

**CERCA DE GENS DE SUSCEPTIBILITAT
A LA DIABETIS DE TIPUS 2:**

DOR I AIB3

Hans Burghardt Coll

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL
Barcelona, 2005

**Programa de Doctorat de Biomedicina, Bienni 2000-2002, del
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de
Biologia de la Universitat de Barcelona**

**Memòria per a optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona**

Presentada per:

HANS BURGHARDT COLL

Vist i plau del director:

L'interessat,

Dr. Antonio Zorzano Olarte
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Hans Burghardt Coll

Índex de continguts

ÍNDEX DE CONTINGUTS	5
Llista d'abreviacions.....	10
INTRODUCCIÓ	13
L'estudi genètic de les malalties	15
L'estudi genètic de les malalties multifactorials	16
<i>A la caça dels gens responsables de malalties: Estudis de lligament i d'associació genètica.....</i>	<i>17</i>
<i>Lligament i desequilibri de lligament</i>	<i>18</i>
<i>Estudis de lligament genètic</i>	<i>21</i>
<i>Estudis d'associació genètica.....</i>	<i>22</i>
<i>Aspectes a considerar en el disseny d'un estudi d'associació genètica</i>	<i>24</i>
L'exemple de la diabetis mellitus de tipus 2	25
<i>Regulació del metabolisme de la glucosa.....</i>	<i>26</i>
<i>Hormones reguladores de l'homeòstasi glucídica. Secreció d'insulina</i>	<i>26</i>
<i>Efectes de la insulina</i>	<i>26</i>
<i>Desregulació de l'homeòstasi de la glucosa i progrés a DM-2</i>	<i>27</i>
<i>Factors de risc al desenvolupament de la DM-2.....</i>	<i>28</i>
<i>Factors genètics.....</i>	<i>28</i>
<i>Factors ambientals i estil de vida.....</i>	<i>29</i>
<i>Edat</i>	<i>29</i>
<i>Obesitat</i>	<i>30</i>
<i>Resistència a la insulina.....</i>	<i>30</i>
Un segon exemple de malaltia multifactorial: l'osteoporosi	30
<i>Estudis genètics.....</i>	<i>31</i>
<i>Resultats dels estudis genètics</i>	<i>32</i>
<i>Altres gens candidats</i>	<i>33</i>
El coactivador AIB3.....	33
<i>AIB3 és un coactivador transcripcional amplificat en càncers.....</i>	<i>34</i>
<i>Organització de la proteïna AIB3.....</i>	<i>35</i>
<i>Localització i funcions del gen AIB3</i>	<i>36</i>
<i>Estudis en models cel·lulars i animals.....</i>	<i>37</i>
OBJECTIUS.....	39
RESULTATS.....	43
1. Estudis d'associació genètica dels gens DOR i AIB3	45

1.1. Caracterització de la regió estudiada i selecció dels grups	45
1.1.1. Selecció i avaluació de polimorfismes per a l'estudi d'associació dels gens DOR i AIB3	45
1.1.2. Grups genotipats en els estudis d'associació genètica	49
1.2. Resultats dels estudis d'associació genètica amb diabetis de tipus 2 i amb obesitat	50
1.2.1. Distribució de freqüències.....	50
Polimorfisme DOR5.....	50
Polimorfisme DOR1.....	51
Polimorfisme AIB6	52
Polimorfisme AIB1	54
Polimorfisme AIB7	56
2. Anàlisi de l'expressió dels gens DOR i AIB3	57
2.1.1. Quantificació relativa dels gens DOR i AIB3 en mostres humanes de múscul esquelètic i teixit adipós blanc.....	57
Expressió relativa de DOR en múscul esquelètic humà.....	57
Expressió relativa de DOR en teixit adipós blanc humà	61
Expressió relativa d'AIB3 en múscul esquelètic humà.....	62
2.1.2. Quantificació relativa dels gens DOR i AIB3 en mostres humanes de múscul esquelètic ('mostres de Suècia')	64
2.1.3. Quantificació relativa de l'expressió del gen AIB3 en diferents models animals.....	65
3. Generació d'un vector de reemplaçament del gen DOR	67
3.1.1. Seqüenciació del gen DOR en ratolí	67
3.1.2. Disseny del vector de reemplaçament.....	71
3.1.3. Obtenció dels animals knock-out	74
DISCUSSIÓ	75
Associació genètica de la regió que conté els gens DOR i AIB3 amb patologies humanes	77
<i>Estudi de la regió que conté els gens DOR i AIB3.....</i>	77
<i>Resultats dels estudis d'associació genètica</i>	78
Anàlisi de l'expressió dels gens DOR i AIB3	80
CONCLUSIONS.....	83
MATERIAL I MÈTODES	87
Contingut de Material i mètodes.....	89
I. Mostres biològiques	93
II. Eines informàtiques i estadística.....	99

III. Tècniques generals d'obtenció i manipulació d'àcids nucleics	105
IV. Tècniques específiques d'obtenció i manipulació d'àcids nucleics	109
V. Tècniques generals d'amplificació i detecció d'àcids nucleics	121
VI. Tècniques específiques d'amplificació i detecció d'àcids nucleics	131
VII. Tècniques generals de cultius cel·lulars	141
VIII. Tècniques específiques de cultius cel·lulars	151
RESULTATS SUPLEMENTARIS	153
Continguts.....	155
REFERÈNCIES	159

Llista d'abreviacions

- ABCC8: *ATP binding cassette C8*. Equivalent de SUR1.
- AGA: *Appropriate for gestational age*.
- AIB3: *Amplified in breast cancer 3*. Equivalent de PRIP, RAP250, ASC-2, TRBP, i NRC.
- AIRG: *Acute insulin response to glucose*.
- ApoE: *Apolipoproteïna E*.
- AR: *Androgen receptor*.
- ARP: *Acidic ribosomal protein*.
- ASC-2: *Activating signal cointegrator-2*. Equivalent d'AIB3, PRIP, RAP250, TRBP, i NRC.
- ATF-2: *Activating transcription factor 2*.
- C/EBP α : *CCAAT enhancer binding protein α* .
- CAPN10: *Calpaina 10*.
- CAR: *Constitutive androstane receptor*.
- CBP: *cAMP response element binding protein (CREB) binding protein*.
- c-Fos: *v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*.
- c-Jun: *v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog*.
- cM: *Centimorgan*.
- COLIA1: *Col·lagen de tipus I α 1*.
- COLIA2: *Col·lagen de tipus I α 2*.
- CREB: *cAMP-reponse element-binding protein*.
- DI: *Deposition index*.
- DM-2: *Diabetis mellitus de tipus 2*.
- DN1: *Dominant negatiu 1*. Es refereix a un dominant negatiu del gen AIB3.
- DN2: *Dominant negatiu 2*. Es refereix a un dominant negatiu del gen AIB3.
- DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase*.
- DOR: *Diabetis and obesity regulated*.
- Dpc: *Dies post coitum*.
- DRIP: *Vitamin D Receptor interacting proteins*.
- E2F-1: *Elongation 2 factor- 1*.
- ER: *Estrogen receptor*.
- GR: *Glucocorticoid receptor*.
- HNF-1 α : *Hepatocyte nuclear factor 1 α* .
- HNF-4 α : *Hepatocyte nuclear factor 4 α* .
- HOMA: *Homeostasis model assessment of insulin resistance (IR) and beta cell function (β -cell)*.
- htSNP: *Haplotype tagging SNP*.
- ÍCC: *Índex cintura-cadera*.
- IGT: *Impaired glucose tolerance*.

IL-6: Interleuquina 6.

ÍMC: Índex de massa corporal.

IRS: Insulin receptor substrate.

KCNJ11: Potassium channel inwardly rectifying, subfamily J, member 11. Equivalent de Kir6.2.

Kir6.2: Potassium channel inwardly rectifying 6.2. Equivalent de KCNJ11.

KO: Knock out.

LXR: Liver X Receptor.

ME: Múscul esquelètic.

NFκβ: Nuclear Factor κβ.

NR: Nuclear receptor.

NRC: Nuclear receptor co-activator/co-regulator. Equivalent d'AIB3, PRIP, RAP250, ASC-2, i TRBP.

OR: Odds ratio.

pb: parells de bases.

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor.

PRIP: PPAR interacting protein. Equivalent d'AIB3, RAP250, ASC-2, TRBP, i NRC.

PTH: Parathyroid hormone.

QTL: Quantitative trait locus.

RAP250: 250 kD receptor associated protein. Equivalent d'AIB3, PRIP, ASC-2, TRBP, i NRC.

RAR: Retinoic acid receptor.

Rb: Retinoblastoma.

RCI: Retràs del creixement intrauterí. Equivalent a SGA.

RFLP: Restriction fragment lenght polymorphism.

SBP/DBP: Systolic and diastric blood pressure.

SDS: Age- and sex-adjusted standard development score.

S_G: Efectivitat de la glucosa.

SGA: Small for gestational age. Equivalent a RCI.

S_I: Sensibilitat a la insulina.

siRNA: Small interfering RNA.

SNP: Single nucleotide polymorphism.

SRF: Serum response factor.

STZ: Estreptozotocina.

SUR1: Sulphonylurea receptor 1. Equivalent de ABCC8.

TAB: Teixit adipós blanc.

TGF-β1: Transforming growth factor -β1.

TR: Thyroid hormone receptor.

TRAP: Thyroid receptor- associated protein.

TRBP: Thyroid receptor binding protein. Equivalent d'AIB3, PRIP, RAP250, ASC-2, i NRC.

TTGO: Test de tolerància a la glucosa oral.

VDR: Vitamin D receptor.

Llista d'abreviacions

WPRE: *Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulator element*.

Z: *lod score*.

$\Delta G_{30'}$: delta glucosa a 30'.

$\Delta I_{30'}$: delta insulina a 30'.

' : minuts

Introducció

L'estudi genètic de les malalties

El redescubriment l'any 1900 de les lleis de l'herència de Mendel (publicades 35 anys abans) va marcar l'inici d'una nova època en l'estudi dels caràcters biològics hereditaris. Fins el moment es desconeixien les lleis que regien l'herència, i es considerava que les característiques heretades provenien d'una mescla dels caràcters dels progenitors (model de mescla). L'aparició de les lleis de Mendel posà punt i final a aquestes teories al demostrar inequívocament que no existia tal mescla, i que de fet existia una unitat hereditària (el gen), que s'heretava seguint unes lleis clares: Havia nascut la genètica.

L'impacte del redescubriment va ser enorme i avui la genètica juga un paper clau en la biologia i la medicina. Les lleis de Mendel van permetre explicar racionalment l'elevada prevalença d'algunes malalties en determinades famílies: Existia algun factor hereditari que seguia les lleis de Mendel i que en determinava el seu desenvolupament. S'iniciava així l'estudi genètic de les malalties.

Els estudis posteriors van permetre descriure nombrosos caràcters i malalties que s'ajustaven a una herència mendeliana, però s'observà que alguns trets comuns en els membres d'una mateixa família, especialment antropomètrics o intel·lectuals, no s'ajustaven a les lleis de Mendel i semblaven ajustar-se millor al model de mescla. Aquesta aparent divergència posà en dubte la universalitat de les lleis Mendelianes fins que l'any 1918 Ronald Fisher hi posa el punt i final amb la descripció de l'herència poligènica: L'origen de la variació observada en alguns trets es podia explicar com una diferència en un únic gen (amb un model d'herència mendeliana); mentre que en el cas d'altres trets l'explicació a les variacions observades requeria en més d'un gen (amb un model d'herència no mendeliana).

Els primers intents de localització de gens responsables d'un determinat fenotip es van fer amb marcadors del sèrum (els loci ABO, MN i Rh). Aquests estudis buscaven observar una correlació entre diferents fenotips i els marcadors del sèrum dins d'una mateixa família. La limitació d'estudiar un ventall tan reduït de marcadors genètics va comportar que s'obtinguessin escassos resultats positius.

