



Técnicas moleculares y su utilidad

Federico Rojo
IIS-Fundación Jiménez Díaz
IMIM-Hospital del Mar

Técnicas Moleculares (TEAP)

XXV Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y
División Española de la Academia Internacional de Patología (SEAP-IAP)

Zaragoza, Mayo 2011

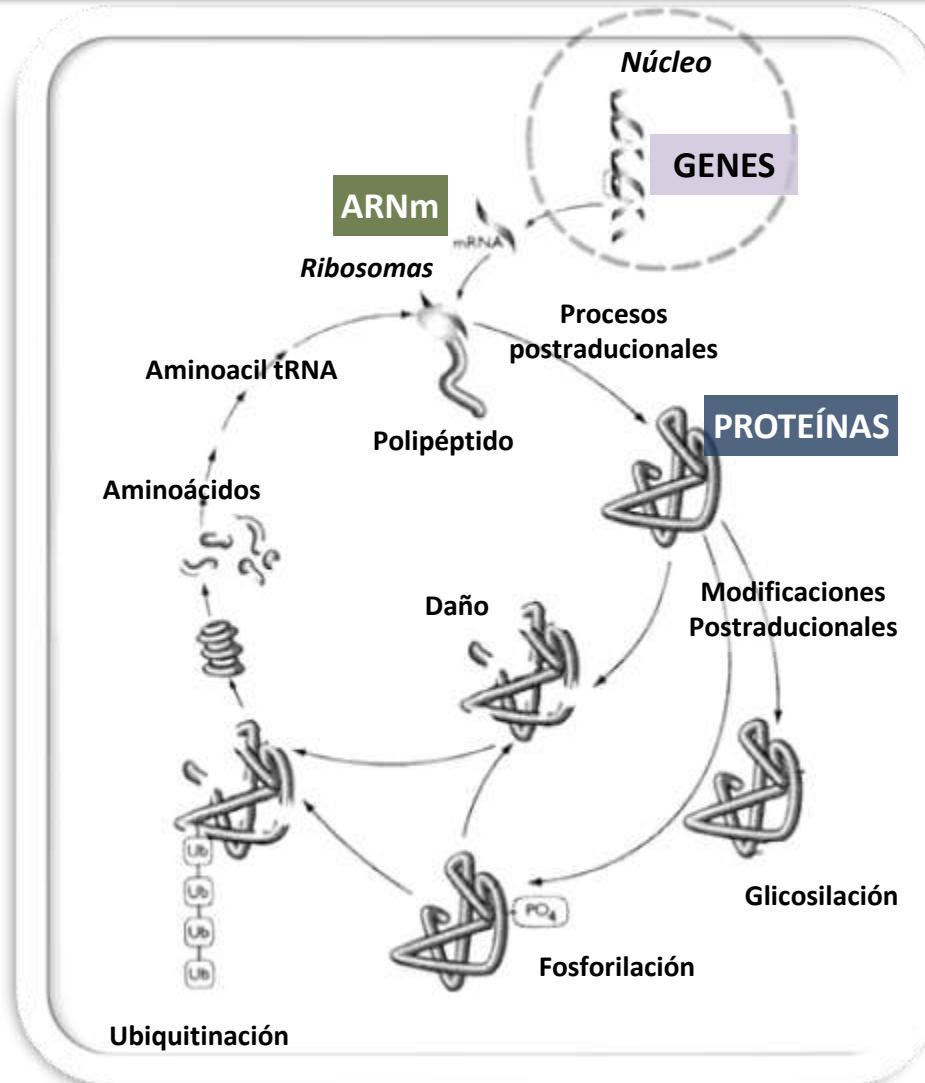
Guión

- Electroforesis: concepto y aplicaciones
- Técnicas moleculares complejas: perfiles de expresión de proteínas y de genes, identificación de dianas
- Utilidad de las técnicas moleculares en el manejo del paciente con cáncer

Guión

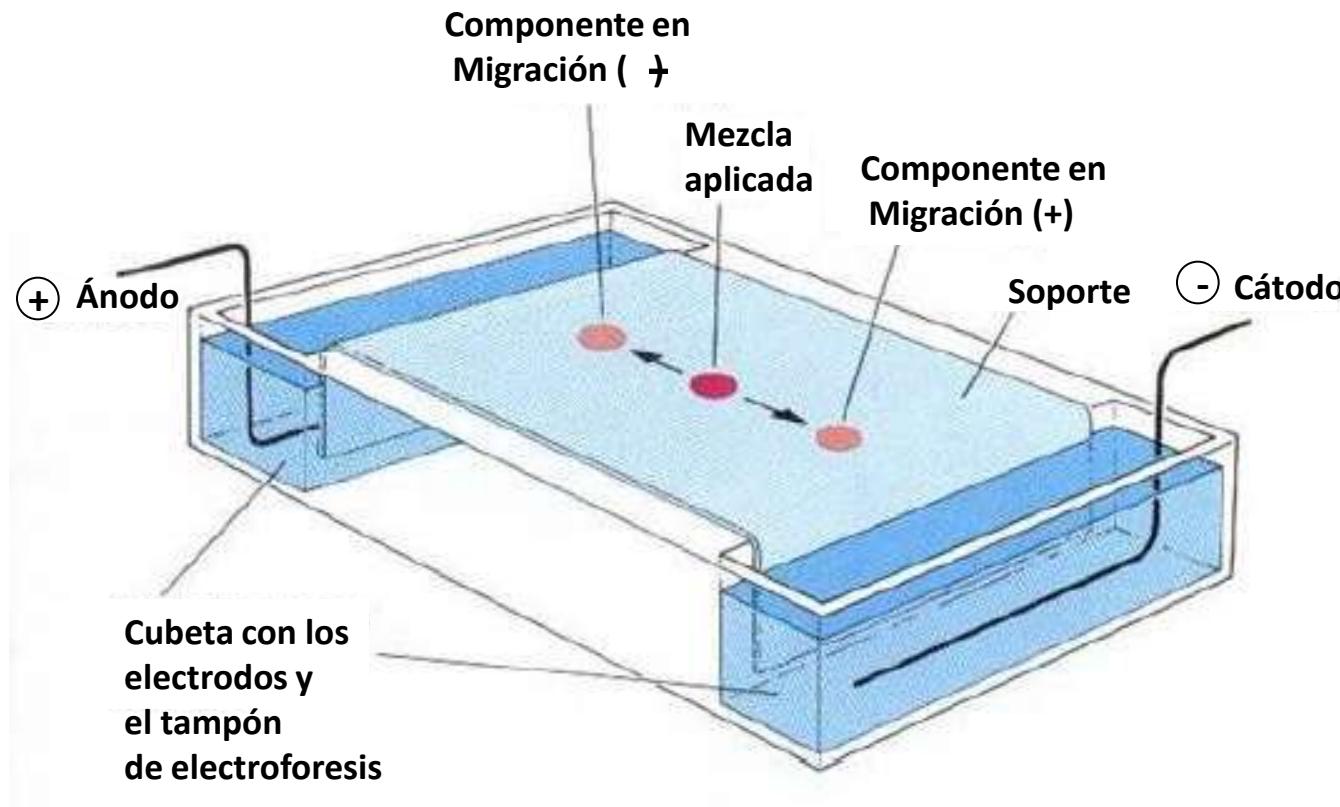
- **Electroforesis: concepto y aplicaciones**
- Técnicas moleculares complejas: perfiles de expresión de proteínas y de genes, identificación de dianas
- Utilidad de las técnicas moleculares al manejo del paciente con cáncer

Del gen a la proteína

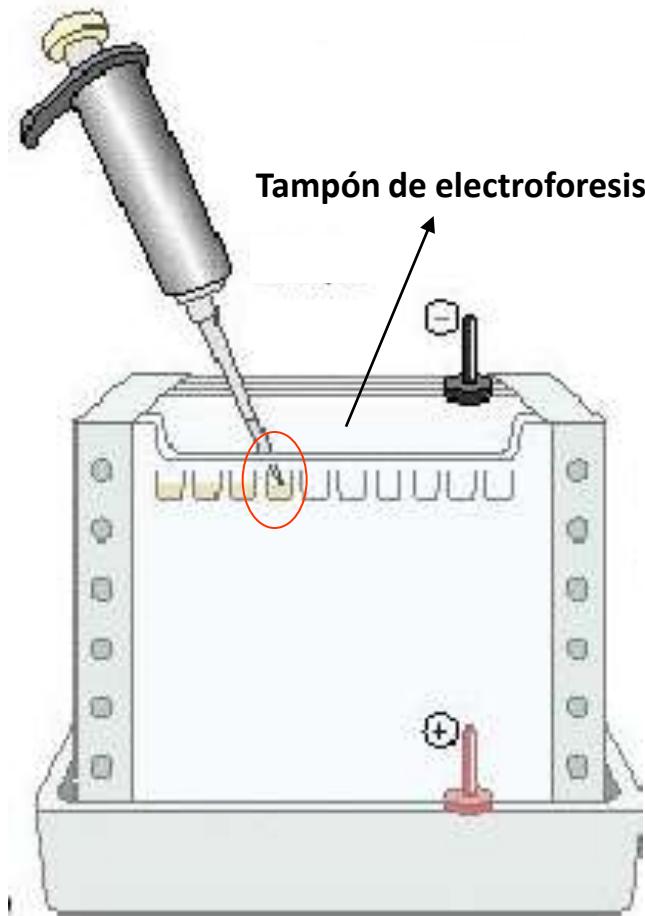


Electroforesis

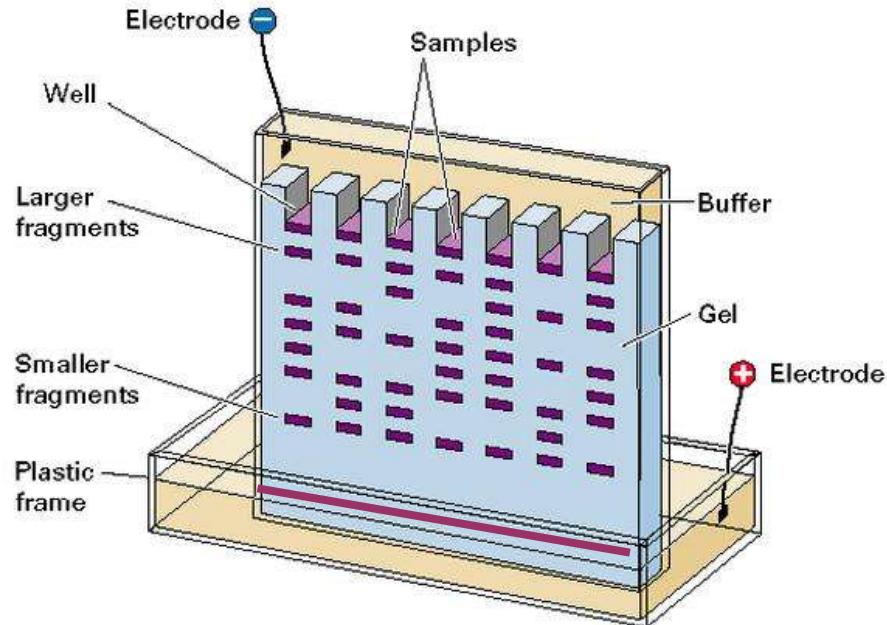
Es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico mediante el que se pueden separar moléculas en función de su tamaño, forma y carga eléctrica

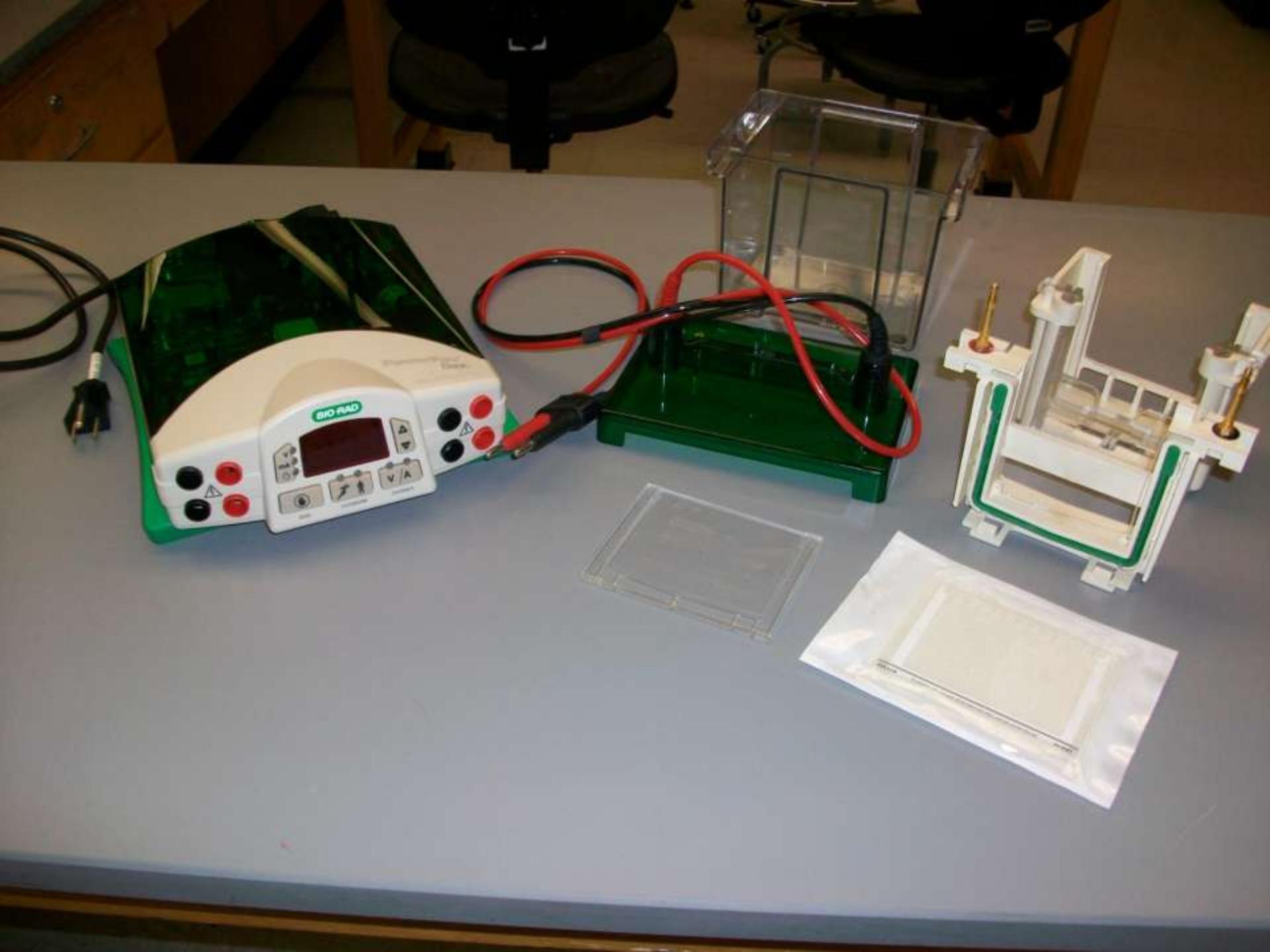


Electroforesis



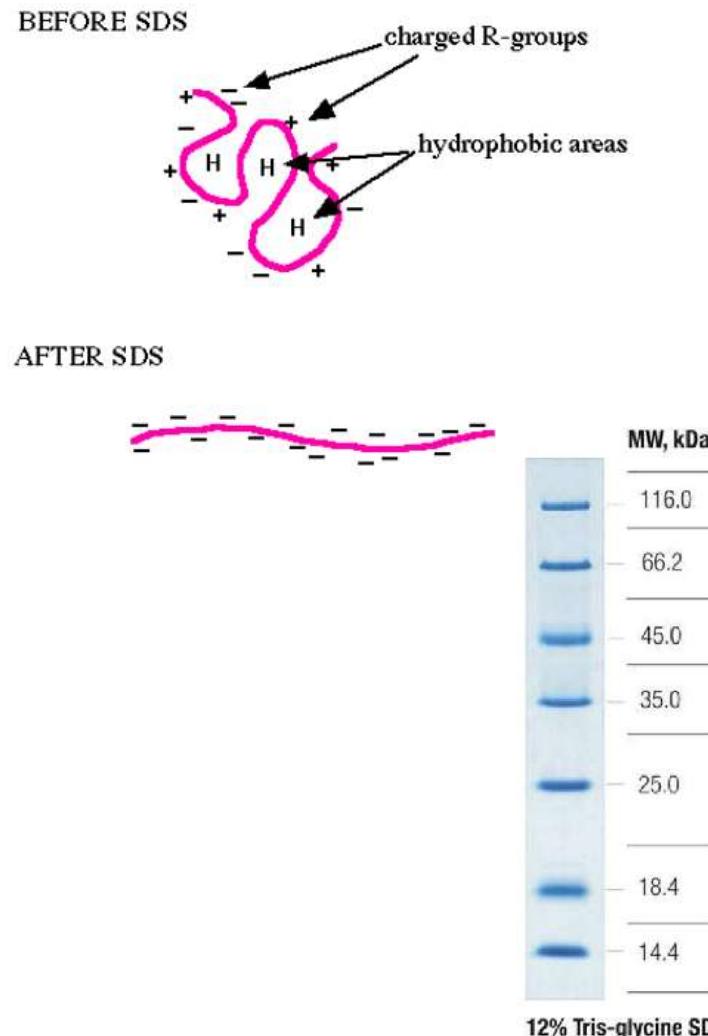
- Separa moléculas de acuerdo a su carga y masa
- Diferencia de potencial entre los extremos del gel de ~ 200V
- Las proteínas ‘caen’ o migran en el gel
- Se agrupan en bandas en función de su masa y su carga





