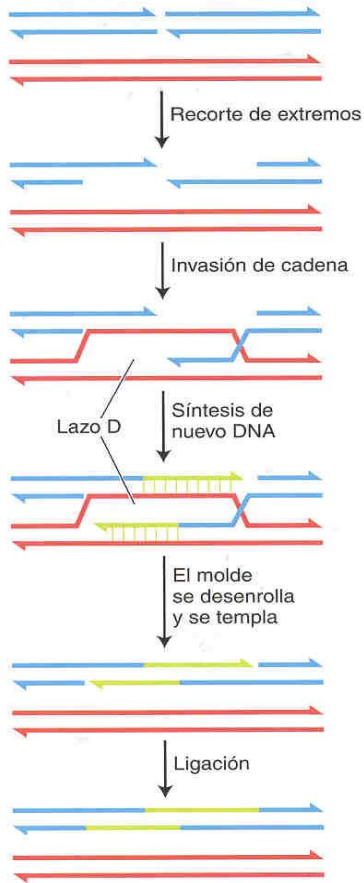


Niño afectado por Xerodermia pigmentosa

Otras enfermedades relacionadas con defectos en NER: Síndrome de Cockayne y la tricotiodistrofia

## De roturas de la doble hélice (DSB): recombinación homóloga, fusión no homóloga de extremos (NHEJ)

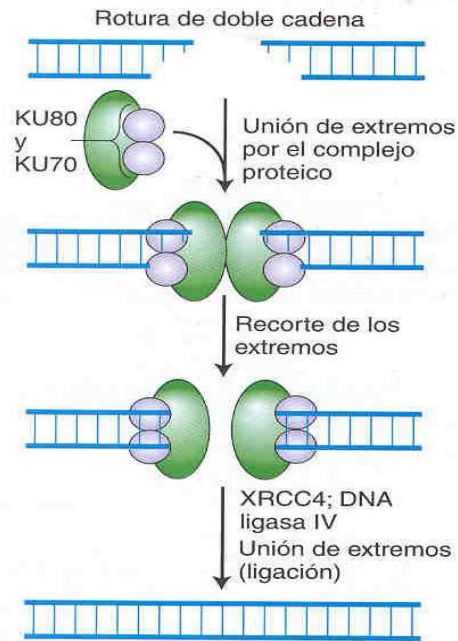
### Reparación libre de error de roturas de doble cadena por SDSA



**FIGURA 15-30** El mecanismo libre de error por templado de cadena dependiente de la síntesis (SDSA) repara las roturas de doble cadena en las células en división.

Recombinación homóloga: Si la rotura de la doble cadena se produce después de la replicación, el daño se corrige por un mecanismo denominado de anillamiento de cadena dependiente de la síntesis (SDSA: synthesis-dependent strand annealing).

### El mecanismo de unión de extremos no homólogos propenso a error repara roturas de doble cadena



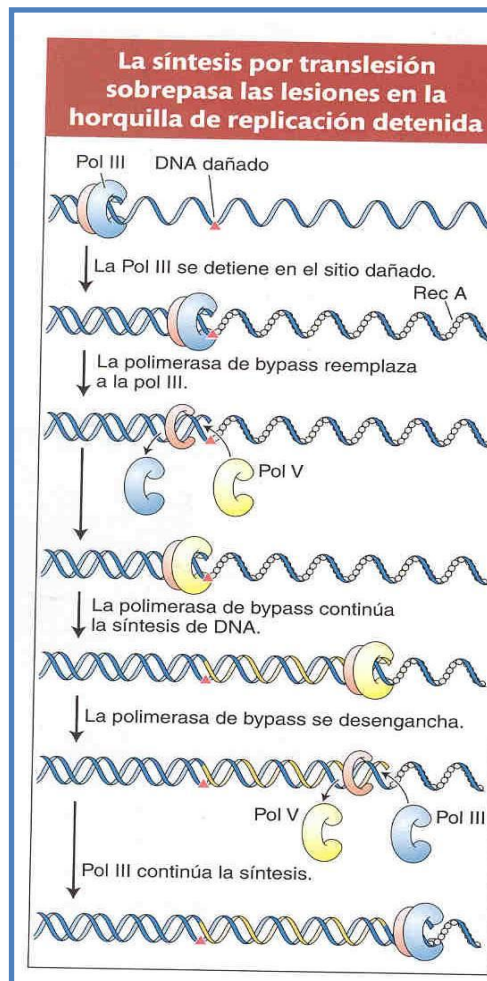
**FIGURA 15-29** Mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Este mecanismo es propenso a error. Véase el texto para más detalles.

Fusión no homóloga de extremos (NHEJ). Normalmente se produce una reparación imperfecta, pero necesaria porque los extremos han de ser reparados para evitar reordenaciones cromosómicas potencialmente dañinas.



## Por polimerasas capaces de saltar la lesión

Si se bloquea la replicación debido a la existencia de bases dañadas, se puede evitar mediante la adición de bases potencialmente no específicas. En *E. coli* se requiere para ello que se active el sistema SOS y en él interviene entre otras las denominadas polimerasas de translesión o de bypass. En eucariotas estas polimerasas son la Pol  $\zeta$  (polimerasa zeta) y la Pol  $\eta$  (polimeasa eta) que son capaces de sintetizar ADN frente a dímero de T. Sin embargo, la replicación de Pol  $\eta$  es más fiel que la de Pol  $\zeta$  que introduce cualquier base.



**FIGURA 15-27** Un modelo para la síntesis por translesión en *E. coli*. En el transcurso de la replicación, la DNA polimerasa III se reemplaza temporalmente por una polimerasa de bypass (pol V) que continúa replicando más allá de la lesión. Las polimerasas de bypass son propensas a error. [De E.C. Friedberg, A.R. Lehmann, y R.P. Fuchs, "Trading Places: How Do DNA Polymerases Switch During Translesion DNA Synthesis?" *Molec. Cell* 18, 2005, 449-505.]

## Otras enfermedades asociadas con los sistemas de reparación del ADN

| Enfermedad                       | Sistema afectado  |
|----------------------------------|---|
| Síndrome de Cockayne             | REN acoplado a la transcripción, principalmente de los genes CSA, CSB o XPG |
| Síndrome de Bloom                | Gen BLM (Bloom mutation), codifica para una helicasa (RecQ)                 |
| Anemia de Fanconi                | Reparación de ADN dañado por agentes entrelazantes "cross-linking".         |
| Síndrome de Werner               | Gen WR, codifica para una helicasa  |
| Predisposición al cáncer de mama | Genes BRCA1 y BRCA2. Reparación de roturas de doble hélice                  |