Als anys 80 s'inicia un canvi de tendència propiciat per la identificació dels *restriction-fragment length polymorphisms* (RFLPs) i dels microsatèl·lits, sumat a la progressiva millora tècnica en la detecció i

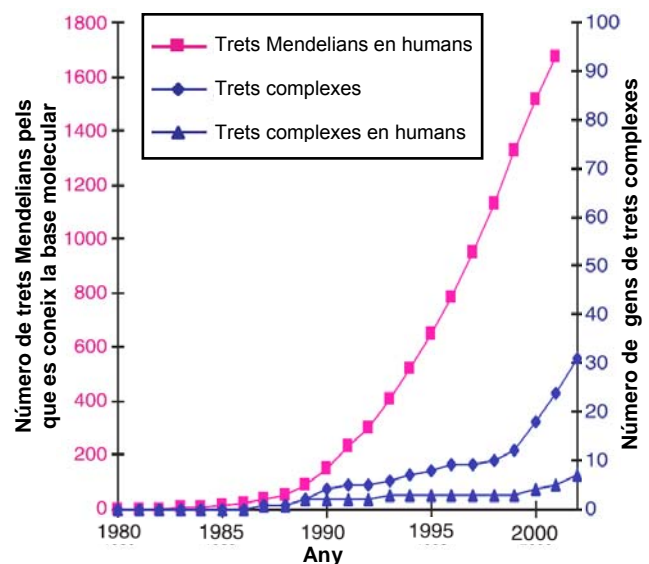


Figura 1. Números acumulats de gens identificats com a causants de malalties amb herència Mendeliana i gens relacionats amb malalties complexes. Adaptat de Glazier et al., 2002

amplificació dels àcids nucleics. Aquest canvi va permetre el mapatge d'una gran quantitat de loci de malalties, iniciant-se una nova època per a la genètica en la que poc a poc s'anirien localitzant els diferents gens responsables de nombroses malalties. No obstant, a pesar d'aquest èxit notable, la major part dels resultats s'aconseguien en malalties amb un model d'herència mendeliana, és a dir, monogèniques. Els resultats positius eren més aviat escassos quan s'estudiaven malalties amb un model d'herència no mendeliana: malalties multifactorials en què més d'un gen és responsable del fenotip observat, i en què a més a més els factors ambientals acostumen a jugar un paper summament important (Figura 1).

L'estudi genètic de les malalties multifactorials

El primer pas abans d'estudiar l'origen genètic d'una determinada malaltia és, òbviament, avaluar l'impacte que la component genètica té sobre la malaltia. Per tal d'avaluar aquest impacte existeixen diferents aproximacions que permeten quantificar aproximadament el factor genètic de la malaltia. Les més usuals són els estudis amb bessons o amb

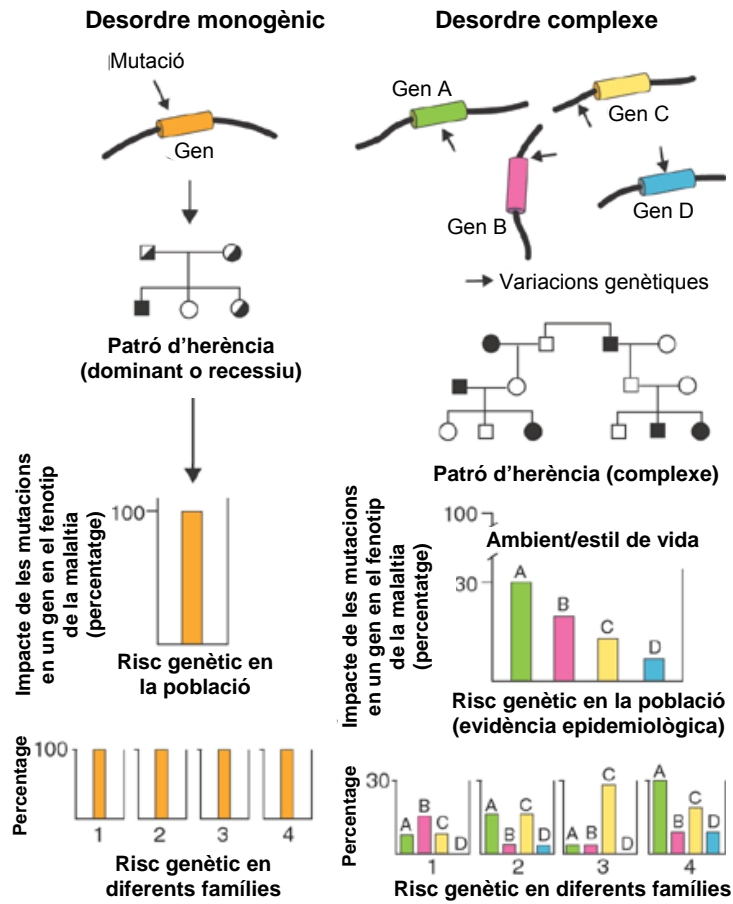


Figura 2. Model d'herència de les malalties monogèniques i les complexes: En les malalties monogèniques les mutacions en un únic gen són suficients i necessàries per a produir el fenotip de la malaltia. L'impacte del gen en el risc genètic a desenvolupar la malaltia és el mateix en totes les famílies. En les malalties complexes les variacions en diversos gens donen com a resultat una predisposició genètica a desenvolupar el fenotip de la malaltia. Quan s'observen els arbres geneològics no s'observa un model d'herència Mendeliana, i les mutacions en els gens no són ni suficients ni necessàries per a explicar el fenotip de la malaltia. Tant l'ambient com l'estil de vida contribueixen de forma marcada en la patogènesi de la malaltia. En una determinada població els gens tenen un impacte determinat en el fenotip de la malaltia, però entre famílies l'impacte dels mateixos gens pot ser totalment diferent. En una família, un gen C, amb un impacte baix en la població pot tenir un gran impacte en la predisposició genètica a la malaltia en aquesta família (família 3). Igualment, alguns gens amb un cert impacte en la població poden tenir efectes menyspreables en algunes famílies (gen D, família 3). Adaptat de Peltonen et al., 2001.

famílies en que està present la malaltia.

Per què s'han identificat pocs gens responsables de patologies multifactorials? La resposta està en la complexitat d'aquestes malalties, ja que deixant de banda l'efecte ambiental, ja de per sí extremadament important, l'origen genètic d'aquestes radica en més d'un gen, sovint els efectes de cadascun dels gens és moderat, i a més aquests efectes no necessàriament són determinants, és a dir, un individu no afectat per la malaltia estudiada pot tenir una predisposició genètica al desenvolupament d'aquesta.

La paraula clau per a entendre aquestes patologies complexes és susceptibilitat. Previsiblement existeixen nombroses variacions genètiques que, sovint amb l'actuació conjunta de l'ambient, predisposen a l'individu a desenvolupar la patologia. Així doncs, ens trobem davant de variacions genètiques amb un impacte modest a nivell individual, al contrari del que passa en les malalties monogèniques, en què l'impacte de la variació sobre l'individu és sever i determinant. Com veurem més endavant aquestes diferències fan que les estratègies que tants èxits van donar per a les malalties monogèniques fracassin quan s'apliquen a les malalties multifactorials (Figura 2).

També és cert que en la població la freqüència de les variacions que predisposen al desenvolupament de malalties multifactorials sol ser més elevada que les variacions que determinen una malaltia monogènica (variants amb una baixa freqüència). L'explicació a aquest fet recau en que la pressió selectiva a la que estan sotmeses és menor, degut a l'impacte moderat que tenen sobre l'individu, a diferència del que passa amb les variacions determinants d'un fenotip més sever, en què la pressió selectiva és superior.

Aquesta diferència és una de les que permet entendre el perquè la majoria de malalties comunes (amb un origen genètic) són de tipus multifactorial. Existeixen nombroses variacions genètiques que predisposen al desenvolupament de la malaltia, però són necessàries certes interaccions entre aquestes variacions i usualment també interaccions amb l'ambient per tal que es desenvolupi la malaltia. L'ambient és especialment important i pot canviar el signe de la pressió selectiva: així, per exemple, en períodes d'escassetat d'aliment, un genotip que possibilita una gran acumulació de reserves en el teixit adipós es selecciona de forma positiva. Però aquest mateix genotip pot donar un fenotip d'obesitat quan l'individu està en un ambient d'abundància, podent fins i tot arribar a ser seleccionat negativament si aquesta obesitat compromet la reproducció de l'individu.

Tot i que l'impacte de les variacions de susceptibilitat és moderat, la seva elevada freqüència i l'elevada incidència de les malalties que originen les fan summament interessants des d'un punt de vista de salut pública.

A la caça dels gens responsables de malalties: Estudis de lligament i d'associació genètica

Per a la localització dels gens responsables de malalties es disposa principalment de dues eines: el lligament genètic (en anglès *linkage*) i l'associació genètica. Les diferències entre les dos són notables, amb limitacions, avantatges i inconvenients diferents. Així, als anys 80 i 90 la majoria d'estudis de cerca de gens causants de una malaltia es feien per lligament genètic, ja que les limitacions tècniques existents no

feien possible la cerca d'aquests gens amb un estudi d'associació genètica, al contrari del que passa actualment.

El perquè d'aquesta diferència entre els estudis de lligament i els d'associació s'entendrà fàcilment quan entrem en detall en cadascun d'ells, però abans convé entendre quins són els fenòmens genètics que s'amaguen darrera les dues aproximacions.

Lligament i desequilibri de lligament

Durant la meiosi hi ha una segregació independent dels cromosomes, el que fa que dos loci localitzats en cromosomes diferents es distribueixin a l'atzar en els gàmetes i que per tant passin a la descendència de forma independent l'un de l'altre. No obstant, si els dos loci es localitzen en un mateix cromosoma aquesta independència no depèn exclusivament de la segregació dels cromosomes, sinó que cal tenir en compte les recombinacions que es donen entre cromosomes homòlegs durant la meiosi. Com més propers estiguin els loci, menor serà la probabilitat que hi hagi una recombinació en la distància que els separa i per tant augmentarà la probabilitat que cosegreuin. Si

a)	locus A	
	a	b
locus B	c	ac 25%
	d	ad 25%
		bc 25%
		bd 25%

b)	locus A	
	a	b
locus B	c	ac 40%
	d	ad 10%
		bc 10%
		bd 40%

Figura 3. a) Descripció de les freqüències dels haplotips entre dos loci en equilibri de lligament. A igualtat de freqüències dels al·lells dels dos loci (0.5), la freqüència dels quatre haplotips possibles és la mateixa. b) En dos loci en desequilibri de lligament, a igualtat de freqüències dels al·lells dels dos loci (0.5), la freqüència dels haplotips possibles no està equilibrada i dos dels haplotips són majoritaris.

s'estudien membres d'una mateixa família i s'observa aquesta cosegregació d'una generació a l'altra es pot afirmar que hi ha lligament entre els dos loci.

Un altre fenomen relacionat és el del desequilibri de lligament. Aquest és una extensió del concepte de lligament aplicat a poblacions, ja que el que s'avalua és la cosegregació de dos al·lells determinats (de loci diferents). El lligament s'aplica als fenòmens recombinatoris que permeten que dos loci és coheretin, però no entra al nivell de

detall dels al·lells. Si entre dos loci determinats existeix lligament és possible que per diferents causes, en una determinada població els al·lells dels dos loci quedin lligats entre ells, és a dir, que observem una concurrència dels al·lells a una freqüència diferent a la que s'esperaria pel producte de les seves freqüències individuals.

Així, per a dos loci A i B amb al·lells a, b i c, d, respectivament, amb unes freqüències individuals de cada al·lel de 0.5, s'espera que en el supòsit que no hi hagi lligament entre els dos loci (equilibri de lligament) la freqüència dels haplotips sigui semblant a la resultant de fer el producte de les freqüències individuals de cada al·lel (Figura 3a). Però en el cas que hi existeixi lligament i un dels al·lells dels locus A s'hereti preferentment amb un dels al·lells del locus B, aleshores s'observarà com les freqüències dels haplotips

difereixen de les esperades assumint que no hi ha lligament (Figura 3b). En aquest cas parlem de l'existència de desequilibri de lligament.

Convé recalcar que lligament i desequilibri de lligament, tot i ser fenòmens relacionats no són dependents, és a dir, dos loci en lligament poden no estar en desequilibri de lligament i viceversa (Figura 4).