SDS-PAGE

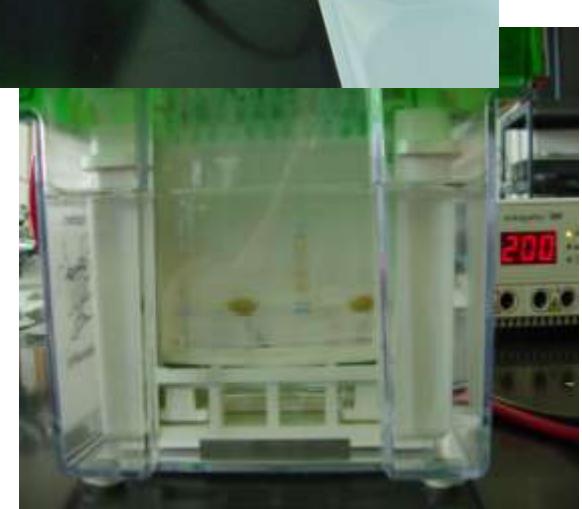
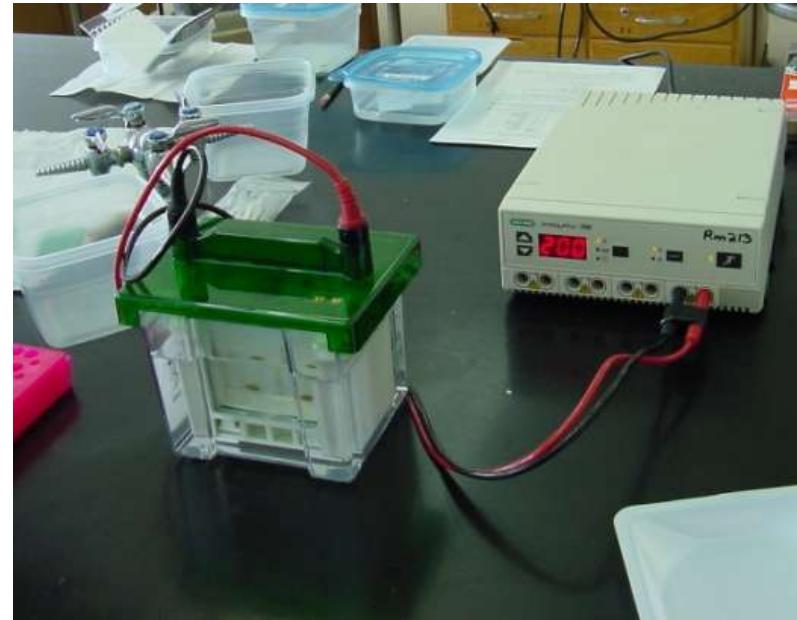
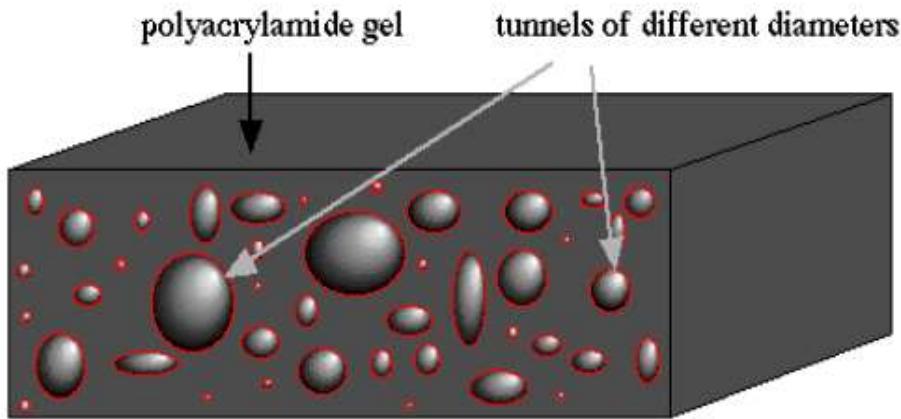
- El SDS (sodium dodecyl sulfate) es un detergente utilizado en el pretratamiento de la muestra de proteínas, previa a su migración (desnaturalización)
- El mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro
- Tratamiento con calor (3-5 min., 90°C).
- Tampones de alto pH (~10)
- PAGE = polyacrylamide gel elecrophoresis
- Se emplean proteínas estándar para conocer el tamaño de la proteína diana



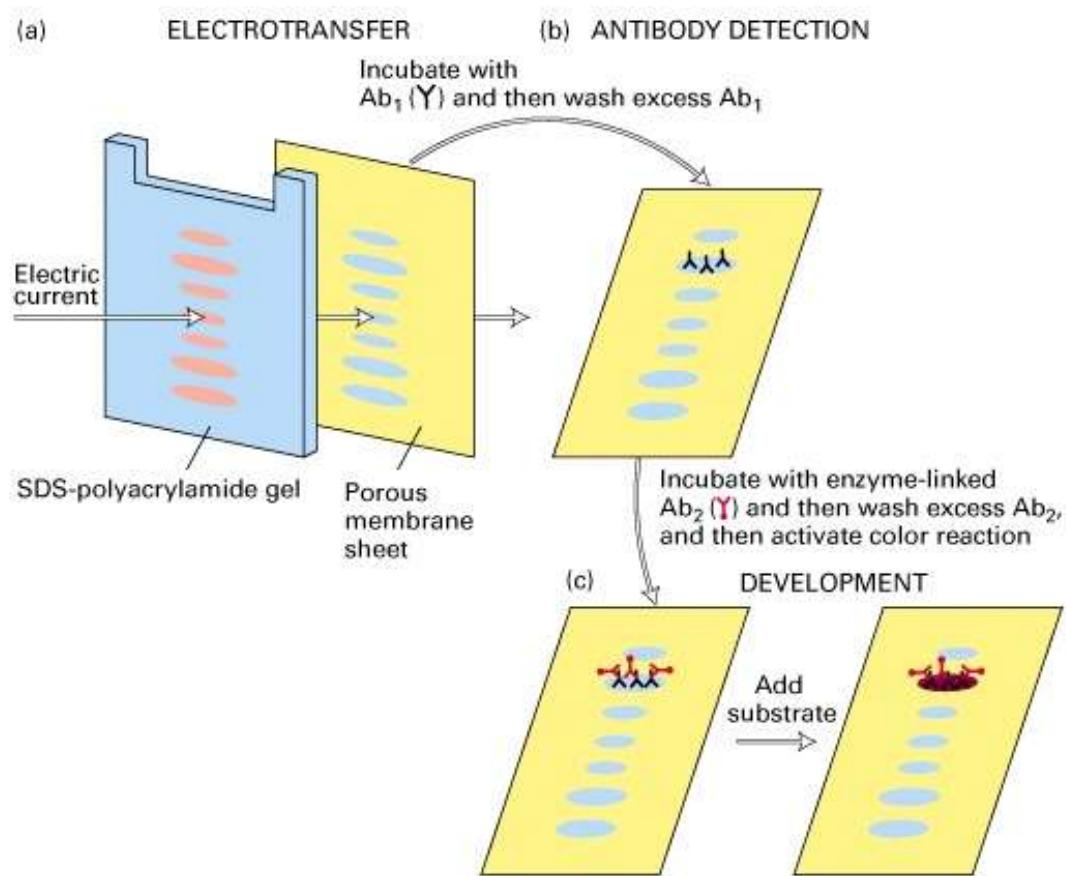
12% Tris-glycine SDS-PAGE

Gel de poliacrilamida

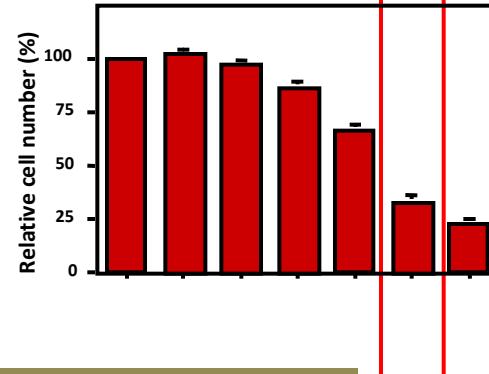
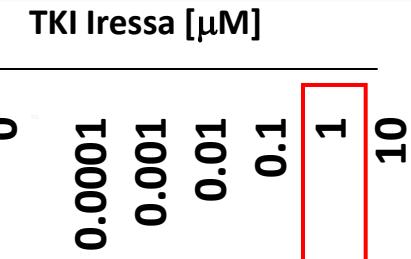
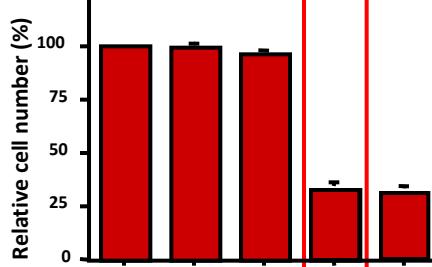
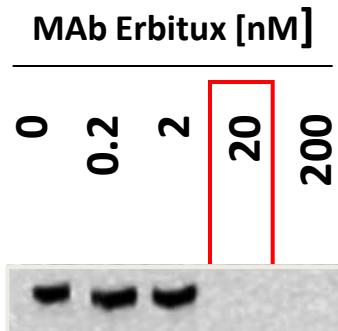
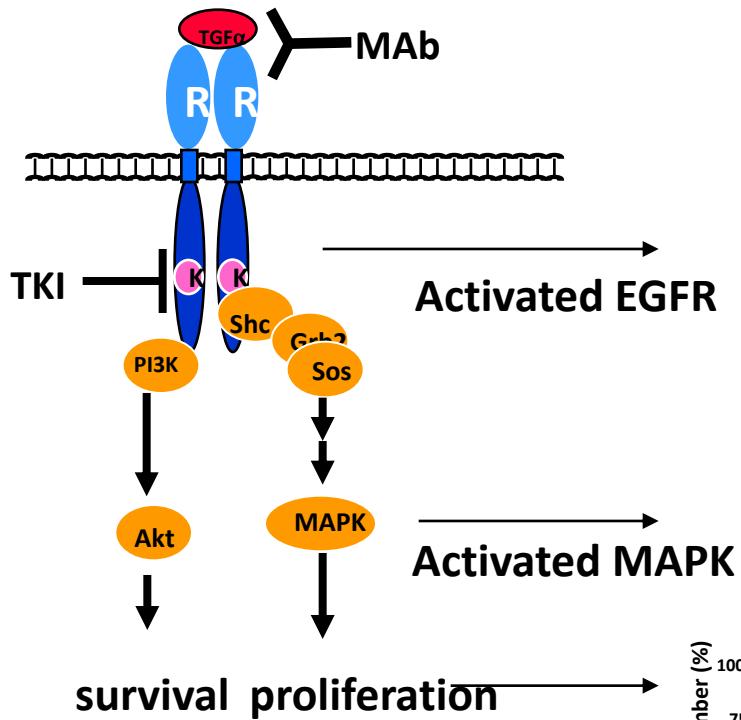
- El gel crea túneles a través de los que migran las proteínas
- Se confirma la migración del gel mediante una tinción de coomasie
- Se separan las proteínas de acuerdo a su masa, no su forma o carga, debido al proceso de desnaturización



Detectando proteínas específicas: Western blot

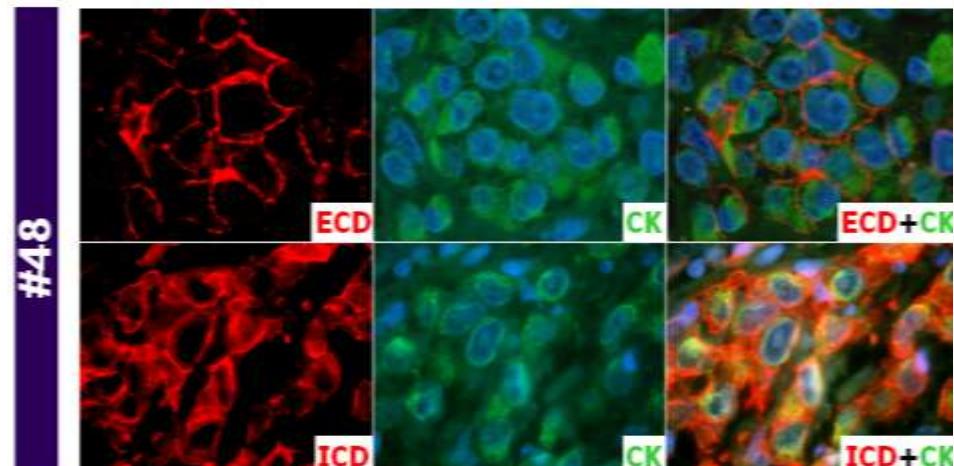
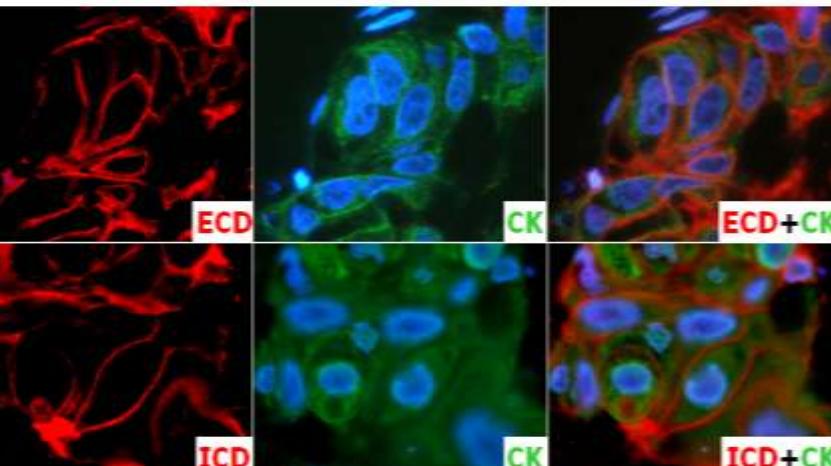
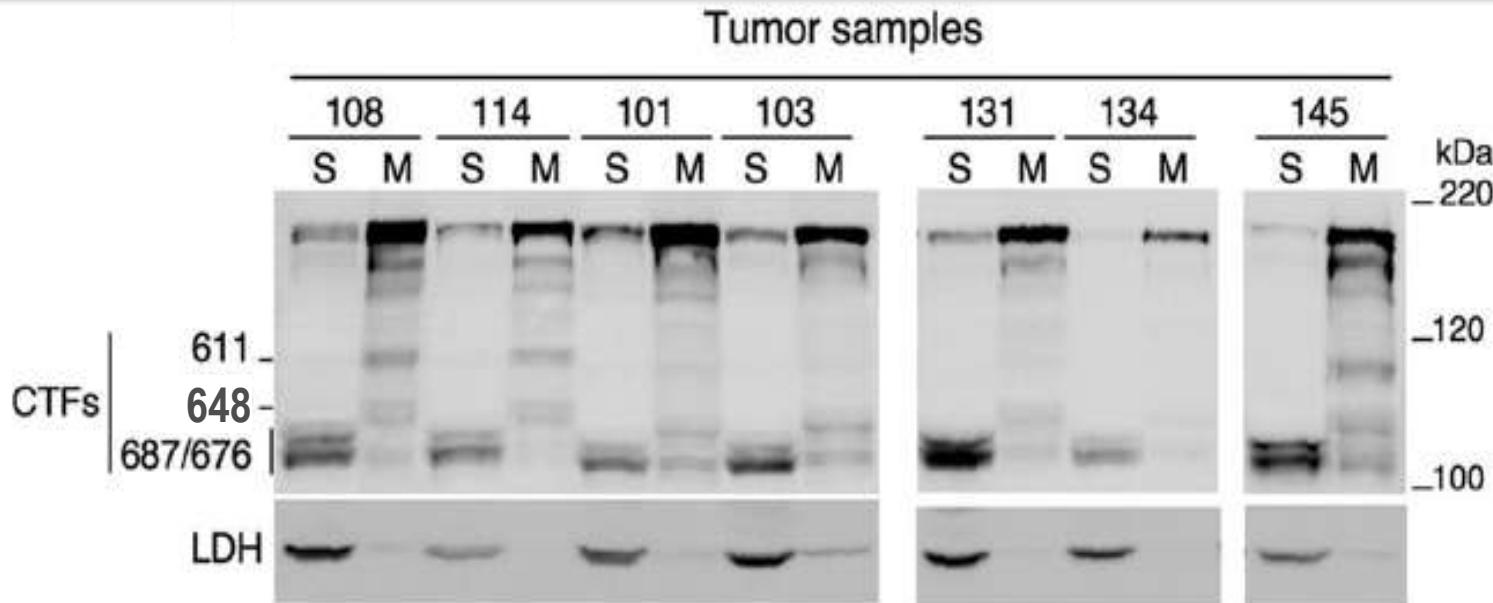


Pharmacodynamics: a paradigm of bench to bedside research



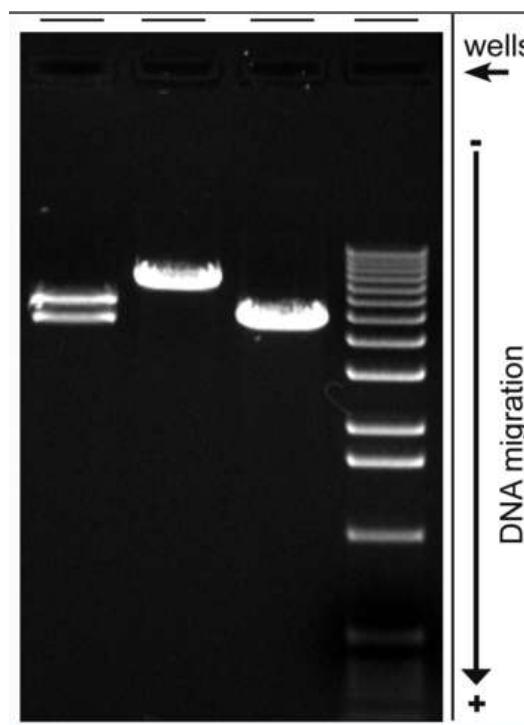
Sensitivity to HER2 therapies:

p95 HER2 fragments have different subcellular localization in human breast cancer