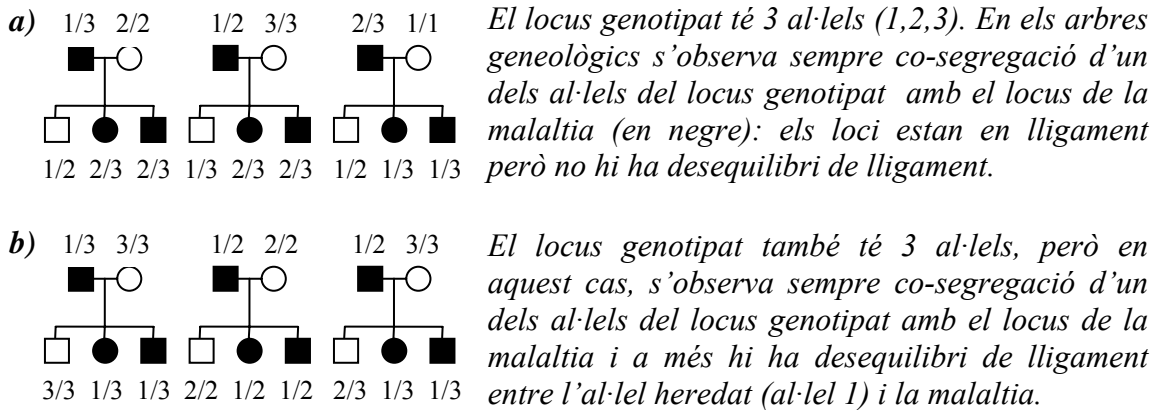
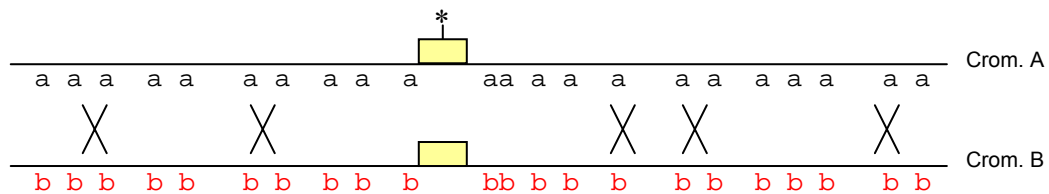


Figura 4. Independència de lligament i desequilibri de lligament. a) Lligament sense desequilibri de lligament. b) Lligament amb desequilibri de lligament.

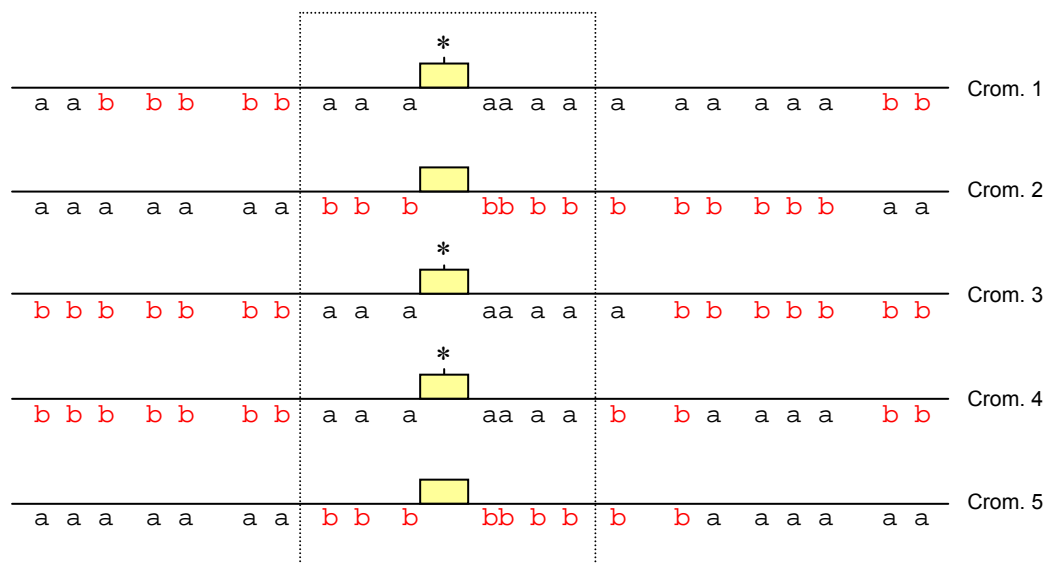
En el lligament es parla de cosegregació de dos loci, però en el desequilibri de lligament parlem de cosegregació de dos al·lels situats en loci diferents. Aquesta cosegregació apareix per selecció natural o com a resultat de processos o situacions que modifiquen la composició genètica de la població al llarg de la història: períodes amb una grandària de població baixa (colls de botella), mescla genètica (entrecreuaments amb altres poblacions), deriva gènica, migracions, mutacions, etc.

En quant a l'origen del desequilibri de lligament, una de les situacions més fàcils d'entendre és la que sorgeix d'un efecte fundador. Hipotèticament un grup reduït de famílies s'estableix en una regió remota i inaccessible. Una d'aquestes famílies és portadora d'una mutació en un determinat gen que provoca un determinat fenotip. Aquesta mutació està rodejada d'altres variacions amb determinats al·lels:



(l'asterisc indica la variant mutada del gen)

Amb el pas de les generacions per efecte de les recombinacions apareixen en la població noves combinacions d'al·lels al voltant de la mutació, però els més propers seguiran una distribució més similar a l'ancestral:



Els desequilibris de lligament establerts es dissipen generació a generació per acció de la recombinació (principalment) i de les mutacions. Així, desequilibris de lligament entre al·lels propers en principi tardaran més temps a dissipar-se. Amb el pas de successives generacions persistiran principalment els desequilibris de lligament entre els al·lels propers, definint blocs cada vegada més petits de desequilibri de lligament. I és en aquest punt que rau una de les principals diferències entre el lligament i el desequilibri de lligament: el primer es sol estendre a longituds de l'ordre de la megabase, mentre que el segon ho fa a distàncies de l'ordre de les quilobases. El fet que el lligament sigui un fenomen referit a unes poques generacions implica que el número de meiosis no hagi estat molt elevat (comparat amb el corresponent a les generacions contingudes en una població) i que per tant la probabilitat d'obtenir recombinants entre dos loci propers sigui inferior a la que tindriem si observem dos loci a la mateixa distància en una població.

Però el de la distància no és l'únic tret distintiu entre els dos fenòmens, en resum, les principals diferències són:

1. El lligament es refereix a loci, el desequilibri de lligament a al·lels.
2. El lligament resulta de fenòmens recombinatoris en les últimes 2-3 generacions, mentre que el desequilibri de lligament resulta de fenòmens recombinatoris ancestrals.
3. El lligament es relaciona amb la cosegregació en una família, el desequilibri de lligament en una població (de fet un família enorme).
4. El lligament es detecta entre marcadors situats a distàncies de l'ordre de la megabase, el desequilibri de lligament de la quilobase.
5. En el lligament els polimorfismes segueixen una estructura jeràrquica, en el desequilibri de lligament no. Això significa que un polimorfisme situat entre dos amb un fort desequilibri de lligament entre ells pot no estar en desequilibri de lligament amb cap dels dos polimorfismes, cosa que no passa en el cas del lligament.

Estudis de lligament genètic

Els estudis de lligament genètic cerquen loci responsables de determinats trets estudiant el lligament entre aquests i diferents marcadors genètics. En el cas de l'estudi de malalties aquest tret pot ser la pròpia malaltia, alguna complicació d'aquesta o bé algun paràmetre quantitatiu relacionat, entre d'altres, i l'estudi es fa genotipant diferents marcadors genètics informatius localitzats en la regió que es vol estudiar en els membres de diferents famílies en què la malaltia està present. Per exemple, en el cas d'estudis de cribratge en tot el genoma el nombre mínim de marcadors necessaris és de 150 distribuïts amb una separació entre ells no superior als 20cM (Strachan *et al.*, 1999). Però aquest número de marcadors és limitat, ja que algunes meiosis no són informatives. D'altra banda, com major és el nombre de marcadors estudiats major és la probabilitat de localitzar la regió que conté la causa de la malaltia, ja que si els marcadors genètics estan molt allunyats de les causes de la malaltia (el locus de la malaltia) la probabilitat de tenir recombinació entre el locus de la malaltia i el marcador més proper augmenta fins a tal punt que pot ser difícil detectar lligament entre els dos. També el nombre de famílies estudiades és important, ja que la recombinació, al ser a l'atzar es pot haver donat en una família, però no en una altra, fet pel qual en la primera família no detectaríem lligament però si en la segona.

Un cop s'han genotipat els diferents marcadors genètics, el següent pas és avaluar estadísticament si existeix lligament entre cadascun dels marcadors i la malaltia per a cada família, i això s'acostuma a fer amb el suport d'algun programa informàtic. El resultat final acostuma a ser un valor de *lod score* per a cada marcador, que permet avaluar si existeix alguna evidència significativa de lligament entre el marcador i la malaltia, o entre el marcador i un paràmetre relacionat amb la malaltia, de tipus qualitatiu o quantitatiu.

En algunes famílies resulta senzill determinar si un determinat marcador està lligat o no a un locus. Ara bé, en altres casos això no és possible, i per tal de no desestimar la família, el que es fa és un càlcul de probabilitats de l'arbre genealògic (*pedigree*) assumint un complet lligament en relació a la probabilitat de l'arbre genealògic assumint que no hi ha lligament. Aquesta relació és el que es coneix com *odds of linkage* i el seu logaritme com a *lod score* (*Z*). A aquest valor de *Z* se li pot associar un valor de probabilitat d'error estadístic al acceptar el lligament. Usualment el llindar de significació estadística es situa en el 0.05% que correspon a un valor de *Z* de 3. Així, valors de $Z > 3$ permeten acceptar el lligament; valors de $Z < -2$ permeten rebutjar-lo; i valors de *Z* entre 3 i -2 són inconclusius.

Òbviament, els estudis de lligament tenen una sèrie d'avantatges i inconvenients:

- Elevada potència per a detectar locus causants de malalties monogèniques: En el cas de les malalties monogèniques ens trobem davant d'efectes majors, determinants, i per tant hi ha una relació directe entre la malaltia i la variant genètica: tots els membres de la família amb la variant genètica responsable de la malaltia desenvolupen o són portadors genètics de la malaltia. Això fa que sigui relativament senzill detectar un lligament entre marcadors genètics propers i el locus de la malaltia.

- Facilitat de fer cribratges genòmics: Amb relativament pocs marcadors i mostres es pot trobar un locus causant d'una determinada malaltia en una cerca per tot el genoma. Com veurem més endavant, aquest número és ínfim si el comparem amb el número de marcadors necessaris per a un estudi d'associació equivalent.
- Baixa resolució: Com ja s'ha mencionat, el fenomen del lligament s'estén a regions amb grandàries de l'ordre de la megabase, pel que resulta difícil distingir quin gen de la regió és el responsable del lligament.
- Baixa potència a l'hora de detectar loci de malalties multifactorials: Quan els estudis de lligament s'apliquen a malalties multifactorials resulta més difícil obtenir resultats positius. Les malalties multifactorials es solen desenvolupar en persones adultes, pel que a vegades resulta difícil reunir famílies completes, i a més els membres de menor edat de la família no es poden tenir en compte, ja que no és possible saber si desenvoluparan la malaltia a una edat més avançada. D'altra banda, solen tenir una component genètica complexa, amb multitud d'efectes menors no determinants, el que comporta que alguns membres de la família tinguin una variant genètica de predisposició però no arribin a desenvolupar la malaltia. Tot plegat fa que per tal de poder detectar variants genètiques de susceptibilitat a una malaltia multifactorial sovint calgui treballar amb un nombre de famílies molt superior al necessari quan s'estudien malalties monogèniques (Figura 5).

Estudis d'associació genètica

Els estudis d'associació genètica avaluen l'existència de correlacions entre determinats trets i variants genètiques en una població. Els estudis solen ser de dos tipus: de tipus cas-control, en els què s'estudia la freqüència de determinats al·lels en un conjunt d'individus amb el tret, sense relació familiar entre ells, en comparació amb la freqüència dels mateixos al·lels en individus control (sense el tret i també no relacionats); o bé de correlació amb algun paràmetre quantitatiu, en el què en un únic grup d'individus es comparen les mitjanes d'aquest paràmetre segons el genotip.

A l'hora d'escollir els polimorfismes a estudiar, principalment existeixen dues aproximacions: la primera es basa en l'estudi de marcadors amb un efecte funcional demostrat (canvi d'activitat de la proteïna, de l'activitat del promotor, etc.), i el que es cerca és l'associació directa d'aquest marcador amb el tret estudiat; i la segona, la més usual, es basa en el fenomen del desequilibri de lligament.