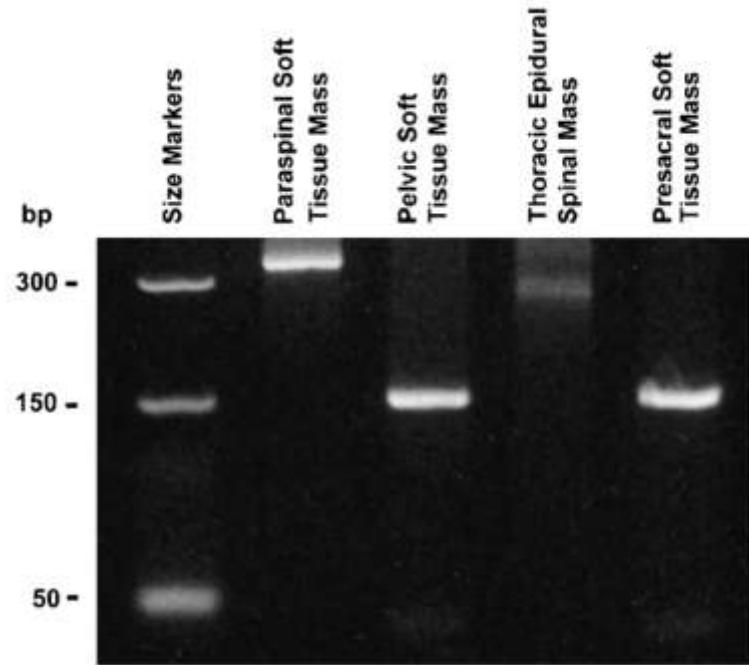
Southern Blot

- Permite el estudio de fragmentos de DNA
- El DNA es desnaturalizado y transferido a una membrana, y separado por electroforesis
- El DNA posee carga negativa y los fragmentos más pequeños de DNA migran más rápido que los de mayor tamaño
- La electroforesis se realiza en geles de agarosa de 1% al 3%
- Se emplean marcadores para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA



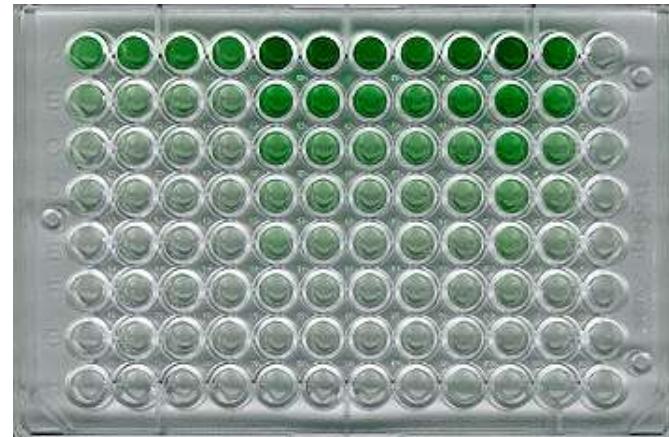
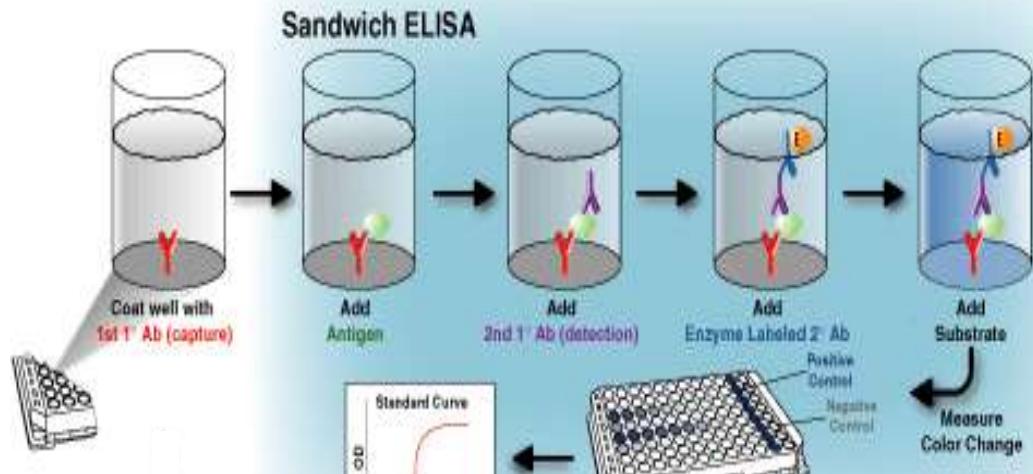
Nothern Blot

- Identifica y cuantifica fragmentos de RNA en función de su tamaño o mediante la utilización de sondas específicas con marcaje radiactivo o enzimático
- El RNA es separado mediante migración en un gel de agarosa por electroforesis
- Pueden aparecer *smears* de RNA correspondientes a moléculas de diferente tamaño



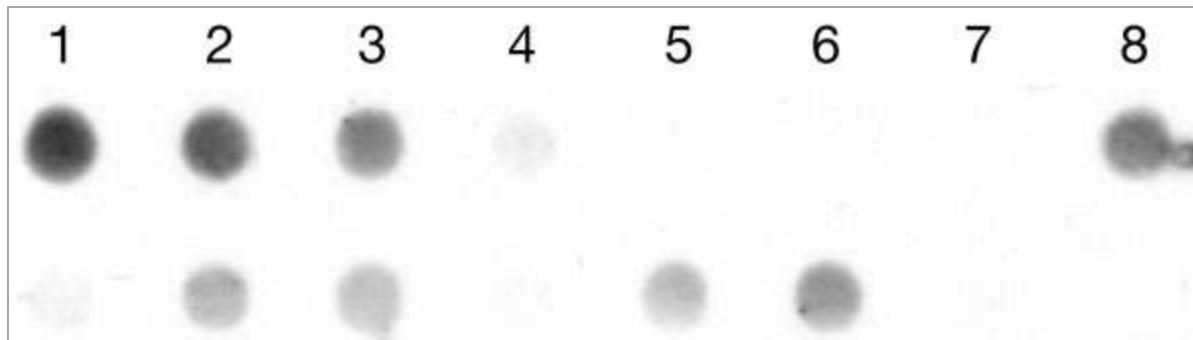
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- Prueba inmunológica de alta sensibilidad
- Sobre un soporte rígido con un anticuerpo o un antígeno unidos
- Se realiza sobre placas de 96 pocillos, con una muestra diluida en sólo 100-200 μ l de muestra
- Se realizan baterías de diluciones para establecer una recta-patrón
- Útil en la identificación de infecciones, cuantificación de anticuerpos, etc

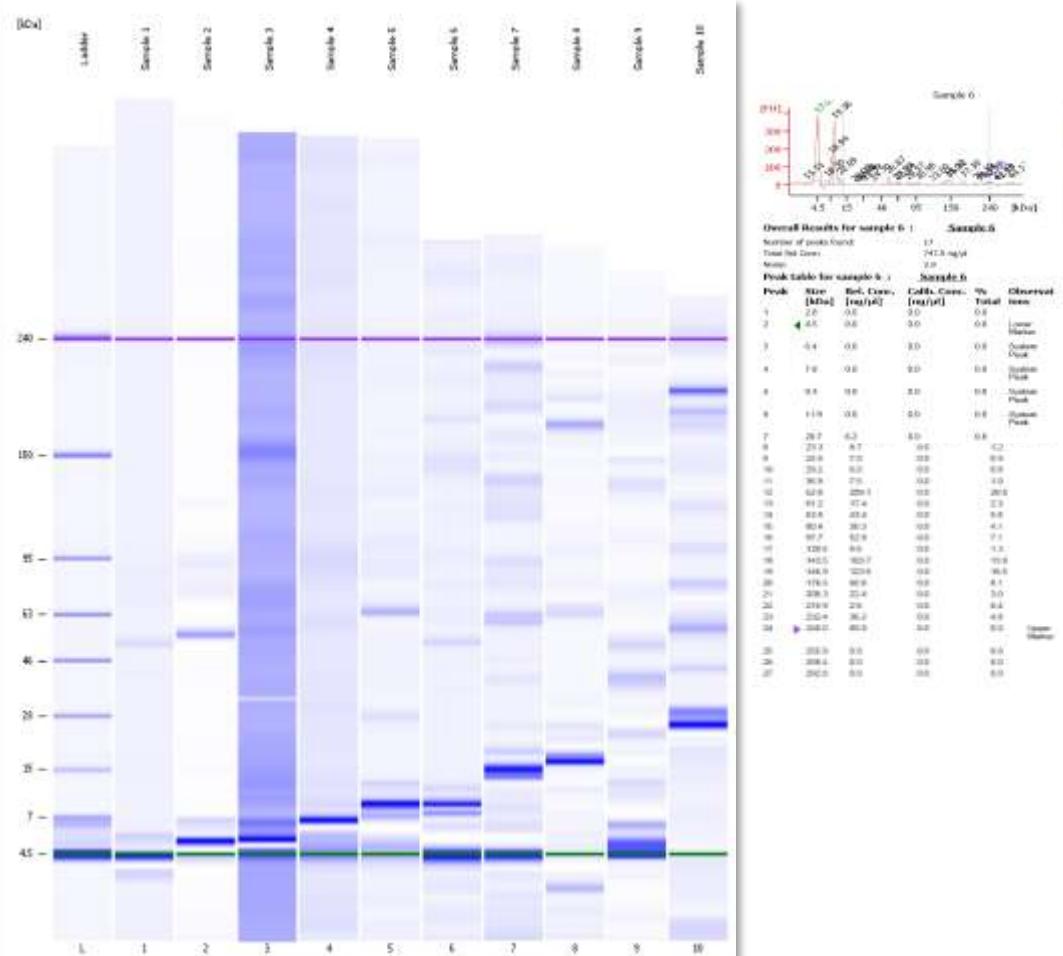


Dot Blot

- Reacción sobre un soporte rígido, sin migración, para la detección de DNA o proteínas
- Permite marcaje con sondas o anticuerpos
- Test cualitativo, no permite cuantificación
- Complejo en su interpretación



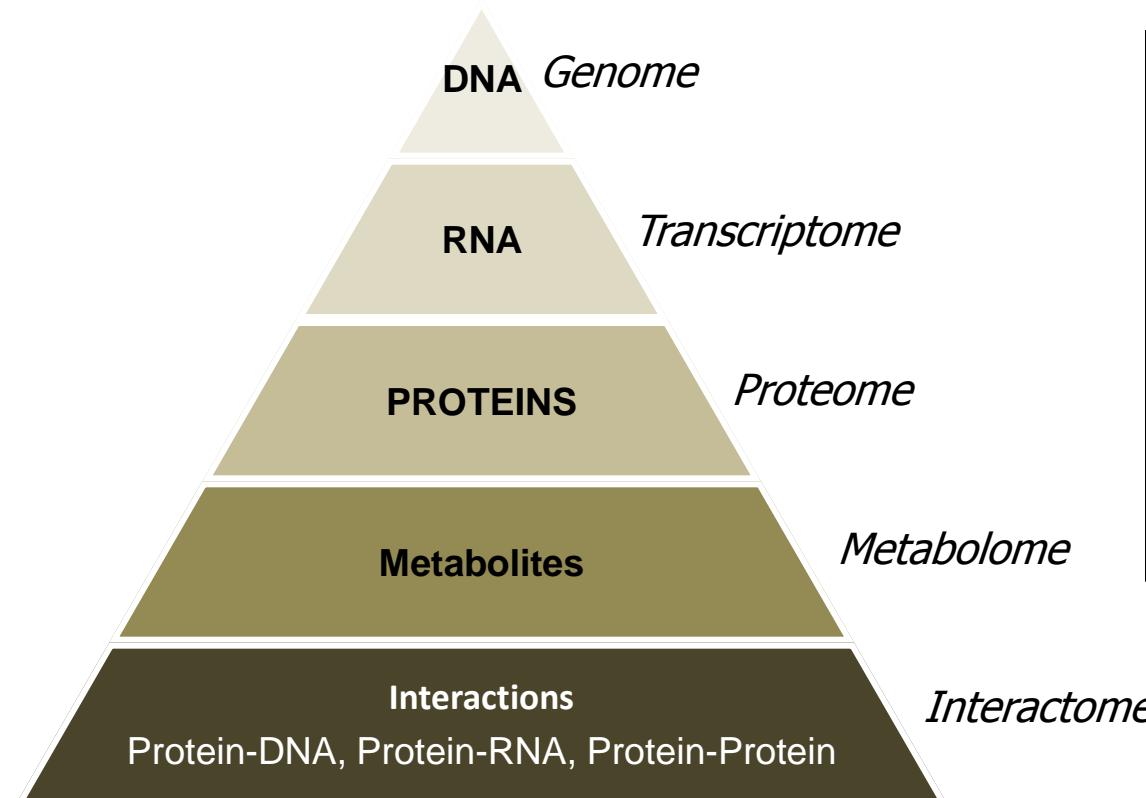
Detección de proteínas en muestras tisulares mediante Agilent



Guión

- Electroforesis: concepto y aplicaciones
- **Técnicas moleculares complejas: perfiles de expresión de proteínas y de genes, identificación de dianas**
- Utilidad de las técnicas moleculares al manejo del paciente con cáncer

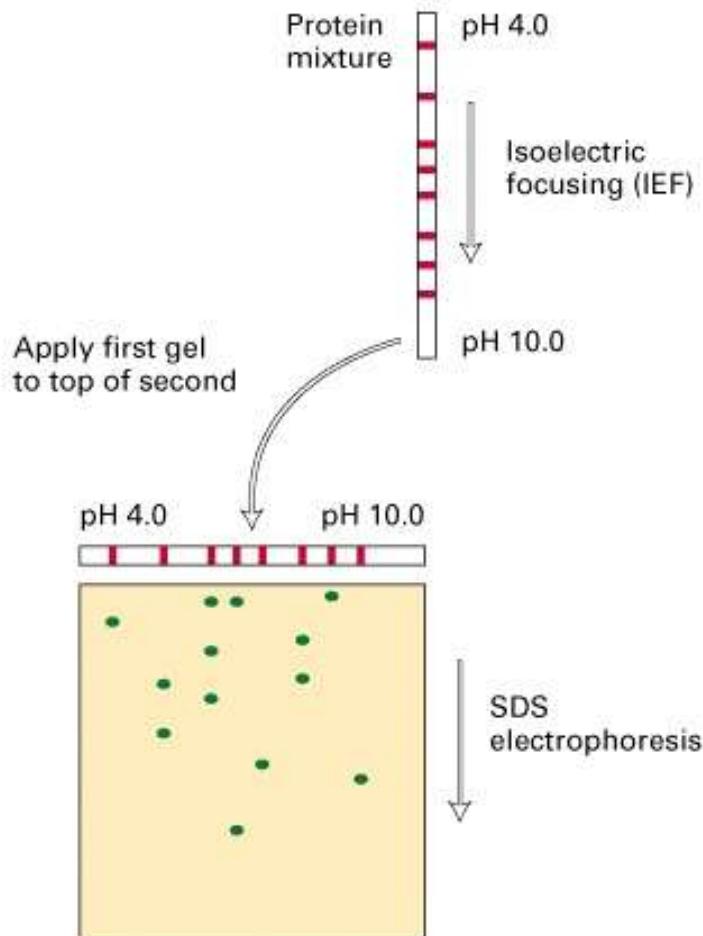
-Omics



Electroforesis bidimensional (2-DE)

(a)

Separation
in first
dimension
(by charge)

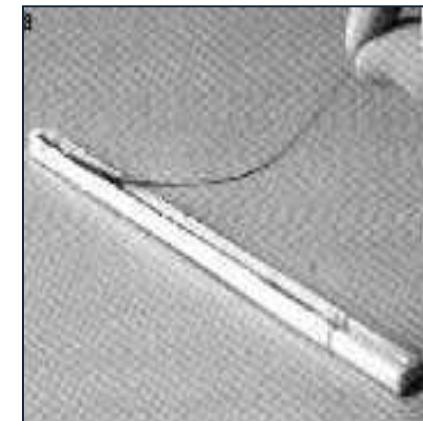
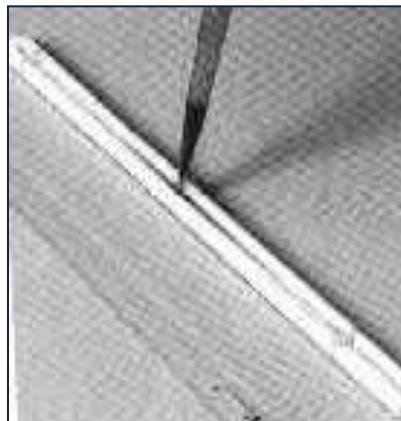


Técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas de proteínas altamente complejas

1. Las proteínas se separan según su punto isoeléctrico
2. Las proteínas se separan según su masa molecular.

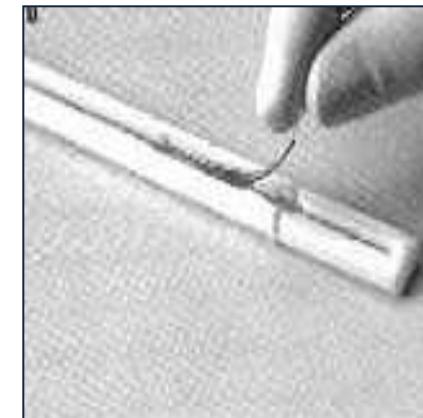


Carga de la primera dimensión



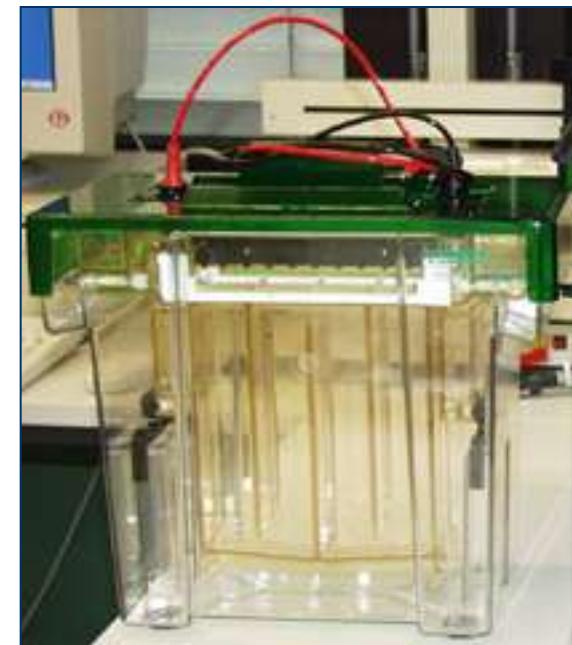
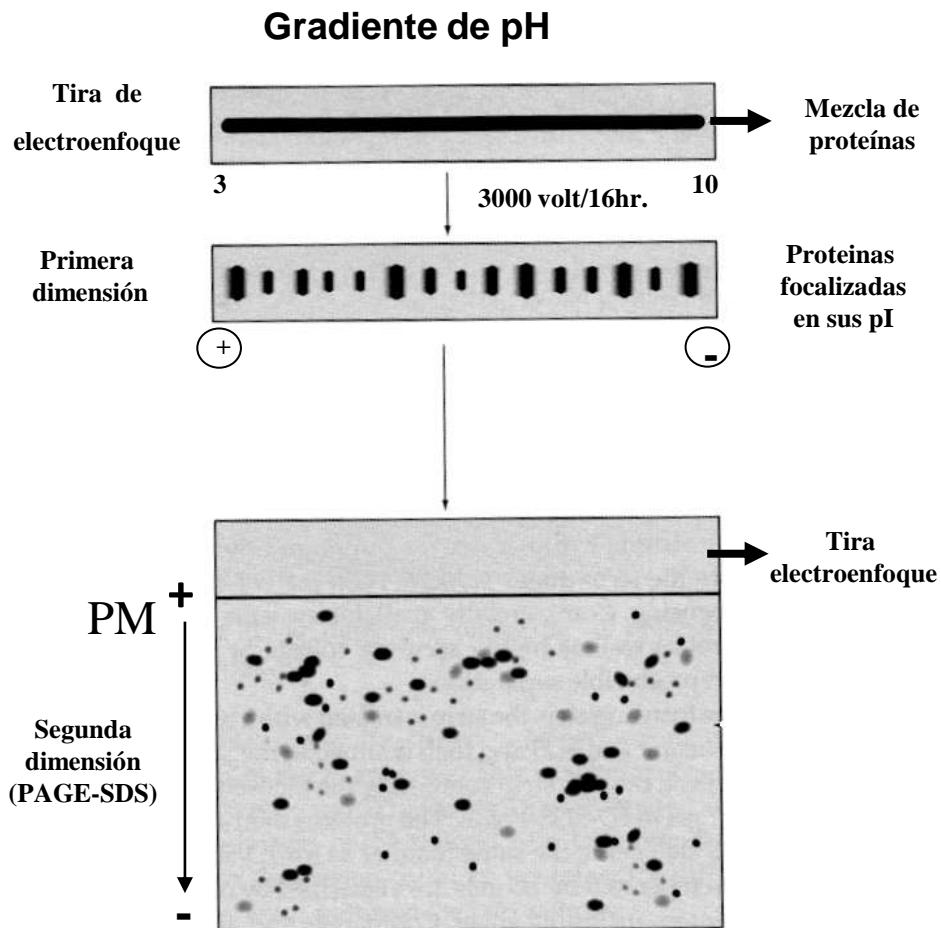
Proteínas

+
urea 8M,
CHAPS 2%,
TCEP 1%
anfolitos 0.2 %
azul de
bromofenol



IPGphor

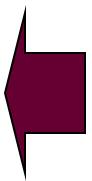
Carga de la segunda dimensión



70 bandas



**100
bandas**



pH

3

10

160

50

33

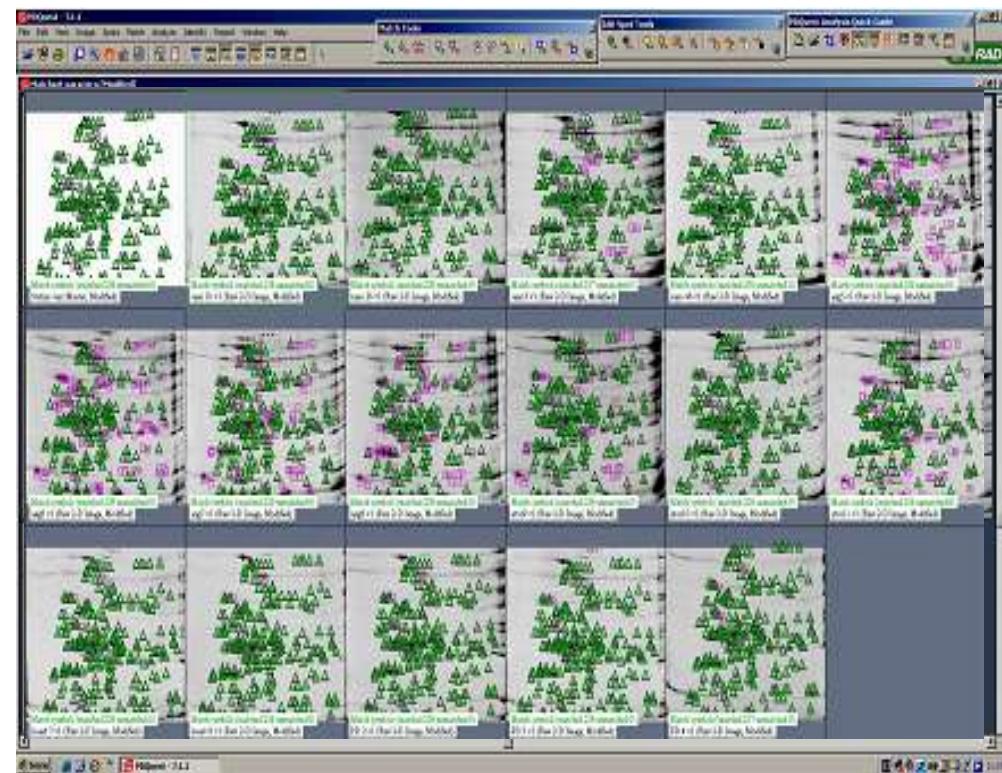
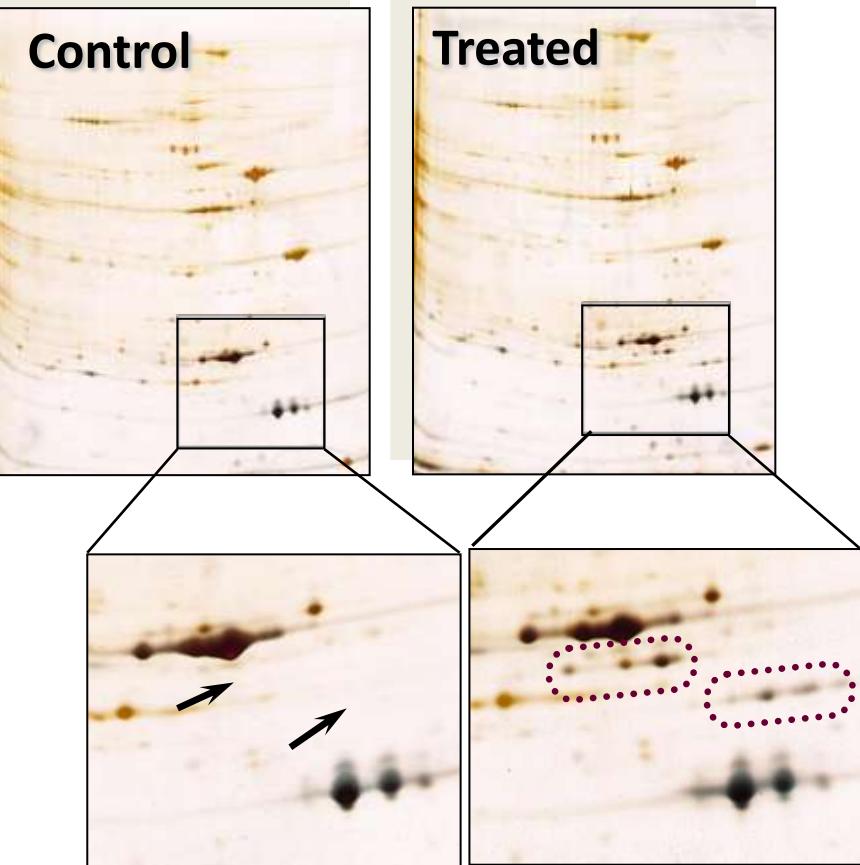
20

10

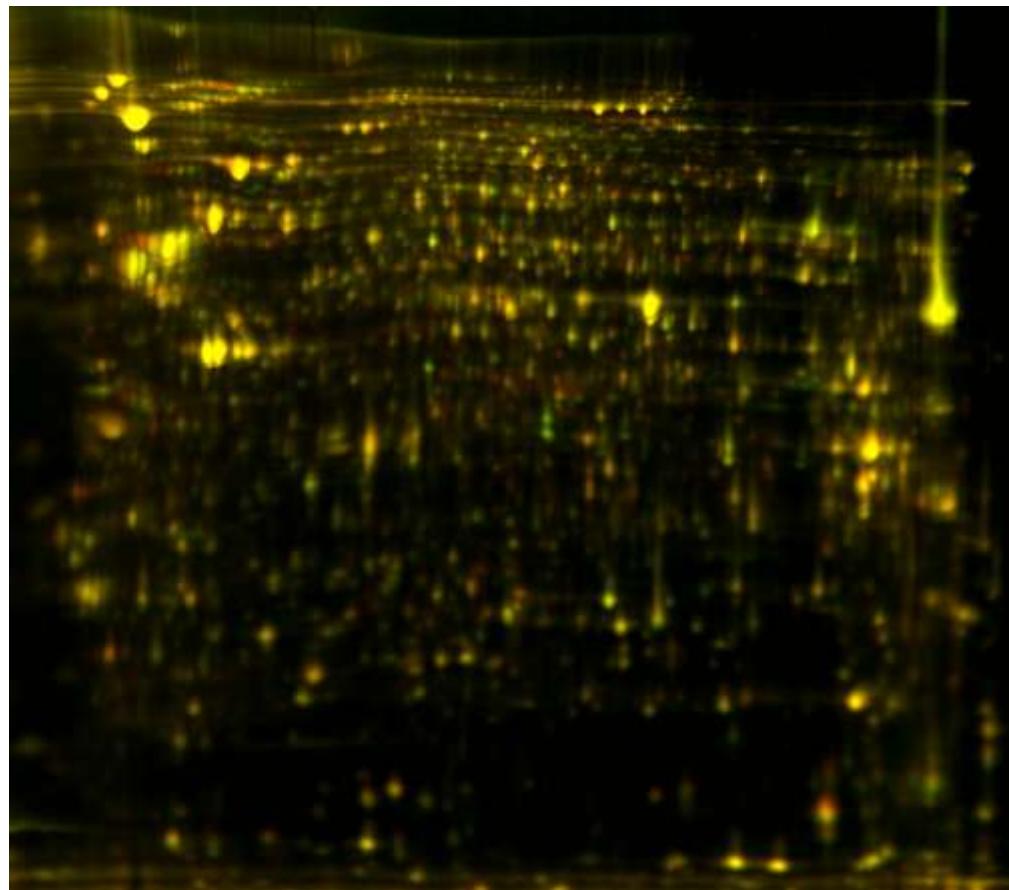
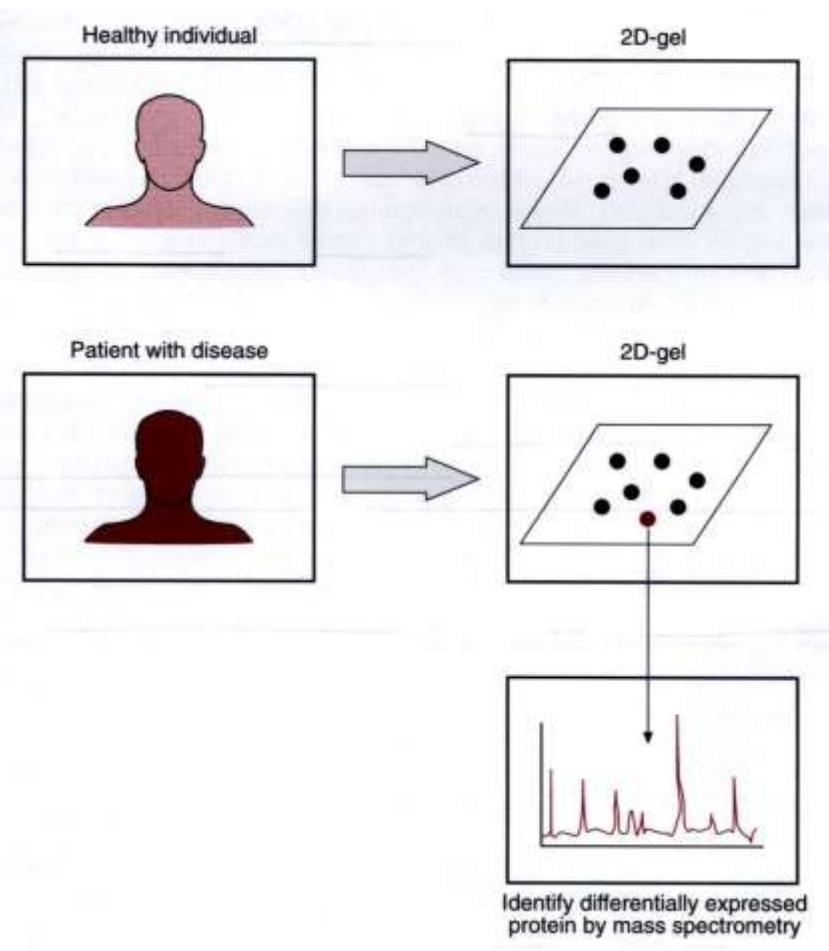
MW
(Kda)



Captura y análisis de imagen



DIGE: differential *in gel* electrophoresis

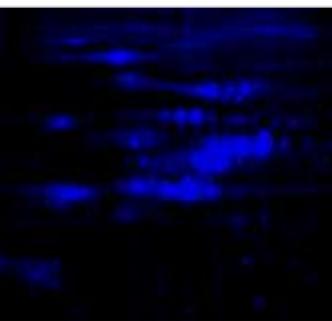


DIGE: differential *in gel* electrophoresis

25 mg A + 25 mg B



Cy2

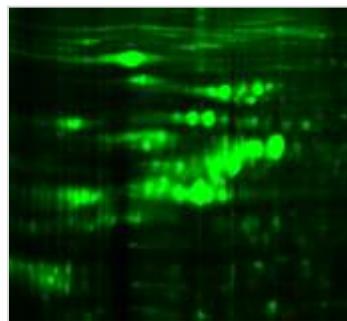


$\lambda = 488 \text{ nm}$

50 mg A



Cy3

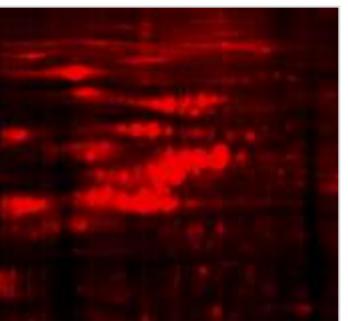


$\lambda = 532 \text{ nm}$

50 mg B



Cy5



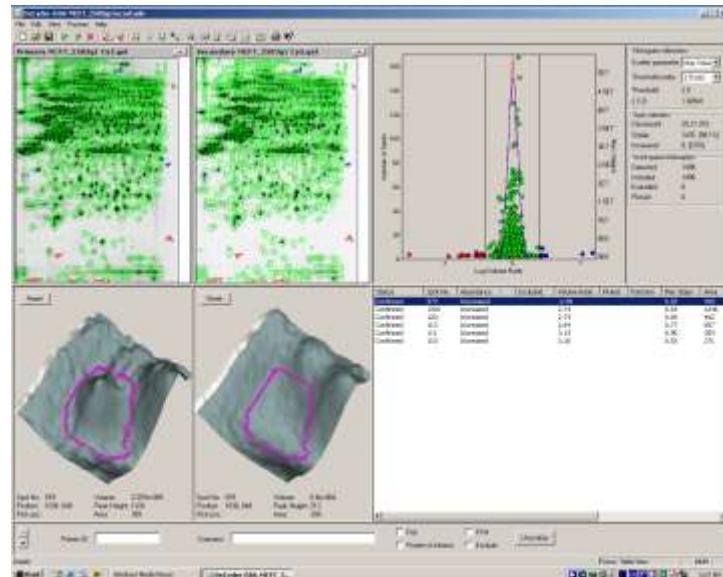
$\lambda = 633 \text{ nm}$

Protein ID
Peptide mass /
sequence analysis

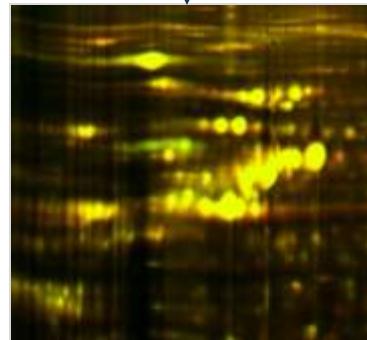
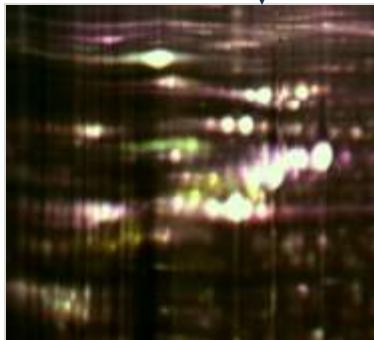
MALDI-ToF MS
MS/MS