En els estudis directes es parteix de polimorfismes candidats, localitzats a la vegada en gens candidats a ser responsables del tret que s'estudia. Això a la pràctica implica que es coneix la funció del gen i el seu rol potencial en el fenotip estudiat. A més, implica que es coneixen variacions genètiques localitzades en aquest gen que produeixen canvis funcionals: canvis d'aminoàcid amb pèrdua/guany de la funció de la proteïna; canvis en la seqüència de les regions no traduïdes del transcrit de RNA que poden produir modificacions de l'estabilitat del missatger o canvis en la traducció; canvis en la regió promotora que es tradueixen en una diferent activitat del promotor; etc. Òbviament aquest estudi està limitat a la disposició prèvia d'aquesta informació.

En els estudis indirectes, els basats en el desequilibri de lligament, no s'estudien necessàriament polimorfismes amb un paper funcional potencial, sinó que s'estudien un gran nombre de polimorfismes d'un únic nucleòtid (en anglès *single nucleotide polymorphism* - SNP) en la regió d'interès assumint que si existeix un polimorfisme conferidor de risc es genotiparà directament o es genotiparà un SNP en desequilibri de lligament amb aquest. Aquesta estratègia es pot refinar quan es genotipen el que es coneix com SNPs marcadors d'haplotip (htSNPs). Aquests són SNPs que defineixen el conjunt dels haplotips majoritaris existents en una determinada regió, i per tant defineixen la major part dels polimorfismes de la regió (Johnson *et al.*, 2001).

Com ja s'ha comentat, en aquest tipus d'estudi juga un paper crucial el fenomen de la recombinació, però en aquest cas no s'estudien recombinacions entre unes poques generacions, sinó que s'estudia el fenomen en la població a la que pertanyen els individus.

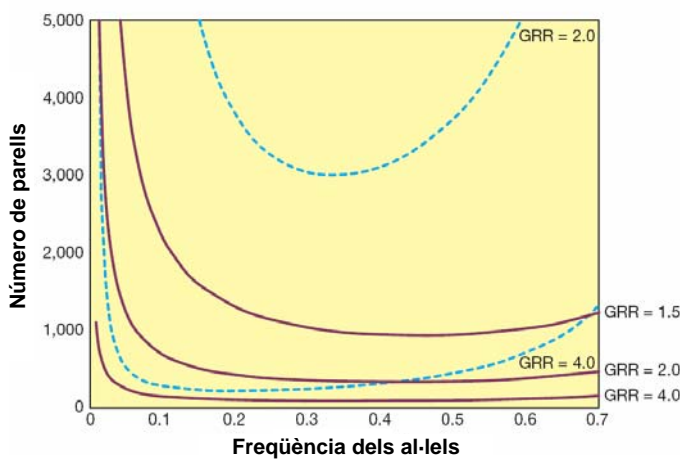


Figura 5. Nombre de parells cas-control i parells de germans afectats necessaris respectivament en estudis d'associació (línia contínua) i de lligament genètic (línia discontinua) per a diferents riscos relatius de genotip (GRR). Adaptat de Risch, 2000.

Els individus seleccionats no tenen relació familiar entre ells, però pel fet de pertànyer a la mateixa població és molt probable que tinguin antecessors comuns, encara que es trobin moltes generacions enrere. Aquest antecessor comú tindria el locus amb la malaltia proper a diferents marcadors genètics, els quals estaven en desequilibri de lligament, però generació rera generació els fenòmens recombinatoris entre el locus i els diferents marcadors fan que el desequilibri de lligament es vagi restringint a aquells marcador més propers. Això fa

que el nombre efectiu de fenòmens recombinatoris que s'estudiï sigui més elevat, i per tant només es detecten associacions amb marcadors genètics propers a l'efecte causal.

Però també es poden detectar associacions positives per altres motius diferents al genètic. Així per exemple si la població control i l'afectada per la malaltia tinguessin orígens ètnics diferents (fins i tot lleugerament diferents), podríem trobar associació de la malaltia amb determinats al·lels deguda a aquesta diferència en l'origen. És per això que en els estudis d'associació resulta clau fer un disseny acurat de l'estudi per tal d'evitar falses associacions i corroborar el resultat amb experiments independents, tant genètics com funcionals.

Resumint, els estudis d'associació genètica presenten els següents avantatges i inconvenients:

- Major potència que els estudis de lligament per a la detecció d'efectes menors causants de susceptibilitat a una determinada malaltia multifactorial: El nombre d'individus

necessari en un estudi d'associació per a detectar un efecte menor (baix risc relatiu de genotip) és molt inferior al que es necessita en un estudi de lligament (Figura 5). Els efectes que es busquen tenen un impacte modest a nivell individual i dependrà d'altres factors que es desenvolupi la malaltia. Ara bé, com ja s'ha comentat anteriorment, a nivell de població l'impacte és major, pel que resulta més fàcil la detecció d'aquestes variants.

- Dificultats a l'hora de fer cribratges genòmics: El nombre de marcadors necessari per a fer un cribratge genòmic és de l'ordre de centenars de milers (Kruglyak, 1999). Òbviament, en l'actualitat és inviable fer aquest tipus d'estudis, pel que, com veurem més endavant, els estudis d'associació es limiten a estudiar gens candidats o bé regions candidates localitzades en estudis previs de lligament.

- Elevada resolució: A diferència del lligament el desequilibri de lligament s'estén a regions menys extenses, de l'ordre de la quilobase, pel que variants associades a la malaltia en un estudi de tipus indirecte estaran a una distància de l'ordre de quilobases de la variació causal. Això permet en un estudi de regió candidata delimitar fàcilment els gens candidats a contenir la variació causal facilitant a més la troballa d'aquesta.

- Falsos positius i impossibilitat de reproduir el resultat: Un dels principals problemes als quals s'enfronten els estudis d'associació genètica és la impossibilitat de reproduir el resultat obtingut en una altra població. Sovint, i especialment en els primers estudis d'associació que es van fer, la causa d'aquesta irreproduïbilitat requeia en un mal disseny de l'estudi, en una grandària de població baixa, estratificació, etc. (Ioannidis *et al.*, 2001; Cardon *et al.*, 2001). De tota manera, les causes d'aquest fet no recauen exclusivament en aspectes tècnics i a vegades la impossibilitat de reproduir l'associació en una altra població recau en les diferències genotípiques o a ambientals de les dues poblacions.

Aspectes a considerar en el disseny d'un estudi d'associació genètica

A l'hora de dissenyar un estudi d'associació genètica caldrà tenir en compte diferents consideracions. En funció de la informació de què es disposi es podrà fer un estudi de tipus directe o indirecte. Així, si es coneixen variacions genètiques funcionals que s'ha demostrat que estan associades amb la malaltia estudiada es poden genotipar directament aquestes, o bé variacions genètiques amb una elevada probabilitat de produir efectes funcionals (*i.e.* variacions que produeixen un canvi d'aminoàcid en la proteïna codificada; variacions en regió promotora; variacions en localitzades en llocs de *splicing*; etc.). En el cas de les últimes, la demostració de la funcionalitat de les mateixes reforçaria els resultats de l'associació, ja que és una prova a favor del resultat de l'estudi independent del resultat genètic.

Si no s'han descrit variacions associades a la malaltia, no hi ha variacions candidates a explicar un canvi funcional, no està clar l'impacte de les mateixes, o bé el que es vol és analitzar polimorfismes representatius de tots els haplotips (o la seva majoria) de la regió estudiada es pot recórrer a una estratègia de tipus indirecte. Aquesta consistirà en fer una selecció de htSNPs que permeti una representació dels haplotips majoritaris de la regió i seguidament genotipar-los (Johnson *et al.*, 2001). La millor selecció possible és la que surt d'estudiar tots els polimorfismes de la regió, ja que d'aquesta manera es

minimitza la pèrdua d'informació que implicaria no estudiar algun polimorfisme que podria no estar en desequilibri de lligament amb els polimorfismes seleccionats per altres vies (com per exemple seleccionant els SNPs disponibles en les bases de dades públiques). Per tal d'obtenir aquesta informació cal seqüenciar la regió estudiada en un mínim de 30 individus. Ara bé, aquesta aproximació implica realitzar un important treball previ pel que sovint s'opta per a seleccionar els SNPs descrits en les bases de dades públiques a pesar de que això pot suposar la pèrdua d'algun resultat positiu.

En quant a la selecció de la regió que es vol estudiar, una de les estratègies més usals a l'hora de buscar variacions genètiques que confereixin susceptibilitat és la del gen candidat. Aquesta consisteix en seleccionar polimorfismes localitzats en un gen, la funció del qual es sospita o s'ha demostrat que és important en la fisiopatologia de la malaltia. L'altra estratègia que es pot seguir és la d'estudiar una regió candidata obtinguda a partir d'un estudi de lligament previ. En aquest cas el nombre de polimorfismes a estudiar sol ser superior, ja que la regió obtinguda per lligament es sol estendre a distàncies de l'ordre de la megabase.

També és extremadament important la selecció de la població que es genotiparà. Cal assegurar-se que la població control i l'afectada per la malaltia només difereixin en la malaltia i no existeixin variants ocultes que puguin donar lloc a falses associacions (diferències ètniques, ambientals, d'edat, etc.). A més caldrà disposar d'un nombre suficientment elevat d'individus per tal de poder detectar l'associació amb elevada significació estadística que novament impedeixi problemes com la irreproduïbilitat del resultat (Cardon *et al.*, 2001; Tabor *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2003). També resulta recomanable repetir l'estudi en una població diferent a l'estudiada per tal de reproduir el resultat de l'estudi, si bé és cert que a vegades les variants genètiques tenen efectes diferents segons la població, pel que un resultat negatiu no necessàriament és contradictori.

L'exemple de la diabetis mellitus de tipus 2

Cerca de gens de susceptibilitat a una malaltia multifactorial

La diabetis mellitus és una malaltia caracteritzada per una alteració del metabolisme dels hidrats de carboni i lípids, que causa entre d'altres, la presència de glucosa en l'orina. En la diabetis mellitus existeix un defecte en la producció d'insulina a nivell pancreàtic, o bé una deficient acció de la insulina en els teixits perifèrics sensibles a aquesta hormona.

El seu origen és divers, però podem fer subclassificacions de la malaltia en funció del seu origen més general. Així les formes més comunes són la diabetis de tipus 1 i la de tipus 2: la primera representa el 5% dels afectats i la segona el 95% (Dean *et al.*, 2004).

La diabetis de tipus 1 deu el seu origen a una reacció autoimmune que produeix la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques, productores d'insulina, conduint a una impossibilitat de produir insulina. És una malaltia que apareix en l'adolescència, i és atribuïble tant a factors genètics com agents externs que actuarien com a desencadenant. La diabetis de tipus 2 (en endavant DM-2) té una patologia més complicada, entre d'altres perquè en el seu origen, a més d'un element genètic complex, hi juga un rol cabdal l'ambient. L'alteració metabòlica pot venir de diferents orígens, principalment

d'una menor sensibilitat dels teixits perifèrics a l'acció insulínica, d'una menor capacitat del pàncreas de secretar més insulina com a compensació d'aquesta menor sensibilitat, o de la combinació de les dues. A més, aquesta alteració es veu propiciada per fenotips d'obesitat, sent aquest el principal factor de risc al desenvolupament de la malaltia.

Donat que en aquest treball ens hem centrat en la DM-2 únicament entrarem en detall en la fisiopatologia d'aquesta.

Regulació del metabolisme de la glucosa

La glucosa és el principal combustible de l'organisme i és necessària per al correcte funcionament d'aquest. Dèficits o excessos dels nivells circulants d'aquesta originen diferents complicacions que van des de la mort cel·lular, en situacions d'hipoglucèmia, a danys en els teixits, en situacions cròniques d'hiperglucèmia. Així doncs, la regulació de l'homeòstasi de la glucosa ha d'assegurar que la concentració de glucosa es mogui en un rang al voltant de 5mM, concentració fisiològica en la que no es presenten els efectes adversos de l'excés o el dèficit d'aquesta. Els òrgans que tenen un rol més important en aquesta regulació són el pàncreas, el fetge i el múscul esquelètic, tot i que altres òrgans també són participants d'aquesta.