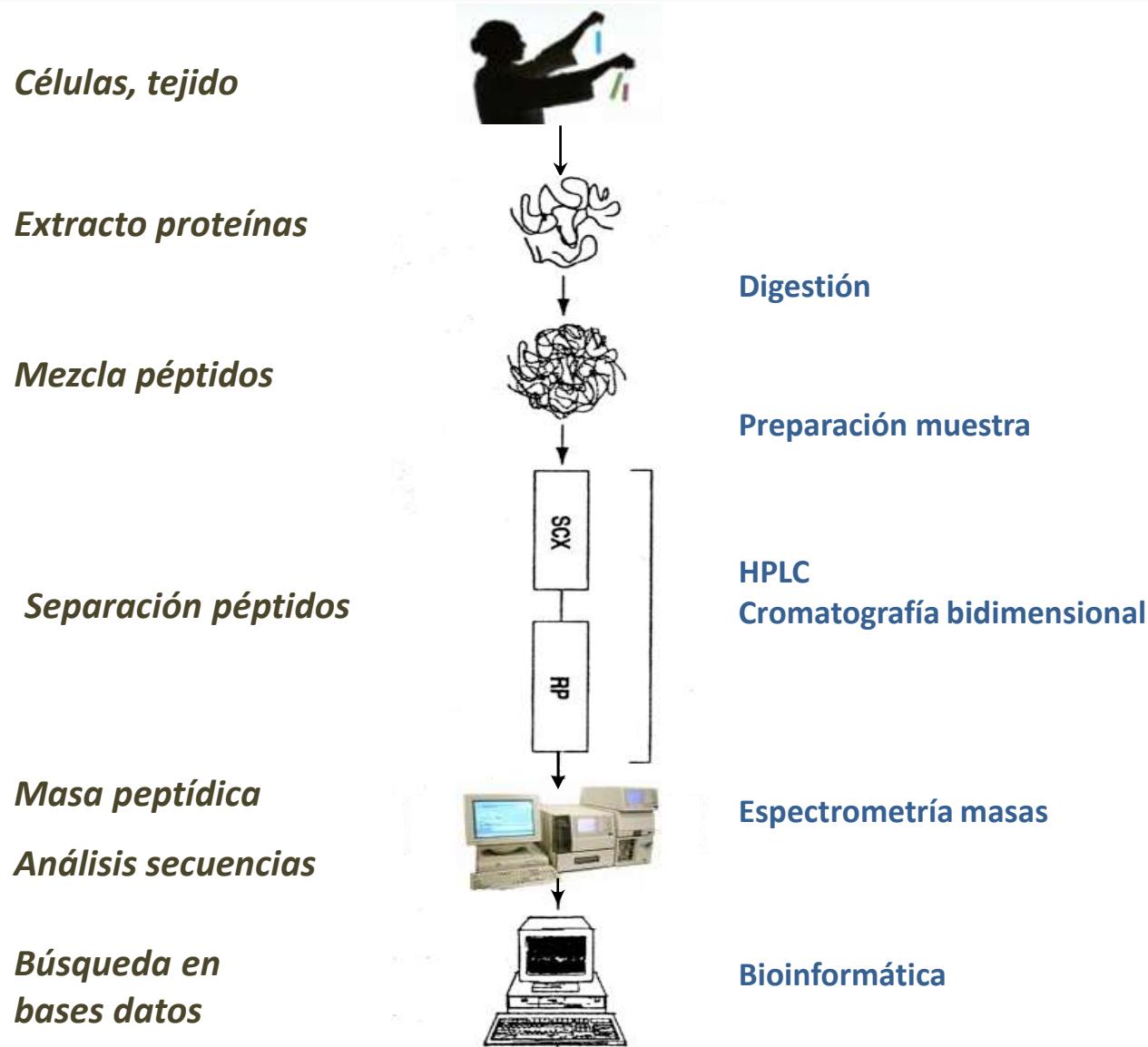
Selección de *spots* de interés



Análisis
informático



Espectrometría de masas e identificación de proteínas



Espectrometría de masas e identificación de proteínas

Picker

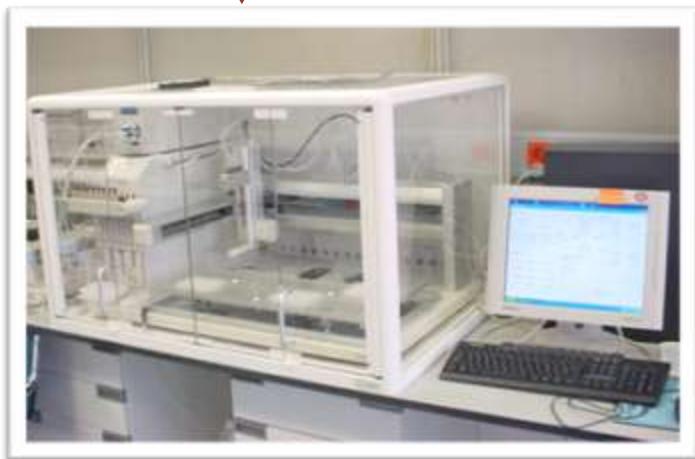


Recorta las proteínas de interés (seleccionadas mediante análisis informático de las imágenes 2-DE escaneadas) y las deposita en placas de 96 pocillos.

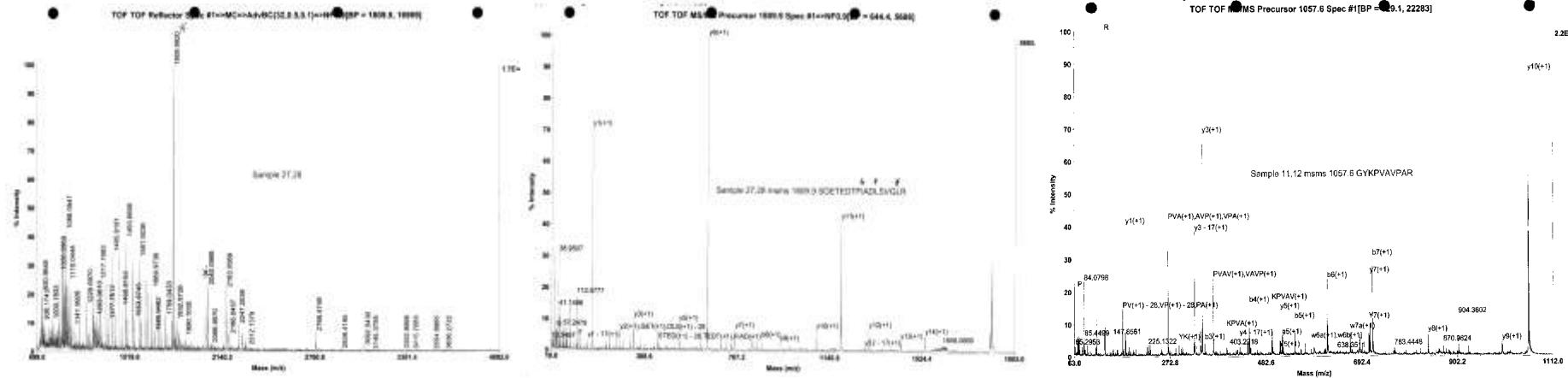
MALDI-ToF/ToF mass spectrometer



Digestor



Espectrometría de masas e identificación de proteínas

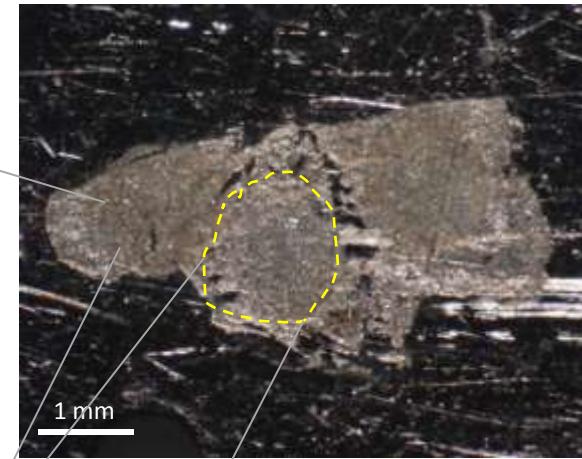
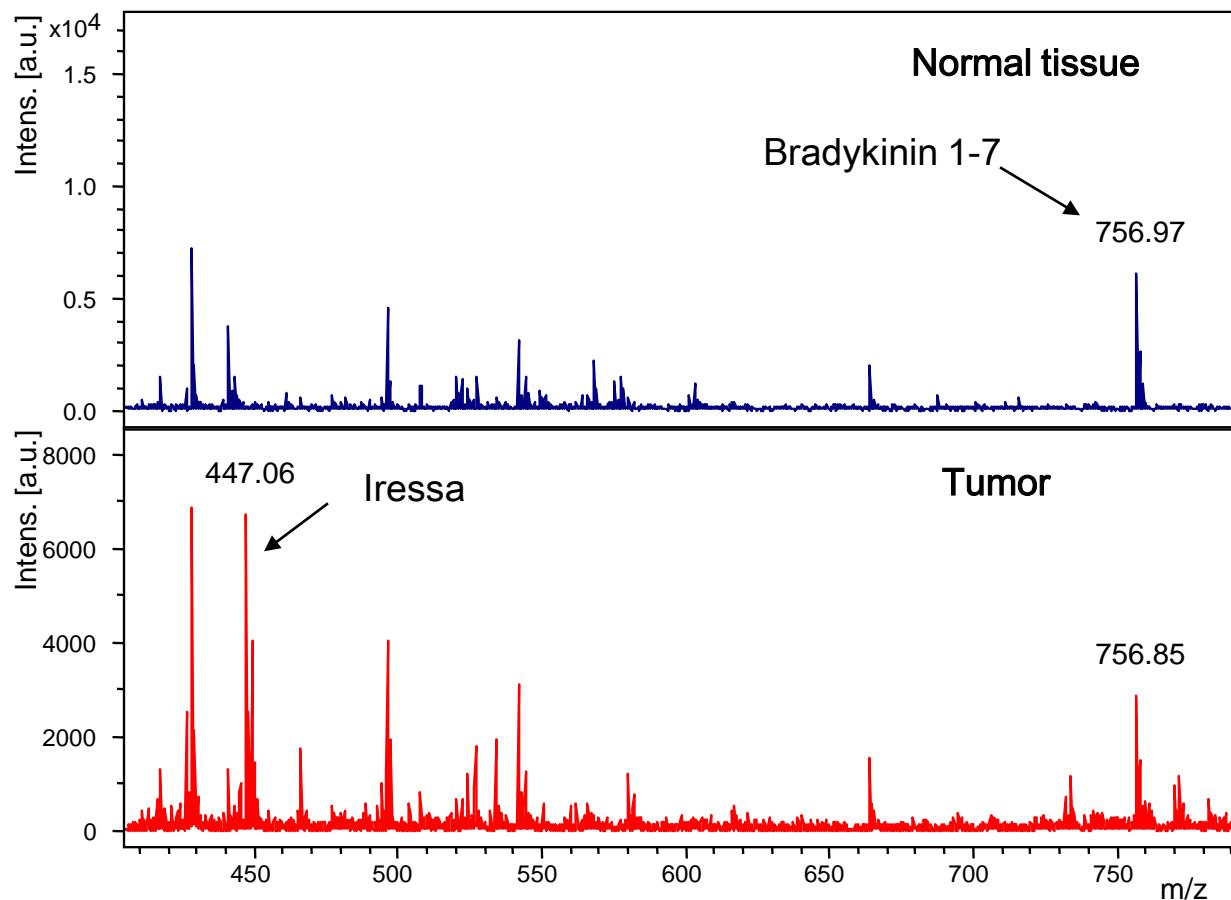


Direct Analysis of IRESSA in tissue by MALDI-MS

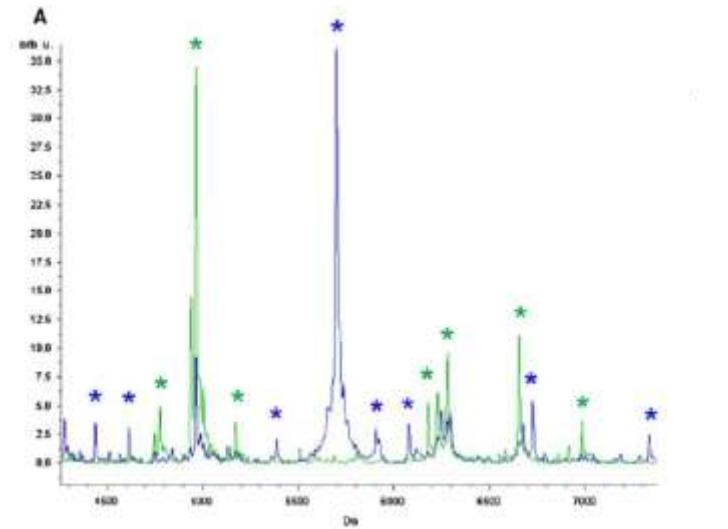
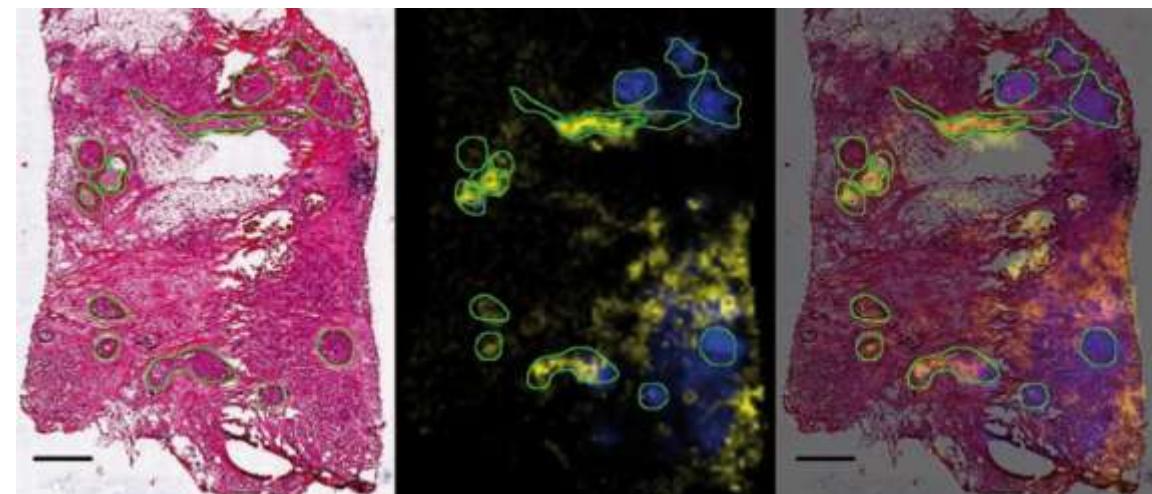
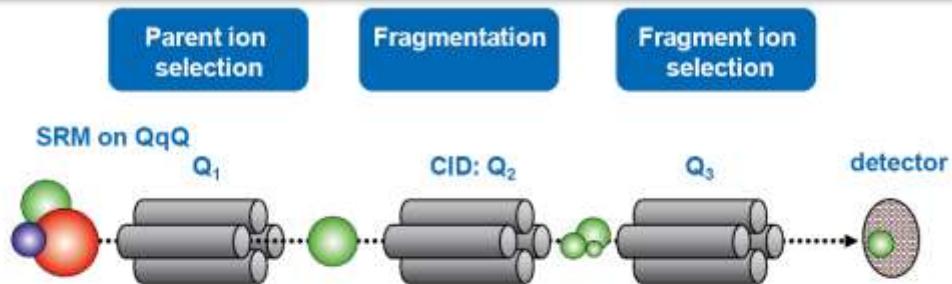
Breast cancer patient treated with Iressa

12 mm section frozen tissue

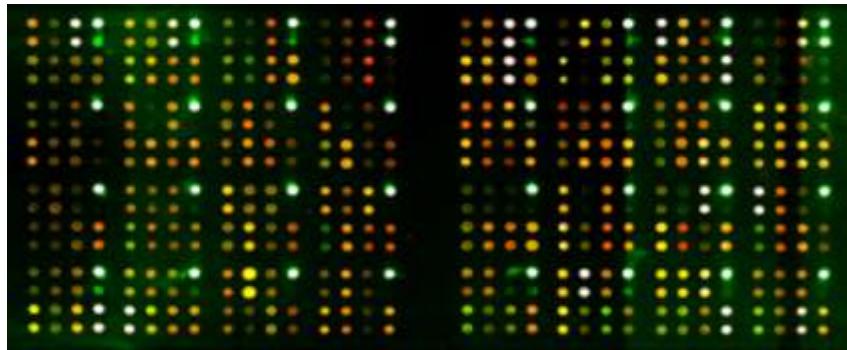
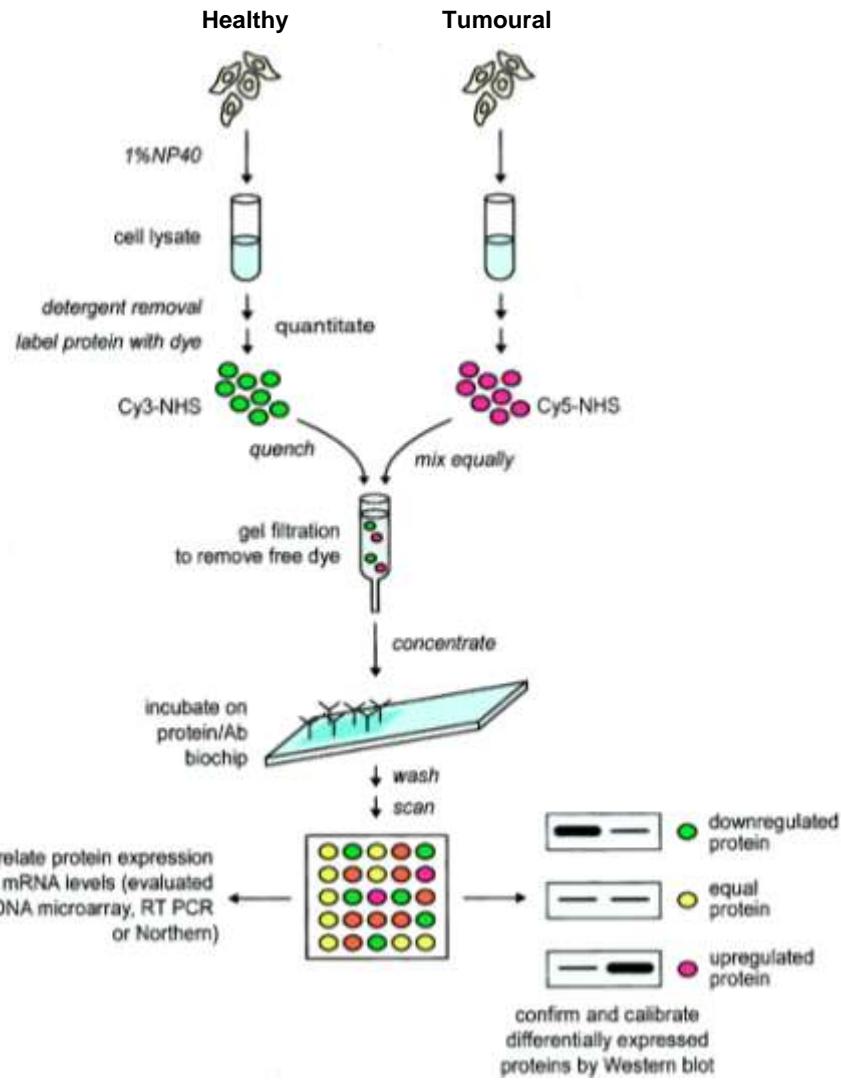
MALDI matrix: 0.25 mL sat. Soln. HCCA in 50% acetonitrile- 0.1% TFA
+ 0.1 pmol internal std. peptide (bradykinin 1-7)