Hormones reguladores de l'homeòstasi glucídica. Secreció d'insulina

El primer d'aquests òrgans, el pàncreas, juga un paper essencial en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa, ja que és el responsable de la secreció de les dues hormones principals en la regulació de l'equilibri entre consum i producció de glucosa: la insulina i el glucagó. La insulina és secretada per les cèl·lules β dels illots de Langerhans en resposta a una elevació de la glucosa circulant. Aquestes cèl·lules disposen del transportador de glucosa GLUT2, el qual té una relativament baixa afinitat per la glucosa, el que permet que la taxa de transport de glucosa oscil·li d'acord amb la concentració de glucosa extracel·lular. La glucosa que entra a la cèl·lula β és fosforilada per una glucoquinasa específica de cèl·lula β i que té una baixa afinitat per la glucosa i no s'inhibeix per formació de producte, el què permet que l'enzim ajusti la seva activitat en resposta a un ampli rang de concentracions de glucosa. Seguidament la glucosa és oxidada, amb el que augmenta la relació ATP/ADP. Això provoca el tancament de canals de potassi, amb el que la cèl·lula es despolaritza, provocant l'obertura de canals de Ca^{2+} sensibles a voltatge. L'augment de calci conseqüent provoca la fusió amb la membrana citoplasmàtica de vesícules secretores que contenen insulina, alliberant-se aquesta a l'espai extracel·lular. El glucagó, en contraposició, és secretat quan la concentració de glucosa baixa. Les cèl·lules responsables de la secreció del glucagó són les cèl·lules α pancreàtiques que rodegen les cèl·lules β . Com passava en el cas de la secreció d'insulina, aquest també és un procés sensible a la glucosa.

Efectes de la insulina

En referència al metabolisme, els principals teixits diana de la insulina són el fetge, el múscul esquelètic i cardíac, i el teixit adipós. A nivell hepàtic, la insulina provoca un bloqueig de la gluconeogènesi i glucogenolisi frenant l'alliberament de glucosa per part d'aquest al torrent sanguini. A nivell de múscul i teixit adipós, l'efecte principal de la

insulina és l'increment del transport de glucosa, incrementant la concentració del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana citoplasmàtica. Aquest increment suposa un augment del transport de glucosa d'entre 10 i 40 vegades. La glucosa que entra així a la cèl·lula és ràpidament fosforilada i metabolitzada. En el cas del múscul pot ser oxidada o emmagatzemada en forma de glucògen i en el cas del teixit adipós és usada com a substrat per a la síntesi de lípids. En aquest últim, a més, aquest procés va acompanyat d'una forta inhibició de la lipòlisi provocada també per la insulina.

Desregulació de l'homeòstasi de la glucosa i progrés a DM-2

El procés que condueix al desenvolupament d'una DM-2 és un procés llarg en el que estan implicats nombrosos factors. Diferents d'aquests factors condueixen a una situació de resistència a la insulina en múscul que desencadena el procés posterior (Figura 6). Aquests factors, que veurem més endavant amb més detall, són diversos, però principalment l'obesitat, l'edat, un estil de vida sedentari, o els factors genètics, contribueixen a una situació de resistència a la insulina en múscul. Aquesta resistència a la insulina es caracteritza per una resposta alterada a aquesta hormona, que es tradueix en una captació de glucosa menor per part del múscul en resposta a la insulina. Però en una fase inicial d'aquest procés no s'observen uns nivells de glucosa circulants alterats ni en dejuni, ni després d'un àpat, ja que en aquesta fase inicial el pàncreas augmenta la secreció d'insulina per a compensar la menor resposta a nivell muscular. Paral·lelament, en el teixit adipós visceral, s'altera l'efecte antilipolític de la insulina, amb el que augmenta la lipòlisi i l'alliberament d'àcids grassos al torrent sanguini. Aquest increment dels àcids grassos circulants atenuen l'habilitat de la insulina de suprimir la gluconeogènesi hepàtica, permetent, però, un increment continu de la síntesi d'àcids grassos, i a més, també actuen a nivell del múscul empitjorant la captació de glucosa estimulada per insulina. A nivell pancreàtic, sembla a més, que aquests àcids grassos poden tenir efectes tòxics sobre la cèl·lula β compromentent progressivament la funció d'aquesta. El procés continua amb un progressiu increment de la resistència a la insulina que comporta un també progressiu increment de la insulina secretada (acompanyat d'un increment de la massa de cèl·lules β). En aquest punt del procés ens trobem en una situació d'intolerància a la glucosa, en que tot i que els nivells de glucosa circulants són normals en situació de dejuni, els nivells de glucosa després d'un àpat són més elevats dels que caldria esperar en una situació normal. Això pot ser el reflex de l'inici d'un dèficit de la capacitat

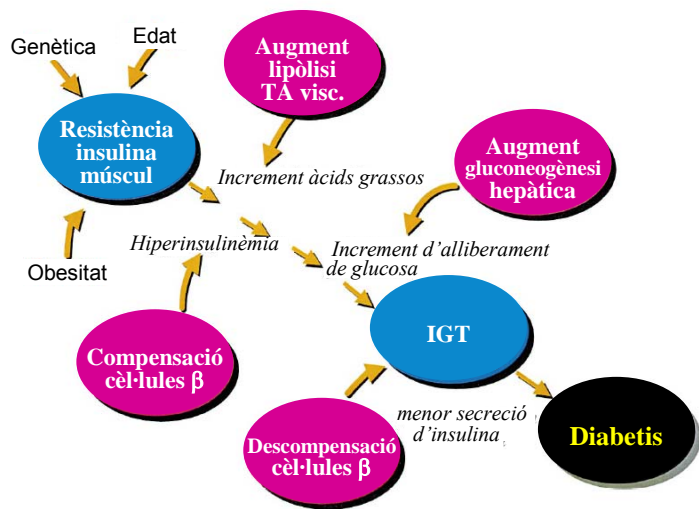


Figura 6. Progrés de la diabetis de tipus 2. Explicada en el text. IGT: Impaired Glucose Tolerance; TA visc.: Teixit adipós visceral. Adaptat de Saltiel, 2001.

per part del múscul en resposta a la insulina. Però en una fase inicial d'aquest procés no s'observen uns nivells de glucosa circulants alterats ni en dejuni, ni després d'un àpat, ja que en aquesta fase inicial el pàncreas augmenta la secreció d'insulina per a compensar la menor resposta a nivell muscular. Paral·lelament, en el teixit adipós visceral, s'altera l'efecte antilipolític de la insulina, amb el que augmenta la lipòlisi i l'alliberament d'àcids grassos al torrent sanguini. Aquest increment dels àcids grassos circulants atenuen l'habilitat de la insulina de suprimir la gluconeogènesi hepàtica, permetent, però, un increment continu de la síntesi d'àcids grassos, i a més, també actuen a nivell del múscul empitjorant la captació de glucosa estimulada per insulina. A nivell pancreàtic, sembla a més, que aquests àcids grassos poden tenir efectes tòxics sobre la cèl·lula β compromentent progressivament la funció d'aquesta. El procés continua amb un progressiu increment de la resistència a la insulina que comporta un també progressiu increment de la insulina secretada (acompanyat d'un increment de la massa de cèl·lules β). En aquest punt del procés ens trobem en una situació d'intolerància a la glucosa, en que tot i que els nivells de glucosa circulants són normals en situació de dejuni, els nivells de glucosa després d'un àpat són més elevats dels que caldria esperar en una situació normal. Això pot ser el reflex de l'inici d'un dèficit de la capacitat

compensatòria del pàncreas, que finalment, si s'agreuja, conduirà a la DM-2: El pàncreas perd la capacitat compensatòria, acompanyat d'una pèrdua de massa de cèl·lules β , que es tradueix en una disminució dels nivells d'insulina, i en un increment de la concentració de glucosa en dejuni i després d'un àpat. Aquesta descompensació es pot agreujar a mida que progressa la malaltia si no es prenen les mesures apropiades, pel que és molt important detectar a temps, no només la DM-2, sinó també si és possible, els estadis precedents d'aquesta.

Factors de risc al desenvolupament de la DM-2

Com ja s'ha dit, la diabetis DM-2 té un origen complex, fruit entre d'altres, de la heterogeneïtat dels factors que la causen. L'origen genètic és divers i degut principalment a efectes menors localitzats en diferents gens; la component ambiental és molt forta i pot decantar un genotip de risc al desenvolupament malaltia o protegir-ne.

Factors genètics

L'acumulació de casos de DM-2 en algunes famílies, estudis amb bessons, i d'altres estudis, demostren que existeix una component genètica de predisposició al desenvolupament de la DM-2. A més, estudis de lligament i d'associació en gens candidats confirmen en humans i models animals aquesta component genètica.

Per exemple, quan s'avalua l'heretabilitat de trets metabòlics quantitius com la sensibilitat a la insulina (S_I), l'efectivitat de la glucosa (S_G), la resposta aguda d'insulina a la glucosa (AIR_G) i l'índex de disposició (DI), una mesura de la resistència a la insulina corregida per la funció de la cèl·lula β , s'observa que entre un 20% i un 35% de la variància entre individus d'aquests paràmetres és deguda a gens additius (Watanabe *et al.*, 1999). Tot i que aquests valors indiquen una heretabilitat modesta són prou importants per tal d'explicar part de la component genètica de la DM-2.

En línia amb l'anterior s'ha observat que l'origen ètnic és un factor de risc important i l'explicació del perquè probablement prové novament de la genètica. En el que es coneix com la teoria dels gens estalviadors es postula que els gens d'estalvi metabòlic suposen un avantatge per a la supervivència de l'individu en períodes d'escassetat d'aliments, i que per tant, en llargs períodes d'aquestes característiques es seleccionen evolutivament de forma positiva els individus amb una major activitat d'aquests gens. Però aquest avantatge es gira en contra de l'individu quan les condicions ambientals es modifiquen cap a una situació d'abundància alimentaria, arribant a l'extrem de perjudicar-li la supervivència. A favor d'aquesta explicació amb rerafons genètic està l'observació que en alguns grups ètnics la prevalença de la DM-2 és molt més alta que en altres, a pesar de nos existir grans diferències en l'ambient, l'alimentació, etc.

En els últims anys s'han identificat diferents gens responsables de conferir susceptibilitat al desenvolupament de la DM-2, alguns d'ells amb un paper en la fisiopatologia de la malaltia no del tot clar. El tipus d'estudis que han permès la identificació d'aquests va des d'estudis de lligament en tot el genoma a estudis de gens candidats. Però aquestes identificacions no estan lliures de polèmica i en molts dels casos apareixen resultats contradictoris al tractar de replicar els estudis. És per això que el nombre de gens de susceptibilitat, o millor dit, de variants de susceptibilitat a DM-2

que s'accepta com a tal és relativament baix. En la Taula 1 es mostren les variants genètiques amb una evidència més forta en quant al seu rol en la DM-2:

ID del gen	Localització cromosòmica	Nom	Variants	OR aprox.	f al·lel de risc
PPAR γ	3p25	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	P12A	1.25	85%
KCNJ11	11p15.1	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	E23K	1.2	40%
CAPN10	2q37	Calpain 10	SNP43, 19, 63, 44	1.2	10-25% (SNP44)
HNF1A	12q22-qter	Hepatocyte nuclear factor 1-alpha	G319S	2	20%
HNF4A	20q12-q13.1	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha	?	?	?
IRS-1	2q36	Insulin receptor substrate-1	G972R	1.25	7-10%

Taula 1. Llista de gens amb variants genètiques associades a DM-2 amb una evidència més forta. (Adaptat de McCarthy, 2004)

A part d'aquestes variacions amb una evidència més forta n'existeixen d'altres que també estan sent estudiades i que podrien formar part del conjunt de variables de susceptibilitat al desenvolupament de la DM-2. Entre elles destaquen ABCC8 (SUR1) que conjuntament amb KCNJ11 (Kir6.2) formen el canal de potassi sensible a ATP implicat en el sistema sensor de la secreció d'insulina; GLUT2, el transportador de glucosa de la cèl·lula beta; INS, que codifica la insulina; i PGC1A, coactivador de PPAR γ .

Factors ambientals i estil de vida

L'efecte de l'ambient és clau a l'hora de determinar el signe d'una determinada predisposició. L'anterior pot ser extensible als factors de risc d'origen genètic i és el que permet entendre l'evolució mundial de la DM-2 al llarg del segle XX. Diferents canvis ambientals han afavorit l'esclat d'aquesta malaltia fins arribar a proporcions d'epidèmia en alguns països, amb un creixement que sembla imparable. Però també els canvis en l'estil de vida, en l'alimentació, la major expectativa de vida, etc. han fet que la prevalença de la malaltia no pari de créixer en les societats que viuen en l'abundància. Dintre d'aquest conjunt de factors, la dieta i l'activitat física tenen una elevada importància.

Edat

La DM-2 és una malaltia que en la majoria de les poblacions s'estableix a una edat adulta. La incidència és baixa abans dels 30 anys, però existeix una forta correlació entre l'edat i la prevalença de la malaltia a partir d'aquesta edat, amb un increment progressiu del risc. Tot i això, l'efecte no és generalitzable i varia depenent de l'origen ètnic. Per exemple, en indis Pima l'increment del risc ja s'observa a partir dels 20 anys (Rewers *et al.*, 1995).

Obesitat

La majoria de diabètics de tipus 2 són obesos: Quan s'estudia la prevalença de la DM-2 en la població s'observa clarament una correlació entre aquesta i l'índex de massa corporal (ÍMC), i això es tradueix en que l'obesitat és un important factor de risc al desenvolupament de DM-2. La relació entre les dues patologies és complexa, i es desconeix amb exactitud quina és la relació entre les dues patologies. Tot i això, s'hipotetitza que l'obesitat podria conduir a un subtipus de DM-2 associat a aquesta o bé que comparteixen una mateixa predisposició genètica.

Estudis dirigits a entendre el mecanisme que explica aquesta relació han mostrat que el tipus d'obesitat també és un factor important. Així s'observa que l'adipositat visceral comporta un risc més elevat de desenvolupar DM-2, amb independència de la presència d'obesitat, i a més que la obesitat visceral s'associa amb la resistència a la insulina, que com veurem a continuació és un dels principals determinants de la DM-2.

Resistència a la insulina

La resistència a la insulina és el principal determinant de la DM-2 i a més és un potent predictor del desenvolupament de la malaltia. Com ja s'ha discutit anteriorment, es caracteritza per una menor sensibilitat dels teixits perifèrics a la insulina i és el primer pas cap al desenvolupament de la DM-2. Aquesta sensibilitat alterada pot tenir diferents orígens, alguns d'ells estretament lligats amb l'obesitat.

La resistència a la insulina es caracteritza per defectes de la senyalització de la insulina a diferents nivells: menor concentració del seu receptor en la membrana plasmàtica, menor activitat d'enzims intracel·lulars, de la translocació de transportadors de glucosa a la membrana, etc. En el seu conjunt, aquests defectes es tradueixen en múscul en una menor captació de glucosa i una menor síntesi de glucògen, acompanyada d'un increment de l'acumulació de triglicèrids en el múscul, que agraven encara més la resistència.

Un segon exemple de malaltia multifactorial: l'osteoporosi

L'osteoporosi és una de les malalties comunes més freqüents en les persones d'edat avançada. Es caracteritza per una disminució progressiva de la massa òssia que comporta el deteriorament del teixit ossi amb el consegüent increment en el risc de fractures.

Aquesta pèrdua de massa prové de diferents factors que com a resultat provoquen un desequilibri en l'homeòstasi de l'os. Aquesta homeòstasi es manté principalment per l'acció conjunta de dos tipus cel·lulars, els osteoblasts i els osteoclasts, els quals són respectivament els responsables de generar la matriu òssia i de reabsorbir-la. L'acció de diferents agents, principalment hormones, modula la funció d'aquests dos tipus cel·lulars afavorint-ne la seva funció o disminuint-la. Els principals agents que regulen aquest equilibri són la disponibilitat de calci, els esteròides sexuals i l'acció mecànica, si bé aquest últim és el menys important dels tres. D'aquests agents convé destacar els estrògens, ja que la seva deficiència és la responsable de gran nombre dels casos

d'osteoporosi en dones postmenopàusiques, pel que des d'un punt de vista epidemiològic són del màxim interès. Igualment, els agents implicats en el metabolisme del calci són dianes terapèutiques en potència, que tot i no tenir un impacte epidemiològic presumiblement tan alt juguen un rol essencial en l'homeòstasi de l'os.

L'osteoporosi és una malaltia multifactorial, la qual cosa no es d'estranyar, ja que el sistema que manté homeòstasi òssia té una elevada complexitat, en la que nombrosos agents poden decantar l'equilibri en una direcció o l'altre. A més, la component genètica s'ha demostrat que és molt elevada. Així per exemple en estudis amb bessons s'ha demostrat que entre el 60-85% de la variància en la densitat mineral òssia és determinada genèticament (Krall *et al.*, 1993; Gueguen *et al.*, 1995).

Tenint en compte tot l'anterior apareixen certs candidats a explicar l'origen genètic de la malaltia. Entre aquests es troben hormones calciotròpiques, els seus receptors, citoquines, factors de creixement, i els seus receptors, i proteïnes de la matriu òssia. En definitiva, gens implicats en la regulació de la funció osteoblàstica i osteoclàstica, tant a nivell funcional com a nivell de proliferació i diferenciació cel·lular.

Estudis genètics

Com en la majoria de malalties multifactorials, els esforços per tal de desxifrar la causa genètica de l'osteoporosi han seguit principalment l'estratègia del gen candidat i la cerca per lligament en cribratges genòmics o de regions concretes. En aquests estudis sovint s'ha seguit una estratègia de locus de tret quantitatiu (en anglès *quantitative trait locus*- QTL) amb paràmetres com la densitat mineral òssia, osteocalcina, etc. Les estratègies de QTL també s'han usat en diabetis (amb resistència a la insulina, secreció d'insulina, etc.) i en altres malalties, i són bàsicament una aproximació de tipus quantitatiu al fenotip de les malalties. Així, es considera que les malalties multifactorials estan participades de QTLs cadascun dels quals contribueix en un cert grau a determinats fenotips de la malaltia. La classificació dels subjectes no es de tipus qualitatiu sinó que es fa ordenant-los segons el paràmetre quantificat.

A l'igual del que passa amb els estudis genètics amb la DM-2, en el cas de l'osteoporosi els estudis de lligament tenen limitacions importants. Novament ens trobem davant d'una malaltia complexa, i com ja s'ha comentat anteriorment, la potència d'aquest tipus d'estudis és baixa a l'hora de detectar gens de susceptibilitat. Tot i això existeixen alguns estudis de lligament genètic amb resultats positius. La majoria cerquen QTLs que afectin la densitat mineral òssia o d'altres determinants de risc d'osteoporosi, i ho fan en tot el genoma, o bé en regions candidates a contenir un d'aquests loci.

Per tot l'anterior, l'aproximació genètica més freqüent és la dels estudis d'associació. Aquests estan basats majoritàriament en l'aproximació del gen candidat, gens rellevants per el metabolisme ossi, i el que avaluen és l'existència d'associació genètica amb paràmetres qualitius com presència/absència de fractures osteroporòtiques (estudi cas-control) o bé diferències significatives en la mitja d'un paràmetre quantitatiu (com la densitat mineral òssia) entre grups d'individus amb genotips diferents.

Resultats dels estudis genètics

Els resultats dels estudis d'associació genètica han permès delimitar amb gran nombre d'evidències una sèrie de gens candidats a explicar una part de la variància de la densitat mineral òssia. D'aquests, els principals són el receptor de vitamina D (VDR), el receptor d'estrògens α ($ER\alpha$), i el gen del col·lagen tipus I $\alpha 1$ (COLIA1), si bé altres gens apareixen com a candidats. A més els resultats dels estudis de lligament demostren l'existència d'altres loci candidats que han de ser estudiats amb més detall mitjançant estudis d'associació.

El gen VDR

La vitamina D, a través del seu receptor, juga un paper important en l'homeòstasi del calci regulant el creixement i diferenciació de les cèl·lules òssies, l'absorció intestinal de calci, i la secreció d'hormona paratiroïdal (PTH). Tenint en compte la importància cabdal que té el metabolisme del calci en l'homeòstasi de l'os es fàcil entendre perquè el receptor de la vitamina D s'erigeix com un dels més fermes candidats a explicar part de la variància genètica de paràmetres determinants d'osteoporosi com la densitat mineral òssia. I els resultats de nombrosos estudis d'associació genètica confirmen l'existència d'associació genètica entre polimorfismes del VDR amb densitat mineral òssia, tot i que encara no queda clar quin és el mecanisme funcional dels polimorfismes associats ni la magnitud de l'efecte observat.

El gen del col·lagen de tipus I

El col·lagen és la proteïna majoritària de l'os, pel qual els gens que codifiquen el col·lagen de tipus I (COLIA1 i COLIA2) són importants candidats a explicar la patogènesi de l'osteoporosi. Així, en nombrosos estudis es demostra l'existència d'associació entre un polimorfisme del gen COLIA1 amb una massa òssia menor i amb fractura osteoporòtica (revisats a Liu *et al.*, 2003). Estudis funcionals d'aquest polimorfisme han permès demostrar que afecta a l'afinitat d'unió del factor de transcripció Sp1, el que es tradueix en una activitat transcripcional diferent segons l'al·lel, i que s'acaba traduint en una relació anòmala entre les cadenes $\alpha 1$ i $\alpha 2$ del col·lagen i una reducció de la resistència mecànica de l'os (Grant *et al.*, 1996; Mann *et al.*, 2001).

El gen $ER\alpha$

La relació existent entre un dèficit d'estrògens i la pèrdua de massa òssia fan del receptor d'estrògens α un altre ferm gen candidat d'osteoporosi. Polimorfismes localitzats en el primer intró i en el promotor del gen associen amb densitat mineral òssia i edat d'establiment de la menopausa (Weel *et al.*, 1999; Albagha *et al.*, 2001), si bé no està clar quin dels dos és el responsable principal de l'associació, ja que estan en un fort desequilibri de lligament i a dia d'avui es desconeix el mecanisme molecular responsable de l'associació.

Altres gens candidats

A més dels tres gens abans mencionats existeixen altres gens que estan sent estudiats. Entre aquests cal destacar-ne el TGF- β 1, la IL-6 i la ApoE. El primer s'ha demostrat que té efectes potents en l'activitat de la cèl·lula òssia, i a més en alguns estudis s'ha observat que polimorfismes localitzats en el gen associen amb densitat mineral òssia, fractura osteoporòtica i marcadors de recanvi de l'os; el segon s'ha associat amb massa òssia i amb recanvi de l'os; i per últim en quan al gen ApoE també s'han descrit algunes associacions que suggereixen un rol important d'aquest gen en l'osteoporosi. Altres gens que també estan sota sospita en quant a un possible rol en l'osteoporosi

requereixen més estudis que confirmin els estudis ja existents.

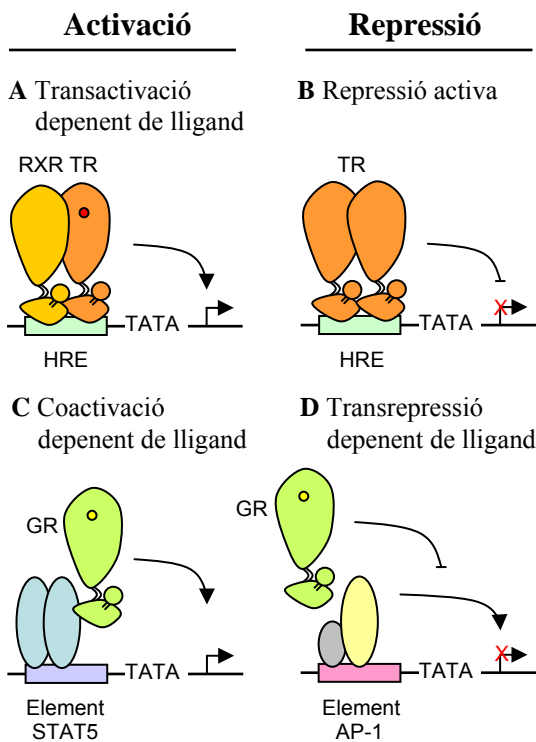


Figura 7. Activitats transcripcionals dels receptors nuclears. L'activitat més usual dels receptors nuclears és la d'activar la transcripció en dependència del lligand al unir-se a l'element de resposta a hormones (a), però també poden reprimir-la, al unir-se a l'element de resposta en absència de lligand (b). Els receptors nuclears també poden activar la transcripció de manera dependent de lligand coactivant altres factors de transcripció (c). Igualment, alguns receptors nuclears poden reprimir de manera dependent de lligand l'activitat d'altres factors de transcripció, procés que es coneix com transrepressió (d).