MALDI Imaging

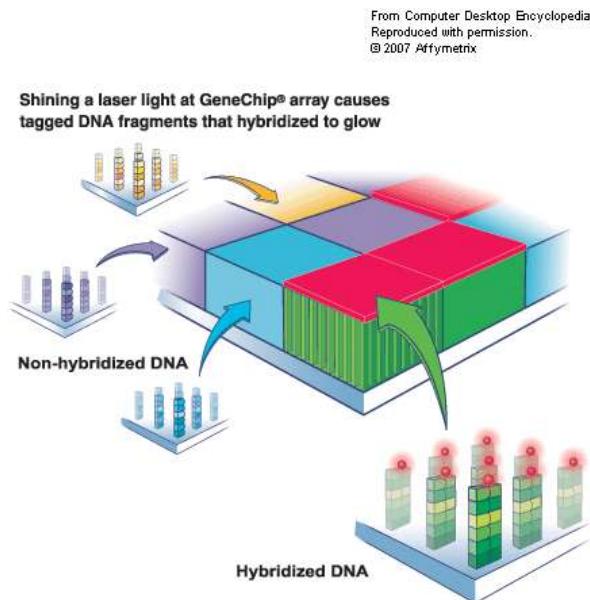
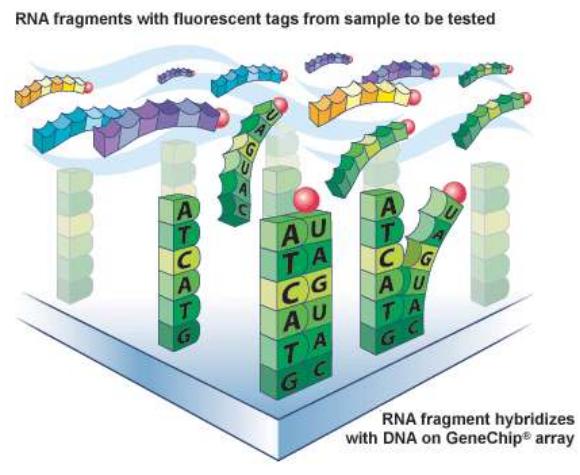
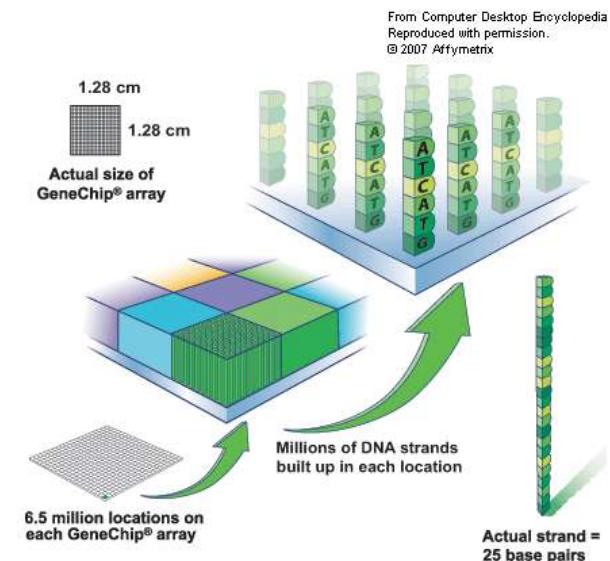
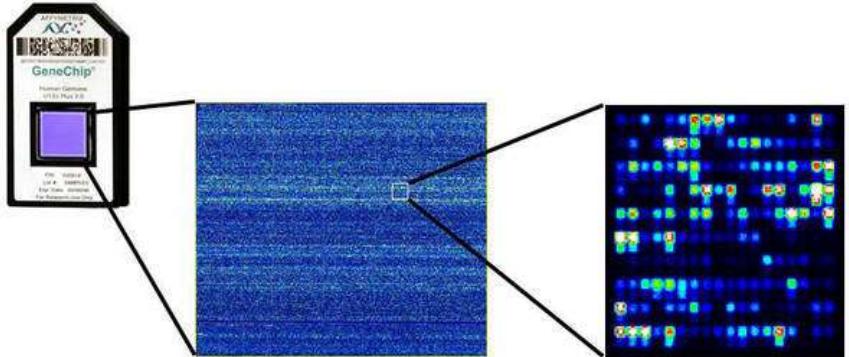


Perfiles proteómicos en muestras de tejido o celulares mediante *arrays* de proteínas



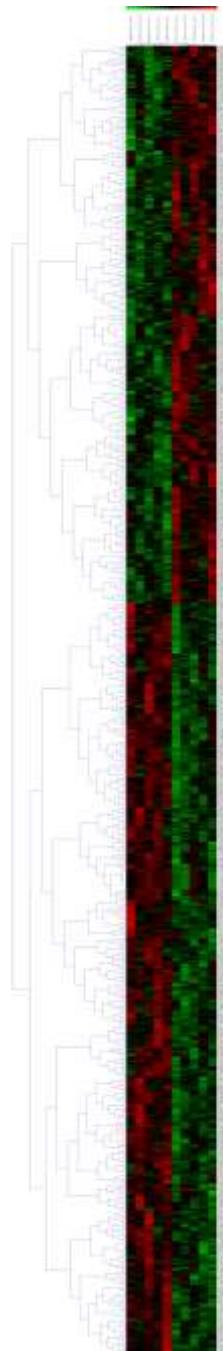
- Permite la detección de proteínas poco abundantes
- Disponibles de forma comercial o diseñadas por el usuario
- Identifica cientos de marcadores, en su formal total o activa (fosforilada)
- Permiten estudiar pathways de forma integral
- Compara muestras problema (tumor) con referencias (normal)

DNA microarrays

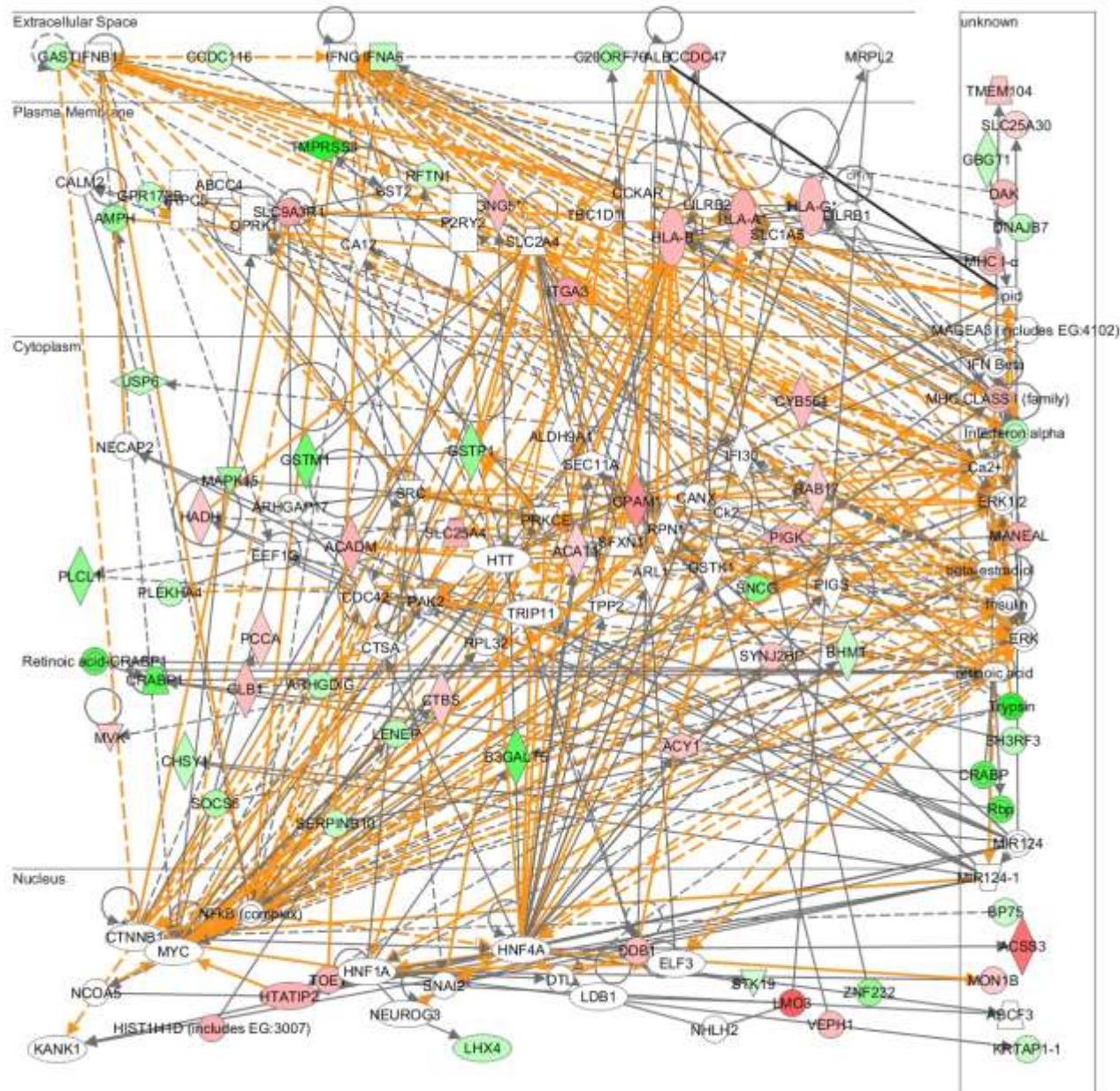


Guión

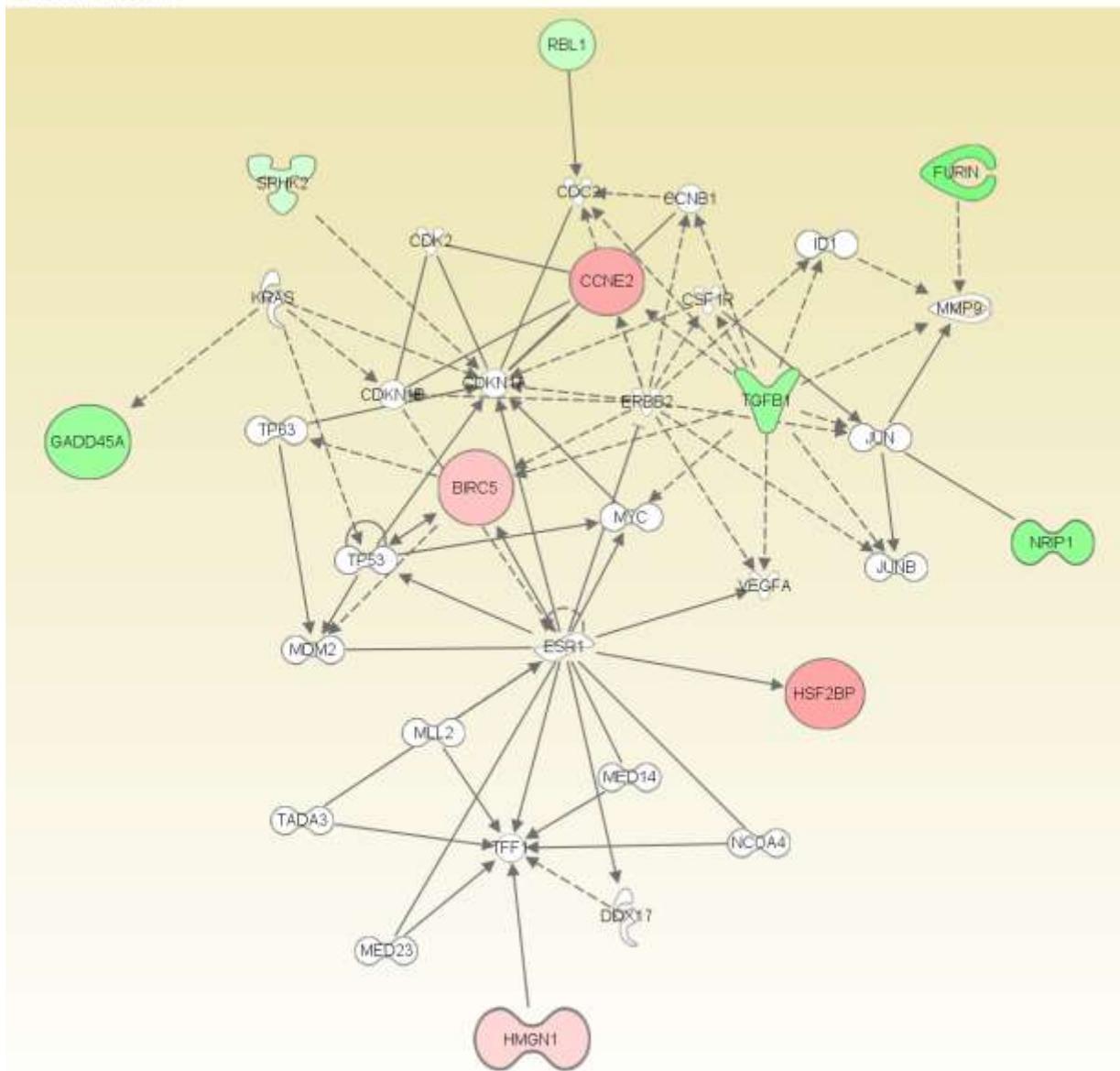
- Electroforesis: concepto y aplicaciones
- Técnicas moleculares complejas: perfiles de expresión de proteínas y de genes, identificación de dianas
- **Utilidad de las técnicas moleculares en el manejo del paciente con cáncer**



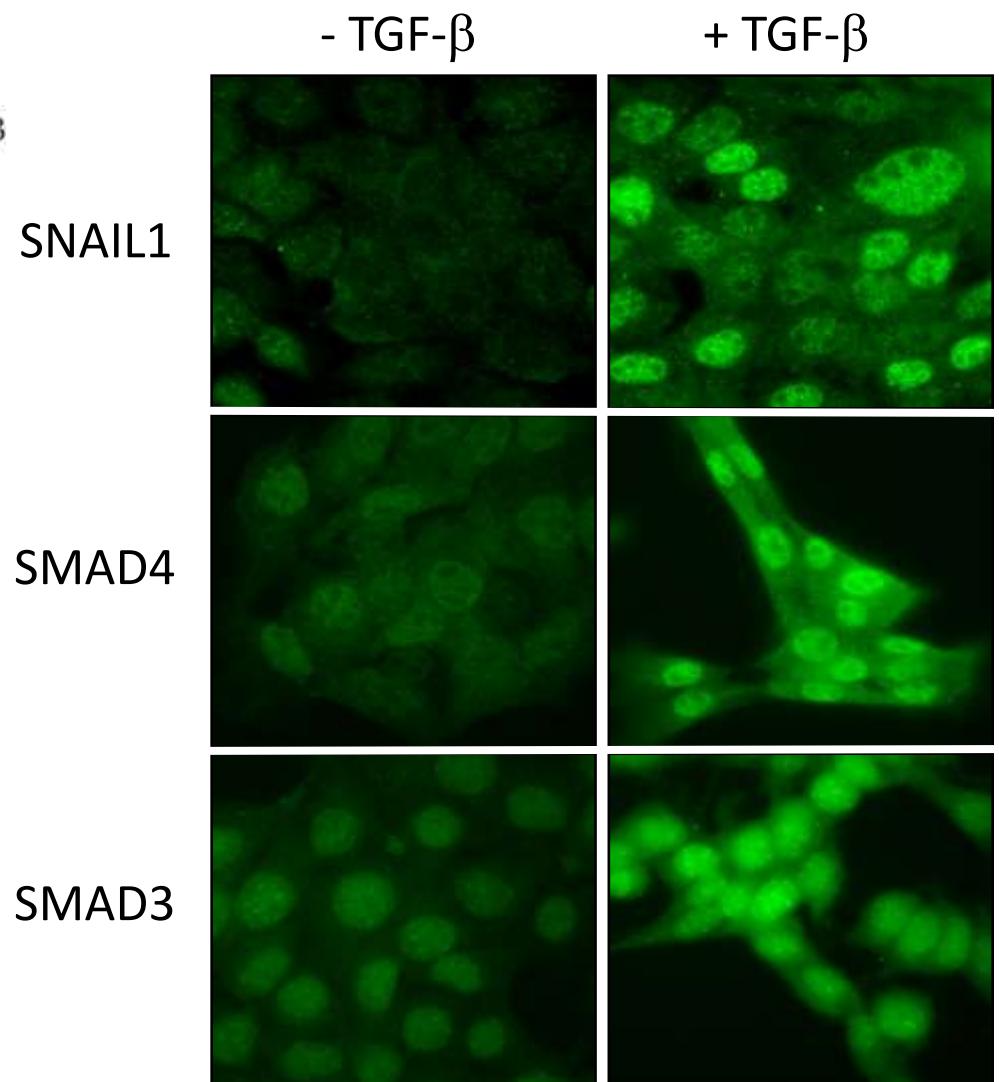
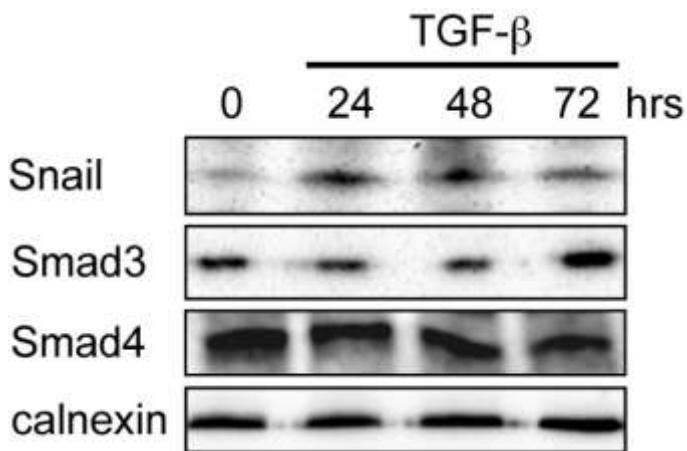
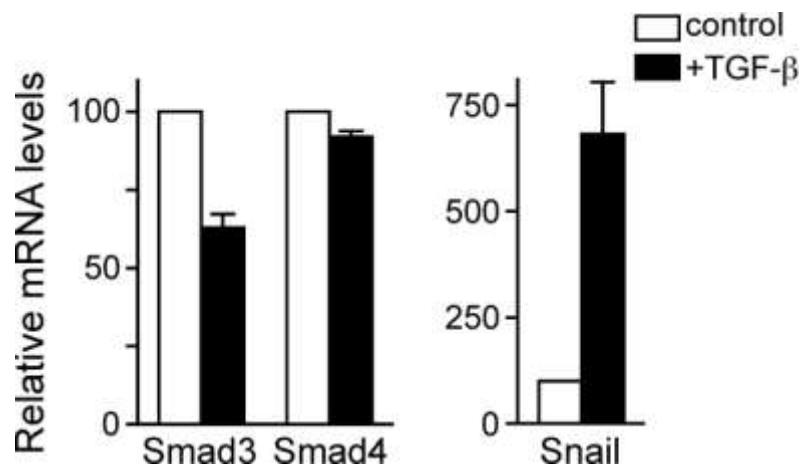
Networks 1,2,3,4 Merged 2