El coactivador AIB3

La regulació de la transcripció és un procés complex i altament regulat en el que participen nombrosos factors. D'entre aquests factors, els receptors nuclears són una família de factors de transcripció que regulen l'expressió gènica en dependència a un lligand. Dins d'aquesta família s'inclouen receptors d'hormones esteroïdals, com els estrògens (ER) i els glucocorticoides (GR), receptors de lligands no esteroïdals, com les hormones tiroïdals (TR) i l'àcid retinoïc (RAR), així com receptors que uneixen diversos productes del metabolisme lipídic com els àcids grassos i les prostaglandines. També existeixen alguns receptors pels quals encara no s'han descrit els lligands i als quals s'anomena receptors orfes.

Els mecanismes pels quals aquests receptors regulen la transcripció són diversos. Els receptors nuclears poden activar o reprimir l'expressió de gens diana unint-se directament als elements de resposta del DNA com a homo- o heterodímers o bé interaccionant amb altres factors de transcripció (Figura 7). A més, per tal d'exercir la seva funció, els receptors nuclears interaccionen amb altres proteïnes que els coregulen actuant de coactivadors o corepressors.

Generalment per tal que s'iniciï la transcripció els corepressors han d'alliberar-se del receptor, en un procés que sol ser dependent de lligand. A continuació es recluten els

coactivadors, que solen formar part de complexos transcripcionals que inclouen gran varietat de proteïnes, i que actuen fent de pont entre els receptors i la maquinària de transcripció basal, remodelant l'estructura de la cromatina, etc. Alguns d'aquests coactivadors són essencials per a l'activació de la transcripció mitjançada per molts factors de transcripció, incloent els receptors nuclears. D'entre aquests factors destaquem un identificat recentment, pel qual creix l'interès: AIB3 (ASC-2/RAP250/PRIP/NRC/TRBP/NCOA6).

AIB3 és un coactivador transcripcional amplificat en càncers

El gen AIB3 consta de 15 exons que es distribueixen al llarg de 111 kb (Antonson *et al.*, 2004), amb una pauta oberta de lectura continguda en el transcrit del gen humà que codifica per a una proteïna de 2063 aminoàcids (250 kD). Existeixen a més transcrits alternatius producte de *splicing* que codifiquen per a proteïnes de pes inferior, si bé aquestes no han estat caracteritzades.

La identificació del gen AIB3 (*amplified in breast cancer 3*) es va fer en una cerca de gens amplificats i sobreexpressats en càncer de mama, en el cromosoma 20q. En aquesta cerca es va observar amplificació del gen AIB3 en aproximadament un 10% dels casos, així com en nombroses línies cel·lulars de càncer de mama (Guan *et al.*, 1996). En estudis posteriors es va demostrar, a més, l'amplificació del gen en altres tipus de càncer, arribant a un 30% en el cas del càncer de còlon (Lee *et al.*, 1999). En conjunt aquests resultats suggereixen que la major expressió del gen AIB3 contribueix a un major creixement del tumor.

Els primers estudis funcionals del gen van demostrar que la principal funció d'AIB3 és la de coactivador transcripcional, principalment de receptors nuclears però també d'altres factors de transcripció (Taula 2), actuant doncs com un coactivador general de la transcripció i no exclusivament com un coactivador de receptors nuclears (Lee *et al.*, 1999; Mahajan *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000; Caira *et al.*, 2000; Sohn *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Mahajan *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Goo *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2004a; Hong *et al.*, 2004b). A més, en algun d'aquests estudis (Lee *et al.*, 1999) i en estudis posteriors amb models animals *knock-out* (Kuang *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003; Antonson *et al.*, 2003) es va demostrar que és un coactivador essencial, i que la pèrdua de funció d'AIB3 es tradueix en defectes en l'activació de RXR, RAR, TR i PPAR.

Llistat de factors de transcripció coactivats per AIB3

Receptors nuclears

TRs
ERs
GR
RAR
VDR
PPARs
LXR
CAR
AR
Nur77

Altres factors de transcripció

c-Jun
c-Fos
ATF-2
CREB
heat shock factor 1
SRF
E2F-1
Rb
NFκβ
C/EBPα

Taula 2. AIB3 és un coactivador general de la transcripció.

A part de les interaccions d'AIB3 amb factors de transcripció, per tal d'exercir la seva funció de coactivador, AIB3 interacciona amb altres factors: Diferents experiments demostren la interacció d'AIB3 amb CBP i p300 (Mahajan *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). AIB3 no té capacitat histona acetil transferasa, pel que podria modular l'estructura de la cromatina al reclutar aquests factors, els quals si tenen aquesta activitat. També interacciona amb alguns components del complex de la proteïna quinasa dependent de DNA (DNA-PKc), complexa que a la vegada fosforila a AIB3 (Ko *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2003), amb la proteïna DRIP130, component del complexa mediador DRIP/TRAP, i altres proteïnes, algunes d'elles amb capacitat d'unió a RNA.

Organització de la proteïna AIB3

L'estructura bàsica d'AIB3 conté els següents elements: 1) Un potent domini d'activació (AD1), 2) un segon domini d'activació ric en Glu i Pro (AD2), 3) Un motiu LXXLL-1 (motiu NR) essencial per a la interacció amb nombrosos receptors nuclears i un motiu LXXLL-2 amb interaccions amb NRs més limitades que el primer, 4) un domini de dimerització, i 5) una regió inhibidora a l'extrem C-terminal, rica en Ser, Thr i Leu (Figura 8).

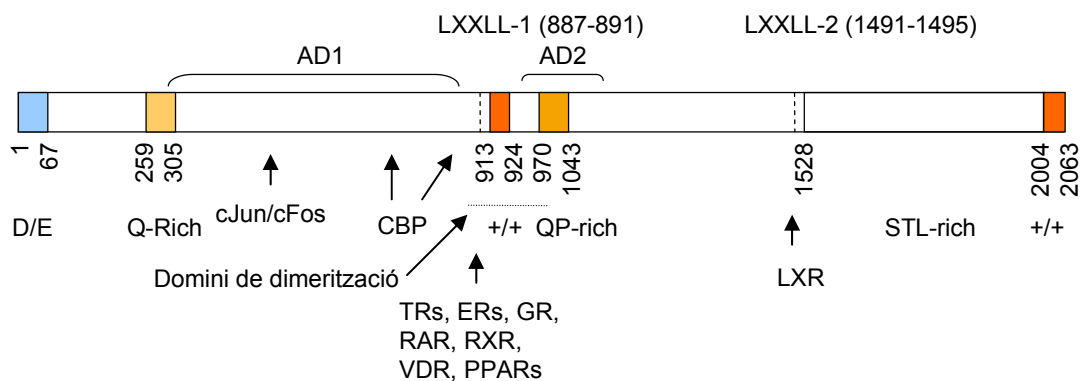


Figura 8. Estructura de la proteïna AIB3. Es descriuen els diferents elements bàsics (veure el text) així com les principals interaccions amb factors de transcripció. Els números indiquen la posició dels aminoàcids.

Les regions AD1 (aminoàcids 302 a 783) i AD2 (aminoàcids 940 a 1124) d'AIB3 són regions riques en Glu i Pro que actuen com a activadores de la transcripció, com es demostra al fer quimeres d'aquestes regions amb el domini d'unió a DNA de Gal4 de llevat. La regió AD2 és a més essencial per l'activació lligand dependent de receptors nuclears (Mahajan *et al.*, 2000). L'activitat d'aquestes regions es veu regulada per l'extrem C-terminal de la proteïna (uns 600 aminoàcids), una regió rica en Ser, Thr i Leu, que actua disminuint-ne l'activitat (Mahajan *et al.*, 2000). Els mecanismes que dirigeixen aquesta inhibició no estan del tot clars si bé es sospita que podria estar modulada per fosforilació i que es podria exercir a través de la unió de diferents proteïnes moduladores.

La funció activadora de la proteïna va lligada a la presència de dos motius NR. Aquests motius s'ha descrit que són necessaris per a la interacció amb els receptors nuclears a través del domini d'unió de lligand d'aquests. Consisteixen en una seqüència bàsica Leu-X-X-Leu-Leu (en què X és qualsevol aminoàcid) en la què també els aminoàcids -1

i -2 precedents són importants en la unió al receptor, determinant l'afinitat i l'especificitat per aquest (Chang *et al.*, 1999). El primer motiu LXXLL d'AIB3 uneix diferents receptors nuclears amb una elevada afinitat: TRs, RXRs, RARs, GR, ERs, VDR, i PPARs (Mahajan *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2000; Caira *et al.*, 2000). El segon motiu LXXLL no interacciona amb TR, RAR, RXR, GR, tot i que sí amb ER α a una afinitat 10 vegades inferior a la de LXXLL-1 (Mahajan *et al.*, 2000) i amb LXR (Mahajan *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Toresson *et al.*, 2004). En els dos motius, l'associació amb els receptors nuclears es perd quan se'n muten els aminoàcids consens.

Localització i funcions del gen AIB3

El transcrit del gen AIB3 està present en nombrosos teixits i tipus cel·lulars (Zhang *et al.*, 2003). Pel seu patró d'expressió es pot dir que té una expressió ubíqua: Està present a testicle, cervell, tim, teixit adipós blanc i marró, pituitària, ovari, ronyó, pulmó, fetge, pàncreas, múscul esquelètic, entre d'altres (Figura 9). Quan s'analitza la distribució de la proteïna en diferents talls histològics s'observa que l'expressió dintre dels diferents teixits en els que es detecta expressió del gen no és homogènia, i que hi ha diferències importants entre els diferents tipus cel·lular que els conformen. Així, per exemple, en pàncreas es detecta la proteïna en illots de Langerhans amb un alt nivell d'expressió, sent menor en cèl·lules acinars; o en glàndula tiroide es detecta en cèl·lules del fol·licle,

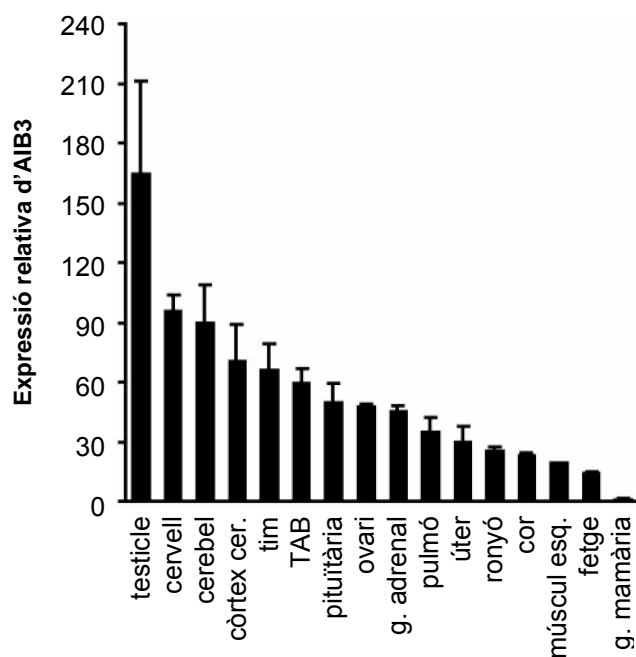


Figura 9. Expressió relativa del gen AIB3 mesurada per PCR a temps real. Els valors d'expressió d'AIB3 han estat normalitzats per la concentració de RNA 18S. Adaptat de Zhang *et al.*, 2003

però no en les del parafol·licle (Zhang *et al.*, 2003). Aquests resultats indiquen que AIB3 és un gen amb una expressió dependent del tipus cel·lular.