Path Designer Network 1

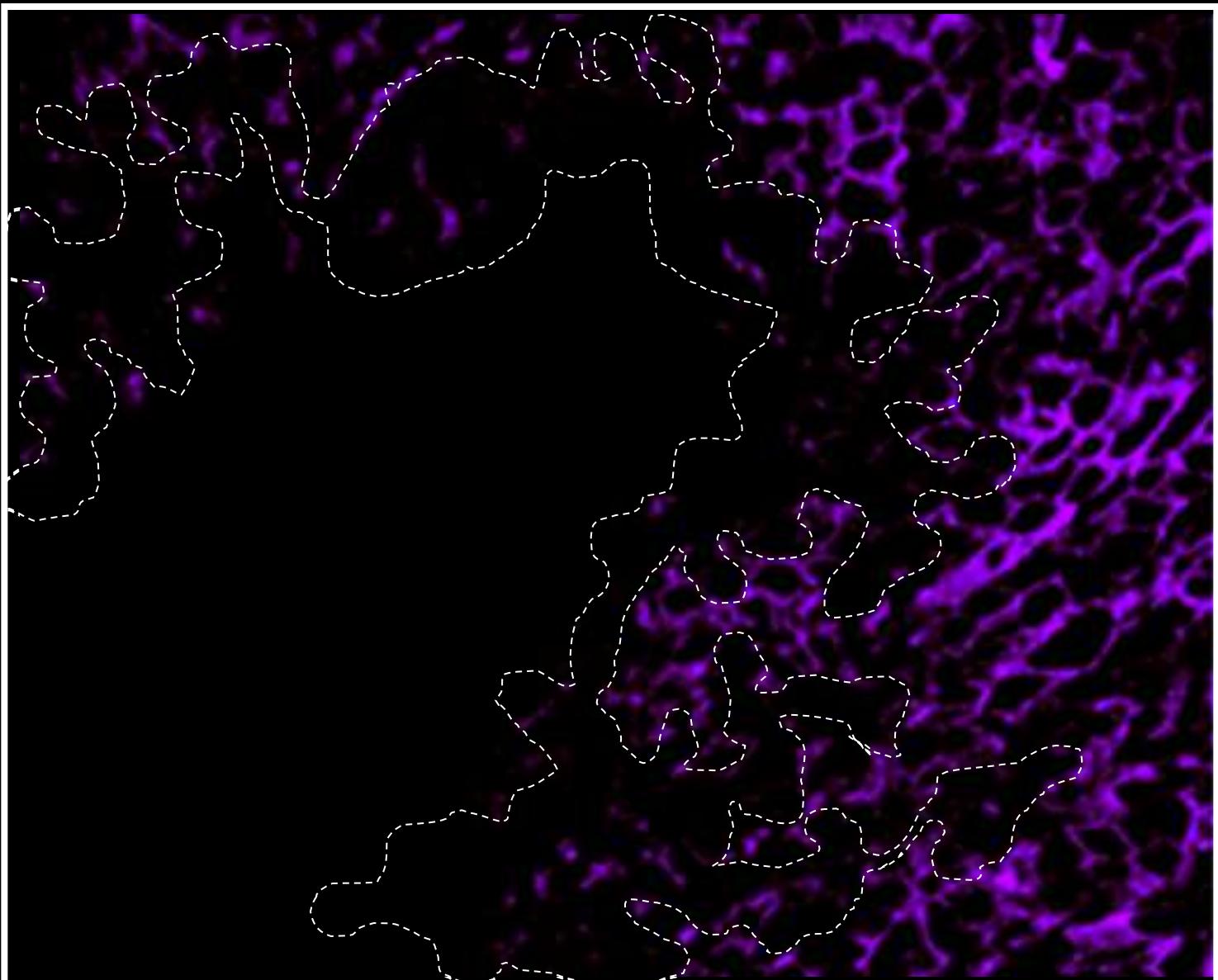


TGF- β effects on SNAIL1 and SMAD3/4



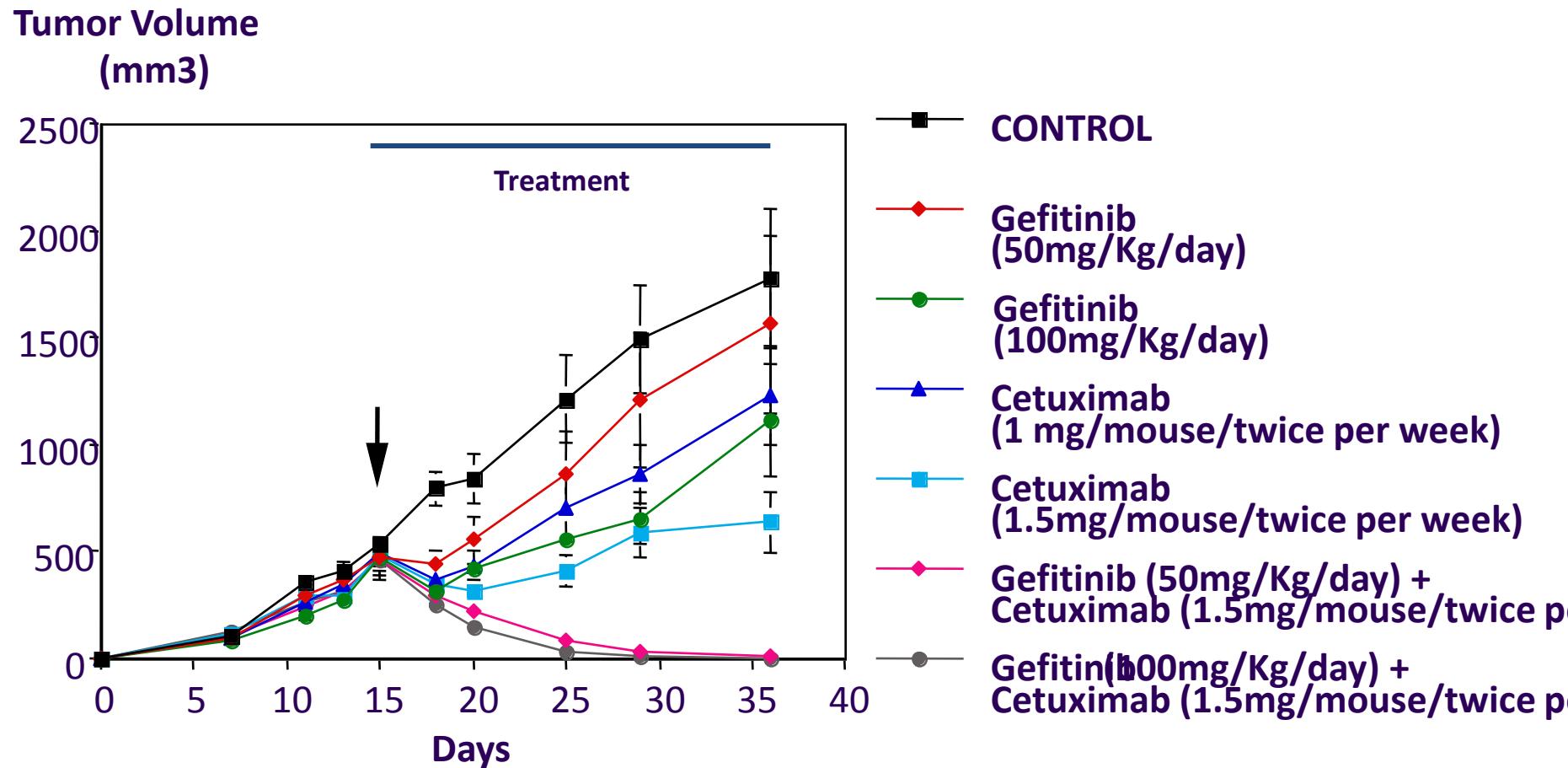
Loss of CAR correlates with co-expression of SNAIL1 and SMAD3/4 in human breast cancer

- SMAD3
- SNAIL1
- S3+SNAIL1
- CAR

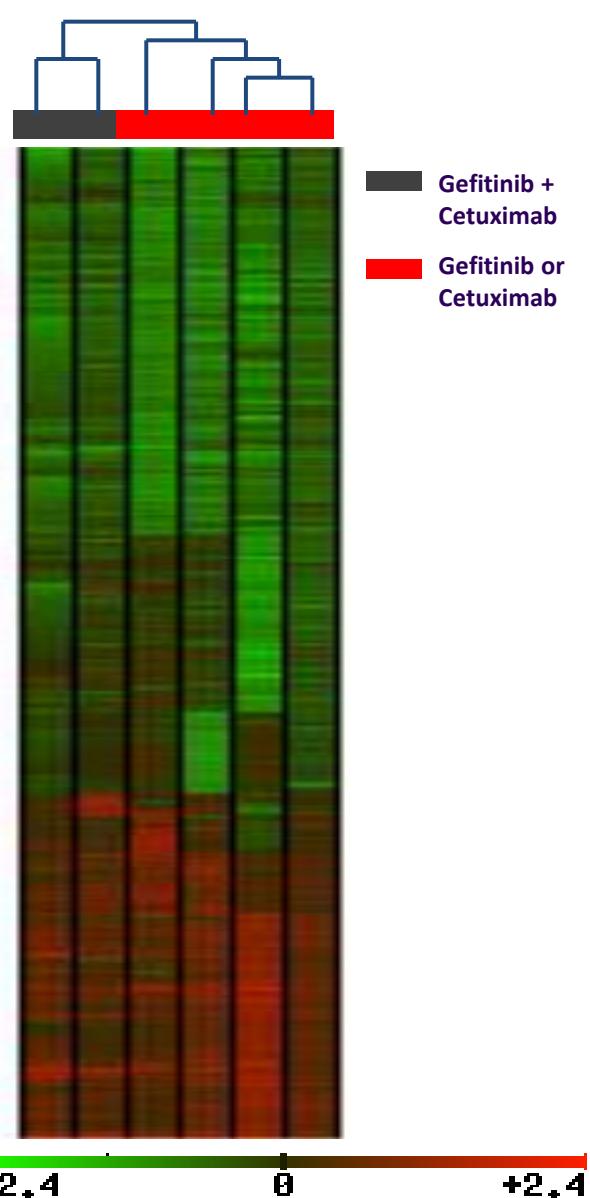


Combined anti-EGFR treatment with Gefitinib and Cetuximab

Rationale for combination



Genes are differentially regulated by Cetuximab and Gefitinib

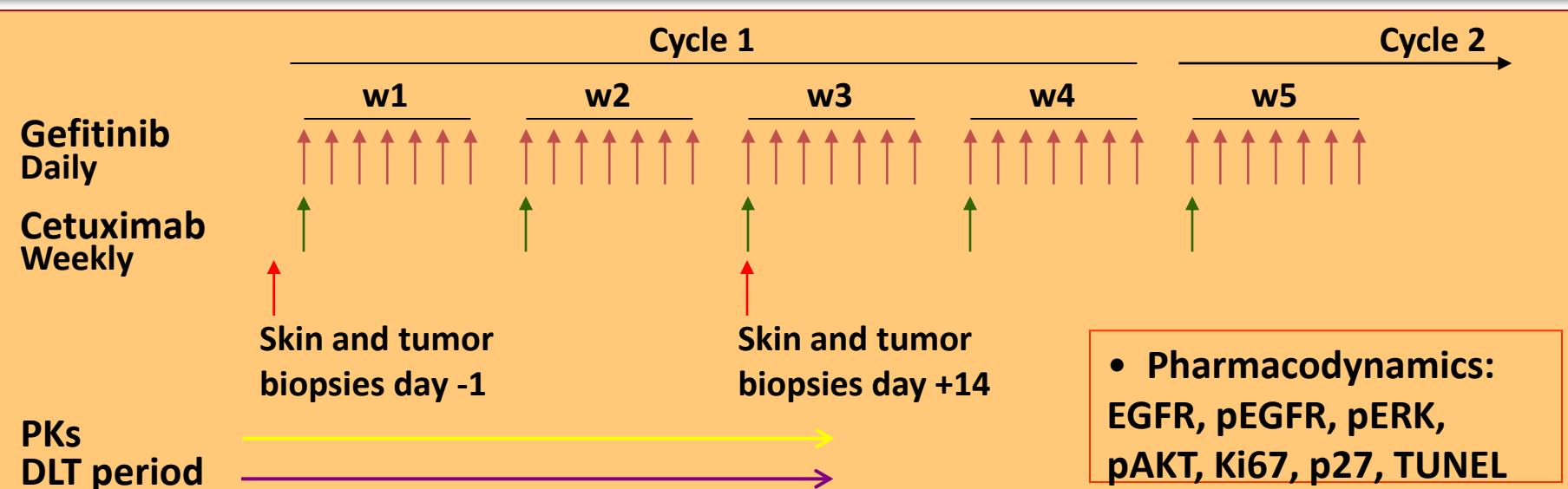


2.5873944	-1.3245479	HOXC10	-1.021543	-1.6514691	CDK7
2.4191496	-1.4567467	PRKR	1.0181852	1.64347556	GSTP1
1.7614335	-2.4474001	PSMC6	1.03921921	1.94632145	TLN1
1.7510861	1.26159601	PTPN6	1.55886933	2.06730321	COL4A1
-1.700843	-2.2365112	SMARCA5	2.24233216	9.62809248	ENG
1.6823758	-1.155286	ESTs	-2.0516007	1.25461959	ENO1
1.6777177	-2.1939034	OAT	-1.9158704	1.28676625	ZNFN1A1
1.6183235	-1.005038	ESTs	-1.7706143	1.28275887	MCM5
1.5930041	-2.9195581	DKFZP564O0463	-1.6888018	1.25353302	HOXD8
1.5664514	-2.4225056	CARD12	-1.4943313	1.22306409	IGHG3
1.5154539	-2.3173886	CRSP6	-1.4920025	1.39353574	EMS1
1.4842663	-1.9082497	TDG	-1.4763144	1.73688231	AMY
1.4770821	-2.6675217	NET1	-1.4414292	1.45296505	NTRK2
1.4474364	-2.4996914	RECQL	-1.4275092	1.28098182	JAK1
1.4282515	-1.9099038	TRAF3	-1.421831	1.35331717	CSF1
1.3858297	-2.2241437	CAPZA2	-1.4063932	1.25331582	SOX22
1.3206517	-2.4049385	PLAU	-1.3526138	1.50446443	PIK3CD
1.2792072	-1.6586391	E2F5	-1.3363056	1.54702874	HSPB2
1.2489797	-1.8858958	PSMD10	-1.0794153	1.57898777	ZNF212
1.2192551	-1.8298812	TP53BPL	1.03741994	-1.5572494	MFAP1
1.1746655	-1.8413323	ITM2B	1.19168257	-1.5669944	PPP1CC
1.0988542	-1.7120799	RRN3	1.84069424	-1.1381968	EIF4A2
1.0320408	-1.5642813	CLU			

Cetuximab + Gefitinib Phase I Study

Head&Neck, NSCLC, Colon EGFR +ve tumors

Sample Collection Timepoints



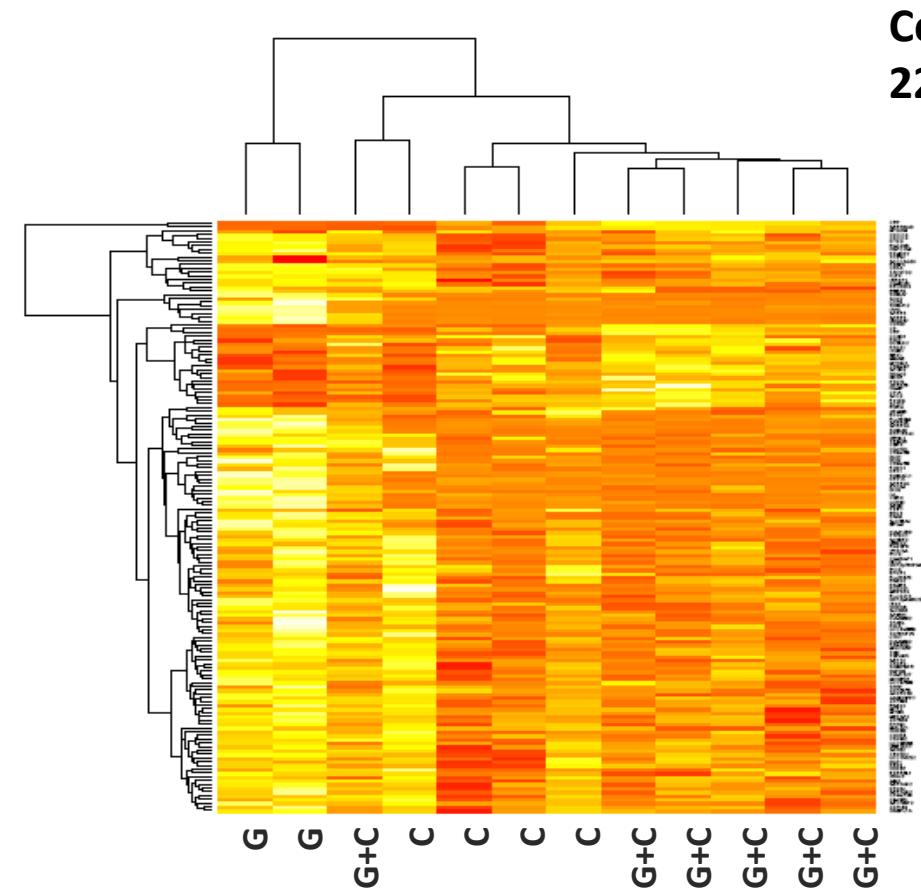
• Pharmacogenomics

Part B

Group	0a	0b	1	2a	2b	3	4	5	-1	RD
Daily Gefitinib (mg)	-	250	100	100	250	250	500	500	100	RD
Loading Cetuximab (mg/m ²)	400	-	320	400	320	400	320	400	250	RD
Weekly Cetuximab (mg/m ²)	250	-	200	250	200	250	200	250	160	RD
Patients planned	5	5	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6	20
Patients included	7	7	3	5	Not done	6	6	6	Not done	3+

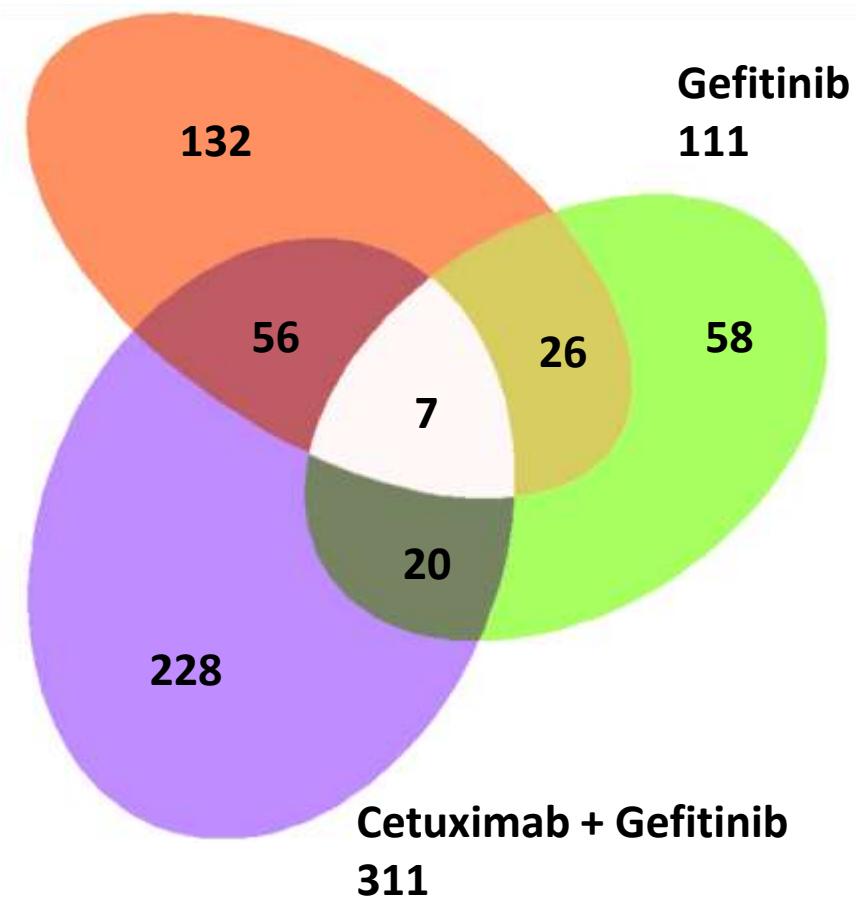
Cetuximab + Gefitinib Phase I Study

Differentially expressed genes between therapies

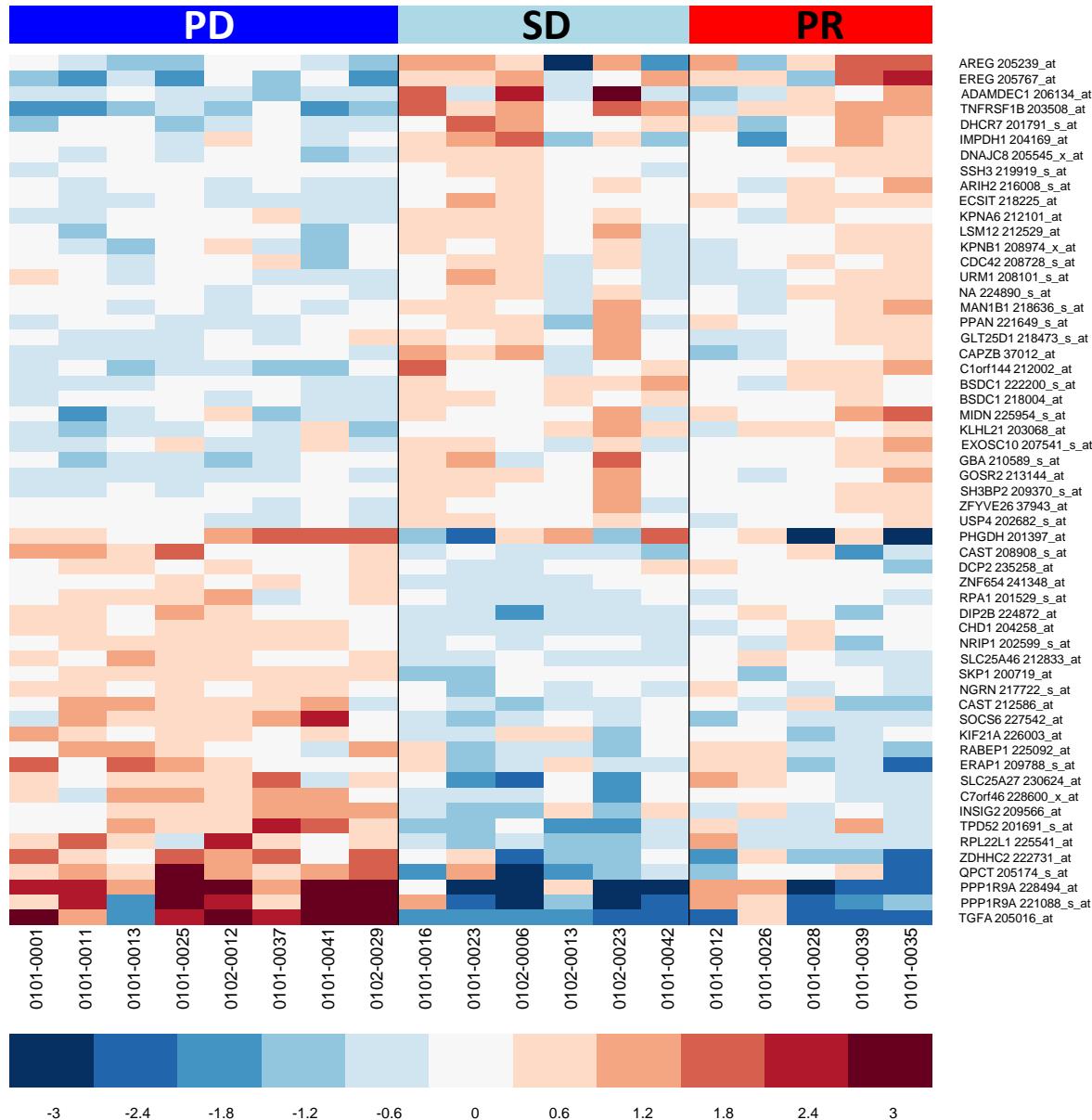


Cetuximab

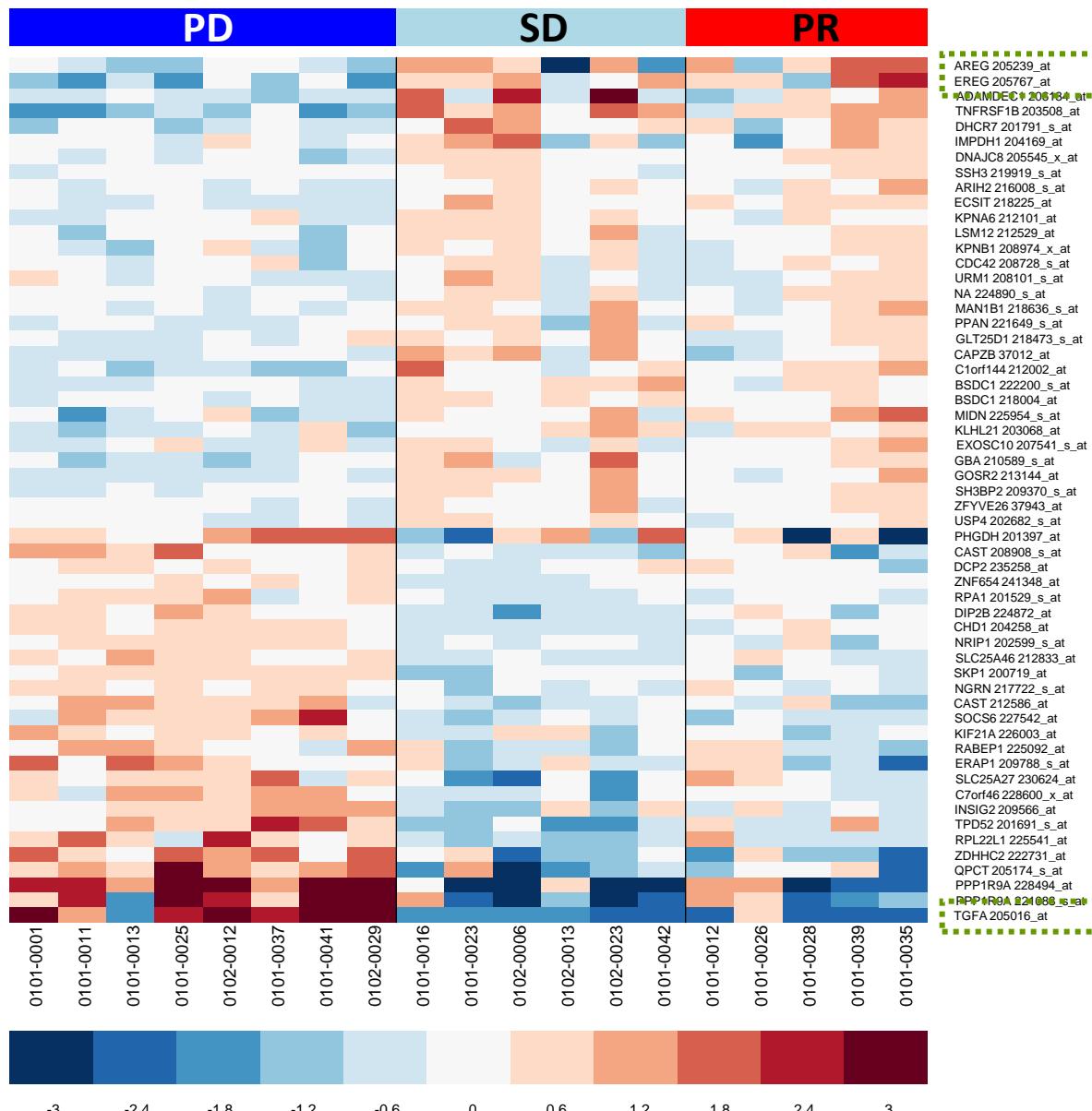
221



EMR 62202-045 study – Predictive biomarkers



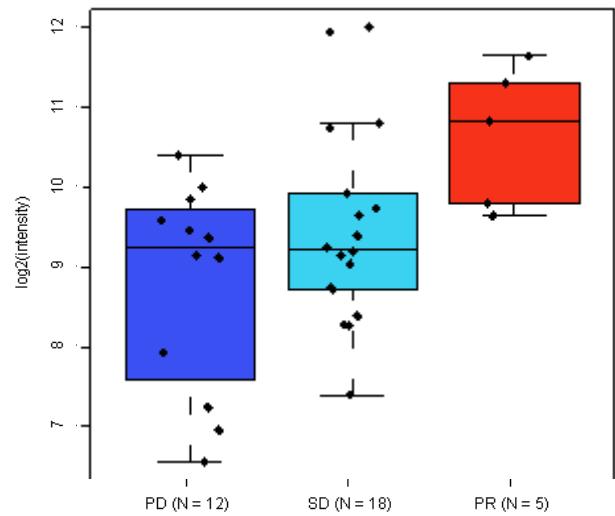
EMR 62202-045 study – Predictive biomarkers



EMR 62202-045 study – Predictive biomarkers

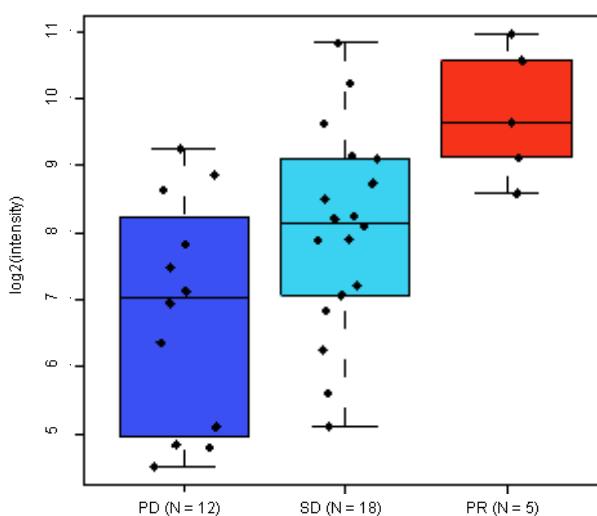
Panel A - *AREG* all patients

p = 0.068



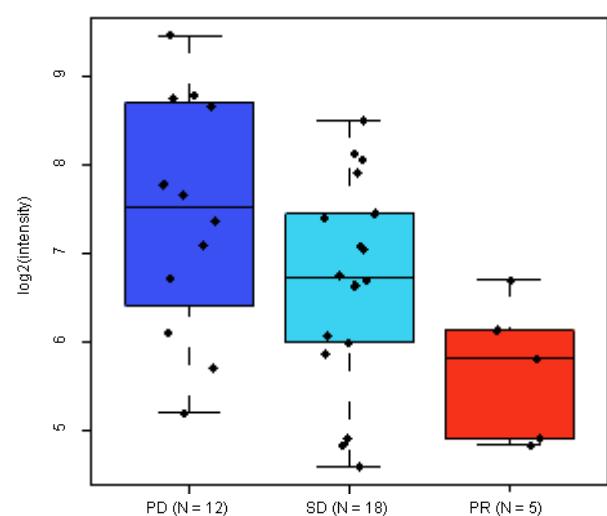
Panel C - *EREG* all patients

p = 0.011



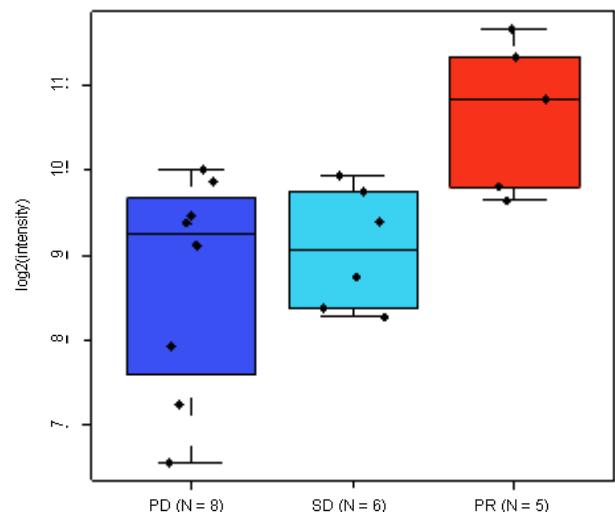
Panel E - *TGFA* all patients

p = 0.048



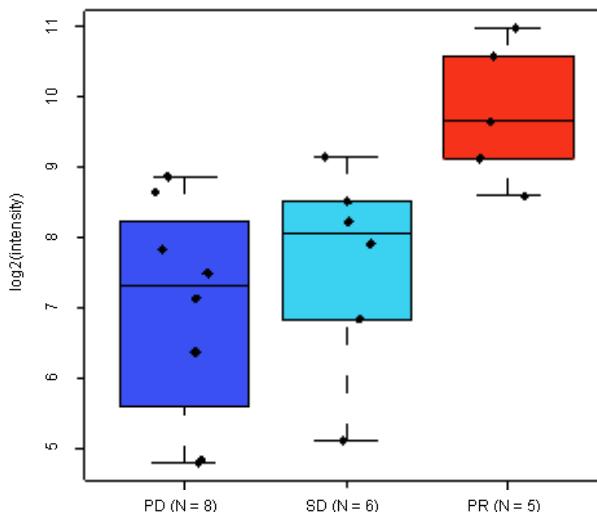
Panel B - *AREG*; KRAS wild-type

p = 0.13



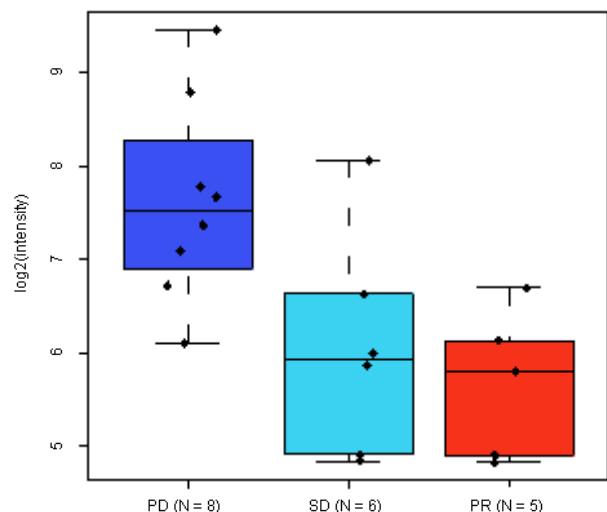
Panel D - *EREG*; KRAS wild-type

p = 0.099



Panel F - *TGFA*; KRAS wild-type

p = 0.0073



Conclusiones

- Disponemos de herramientas de biología molecular sencillas y de fácil interpretación
- Existen herramientas sofisticadas que permiten análisis complejos y altamente informativos
- La aplicabilidad de estas herramientas en el ámbito asistencial se está incrementando