Si s'analitzen els perfils d'expressió amb més detall s'observa, a més, una correlació entre l'expressió de receptors d'esteroides i la d'AIB3: En tipus cel·lulars en que hi ha una elevada expressió de receptors d'aquestes hormones (ER, AR o GR) l'expressió d'AIB3 és igualment elevada, i això és cert en testicle, ovari, úter i glàndula mamària (Zhang *et al.*, 2003). L'elevada presència d'AIB3 en aquests tipus cel·lulars i el fet que és un potent coactivador dels receptors d'esteroïds suggereix que podria jugar un rol important en la funció d'aquestes hormones en aquests tipus cel·lulars.

Estudis en models cel·lulars i animals

Fins a la data s'han realitzat estudis del gen AIB3 bàsicament en tres models animals: Els ratolins *knock-out* (KO) per al gen AIB3, els ratolins transgènics amb el dominant negatiu 1 (DN1), i els transgènics amb el dominant negatiu 2 (DN2). Dels estudis provinents dels animals *knock-out* es treuen diverses conclusions que clarifiquen el rol fisiològic d'AIB3. La primera d'aquestes conclusions és que és un gen essencial per a la viabilitat de l'organisme. Així, el ratolí KO d'AIB3 homozigot (en endavant AIB3^{-/-}) és inviable, produint-se la mort de l'embrió *in utero* durant els dies 8 a 12.5 *post coitum* (Kuang *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003; Antonson *et al.*, 2003; Mahajan *et al.*, 2004). La causa d'aquesta letalitat sembla provenir d'una disfunció de la placenta i un seguit de defectes de desenvolupament a nivell de cor, fetge i cervell (Kuang *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003; Antonson *et al.*, 2003).

Quan s'estudien fibroblasts embrionaris derivats d'embrions AIB3^{-/-} amb 12.5 dpc i es comparen amb els provinents d'un ratolí salvatge, s'observa en els primers un creixement més lent així com l'entrada en apoptosi al arribar a la fi de la fase de creixement (Mahajan *et al.*, 2004). Reforçant aquesta observació, en un altre sentit, s'ha descrit en estudis cel·lulars que la transfecció estable d'AIB3 es tradueix en una taxa de proliferació més elevada (Kong *et al.*, 2003). En conjunt els resultats suggereixen que AIB3 pot jugar un paper en la proliferació cel·lular i en l'apoptosi (anti-apoptòtic).

En línia amb l'anterior, AIB3 també ha estat implicat en regulació de processos de diferenciació cel·lular. El primer d'aquests és la diferenciació a granulòcit de cèl·lules de la línia promielocítica HL60. En aquesta s'ha observat que l'expressió d'AIB3 s'indueix durant la diferenciació en aquest tipus cel·lular i que AIB3 interacciona físicament i coactiva C/EBP α (Hong *et al.*, 2001), el qual s'indueix durant la diferenciació dels granulòcits i és necessari per a la diferenciació granulogènica (Hohaus *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997). També s'ha descrit que interacciona amb ATF-2, el qual també s'indueix durant la granulopoiesi i a més pot formar heterodímers amb C/EBP α que s'uneixen a DNA i regulen la transcripció (Shuman *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2004a). L'altre procés de diferenciació en el qual juga un paper important és en l'adipogènesi. Mitjançant fibroblasts embrionaris AIB3^{-/-} s'ha comprovat la impossibilitat d'aquests de diferenciar a adipòcit per inducció de PPAR γ 1 (Qi *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004a).

A part d'aquestes implicacions a nivell cel·lular també s'ha observat alguns efectes en els ratolins AIB3^{+/-}. Aquests ratolins són viables i no presenten grans diferències fenotípiques aparents, però al ser estudiats amb més detall s'observen una sèrie de diferències amb els ratolins salvatges. La primera d'aquestes és el retard del creixement intrauterí observat en els ratolins AIB3^{+/-} amb un *background* genètic 129S6. Així, els ratolins AIB3^{+/-} recent nascuts són un 10-15% més petits que els corresponents salvatges, si bé aquesta diferència es perd i als 2-3 mesos d'edat no s'observen diferències amb els salvatges (Mahajan *et al.*, 2004). En aquests mateixos ratolins s'observa hipoesterilitat tant en mascles com en femelles. Entre aquestes últimes s'observa un 20% d'esterilitat, i entre aquelles que són hipofèrtils, s'observa un declivi progressiu del número de cries per embaràs així com un increment de la taxa de mortalitat neonatal (Mahajan *et al.*, 2004). Per últim, també s'ha observat un empitjorament dependent d'edat de la capacitat cicatritzadora de ferides. En aquest cas

s'ha observat que els queratinòcits del ratolí AIB3^{+/-} tenen una capacitat de resposta a EGF nul·la o molt disminuïda, el que fa que la capacitat migratòria d'aquests sigui molt baixa (Mahajan *et al.*, 2004).

L'únic model KO condicional d'AIB3 fet fins el moment és el de glàndula mamària, concretament el de cèl·lules epitelials d'aquesta. En aquest model s'observa una deficient mammapoiesi, que es tradueix en una menor producció de llet. Les cèl·lules epitelials AIB3^{-/-} tenen una taxa de proliferació similar a les salvatges, si bé tenen una taxa d'apoptosi superior (Qi *et al.*, 2004).

Per últim, s'han generat ratolins transgènics amb expressió de dominants negatius per a AIB3. Aquests dominants negatius són dos: DN1, que correspon els aminoàcids 849 a 929 d'AIB3 i conté la caixa LXXLL-1; i el DN2, que correspon els aminoàcids 1429 a 1511 d'AIB3 i conté la caixa LXXLL-2. El primer d'ells actua bloquejant específicament la unió d'AIB3 als receptors nuclears amb els que interacciona a través de la caixa 1 (Kim *et al.*, 2002) i possiblement impedit l'homodimerització d'AIB3, mentre que el segon actua bloquejant la unió d'AIB3 a LXR, també de forma específica (Lee *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003). En el ratolí transgènic DN1 s'observen defectes a diferents teixits (Kim *et al.*, 2002), mentre que en el transgènic DN2 no s'observen defectes en teixits, si bé els fetges d'aquests ratolins tenen defectes del metabolisme de lípids i esdevenen fetge gras sota una dieta rica en colesterol, indicant defectes del metabolisme d'aquest (Kim *et al.*, 2003).

Objectius

Les bases genètiques de la majoria de malalties multifactorials no estan definides. És per això que molts estudis de genètica es dirigeixen a definir l'origen genètic d'aquestes malalties. En aquests estudis una de les estratègies més utilitzades és la de l'estudi de gens candidats, gens que per la seva funció biològica poden jugar un paper rellevant en la patologia de la malaltia.

Amb la finalitat de trobar nous gens implicats en la fisiopatologia de la diabetis mellitus de tipus 2, l'objectiu principal de la present tesi ha estat el d'avaluar dos gens candidats de susceptibilitat a aquesta malaltia, partint d'estudis d'associació genètica amb diferents grups d'individus ben caracteritzats clínicament, i avaluant els resultats positius, en el cas d'obtenir-los, en estudis funcionals dirigits a desxifrar el mecanisme molecular responsable del resultat.

El primer d'aquests gens és el gen DOR (*diabetis and obesity regulated*), identificat en el nostre laboratori pel Dr. Daniel Bach en un estudi d'hibridació substractiva l'objectiu del qual era el d'identificar gens regulats en diabetis de tipus 2. El gen DOR és un coactivador transcripcional amb una elevada expressió en múscul esquelètic, teixit en el que l'expressió es veu fortament disminuïda en situacions de diabetis de tipus 2 i obesitat.

El segon d'aquests gens és el gen AIB3, també un coactivador transcripcional que per la seva funció i localització és un gen candidat. AIB3, com s'ha vist en la introducció, és un potent coactivador de nombrosos receptors nuclears alguns d'ells fortament implicats en la diabetis de tipus 2 (*i.e.* PPAR γ). A més, el gen AIB3 localitza en el genoma a 3 kb del gen DOR, pel que en el cas de trobar un resultat positiu en un estudi d'associació amb polimorfismes localitzats en el gen DOR, l'efecte causal podria provenir d'aquest gen, sent convenient estendre l'estudi també a polimorfismes localitzats en aquest gen.

Els coactivadors transcripcionals regulen l'expressió de nombrosos gens, jugant un paper important en la regulació de diferents processos a nivell transcripcional, i a més, els antecedents indiquen que altres reguladors transcripcionals com el coactivador PGC-1 i el receptor nuclear PPAR γ són gens de susceptibilitat a diabetis de tipus 2 (Ek *et al.*, 2001; Stumvoll *et al.*, 2002).

En aquest sentit aquesta tesi ha tingut tres grans objectius, que alhora es poden dividir en altres objectius més concrets:

1· Avaluació dels gen DOR i AIB3 com a gens de susceptibilitat a la diabetis de tipus 2:

- a) Avaluació del gen DOR com a gen de susceptibilitat a la DM-2: Per tal de satisfer aquest objectiu s'han realitzat estudis d'associació genètica amb un grup d'individus normoglucèmics i un de diabètics de tipus 2 de població espanyola, i un amb els mateixos grups de població anglesa. També s'avalua l'associació genètica amb l'obesitat.
- b) Avaluació del gen AIB3 com a gen de susceptibilitat a la DM-2: S'ha avaluat el desequilibri de lligament entre diferents polimorfismes de la regió compresa pels gens DOR i AIB3. D'entre aquests polimorfismes es seleccionen aquells que

Objectius

defineixen els haplotips majoritaris de la regió, localitzats en el gen AIB3, i s'han genotipat en les mostres utilitzades per a la consecució del primer objectiu.

2. Anàlisi de l'expressió dels gens DOR i AIB3 en diferents situacions patològiques i models animals de patologia

3 Generació d'un vector de reemplaçament del gen DOR per a la generació del ratolí *knock-out*

La generació d'aquest model animal haurà de permetre avaluar *in vivo* la validesa i rellevància dels resultats obtinguts en el primer objectiu i en altres estudis realitzats en el si del nostre grup.

Resultats

1. ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ GENÈTICA DELS GENS DOR I AIB3

1.1. Caracterització de la regió estudiada i selecció dels grups

El primer objectiu de la tesi era la consecució d'estudis d'associació genètica dels gens DOR i AIB3 en diferents grups de mostres. Donat que tècnicament era més senzill i que la proximitat dels dos gens feia preveure que podien estar en un fort desequilibri de lligament, es va decidir abordar l'estudi dels dos gens conjuntament. Així, es van seleccionar polimorfismes localitzats en els dos gens, es va avaluar el desequilibri de lligament entre ells, i es van seleccionar aquells que representaven millor el conjunt dels haplotips descrits. Aquests van ser els que es genotiparien posteriorment en els diferents grups.

El càlcul de les freqüències dels haplotips existents entre diferents polimorfismes, permet definir el desequilibri de lligament entre aquests. Aquesta informació, sumada a la informació de freqüències al·lèliques, dona una idea de la rellevància de la informació obtinguda per a cada al·lel. Així, dos polimorfismes en perfecte desequilibri de lligament i amb unes freqüències al·lèliques similars, donen una informació similar: si el primer associa amb un determinat tret, el segon també ho fa. És per això que al dissenyar un estudi d'associació és convenient definir el desequilibri de lligament entre els diferents polimorfismes seleccionats.

En referència amb el present estudi, en el cas de demostrar-se desequilibri de lligament entre els polimorfismes localitzats en els dos gens ens trobaríem davant de dos estudis d'associació estretament lligats, ja que els efectes observats en un polimorfisme localitzat en un dels gens, podria ser explicat per un polimorfisme en desequilibri de lligament localitzat en l'altre gen: en definitiva ens trobaríem davant d'un únic estudi d'associació de la regió compresa pels gens DOR i AIB3.

1.1.1. Selecció i avaluació de polimorfismes per a l'estudi d'associació dels gens DOR i AIB3

Per als estudis d'associació del gen DOR es van seleccionar polimorfismes provinents d'un estudi previ: La seqüenciació dels exons del gen DOR en 30 pacients diabètics, realitzada pel Dr. Bernhard Baumgartner, i que havia donat com a resultat la descripció de diferents polimorfismes localitzats en el gen (Figura 10). D'entre aquests, es van seleccionar aquells que podien ser analitzats mitjançant enzims de restricció: DOR1 (DOR -16), SNP4 (DOR 635) i SNP2 (DOR 751). Aquests polimorfismes eren SNPs que localitzen en la regió promotora, en el cas de DOR1, o en el primer intró, en el cas de SNP4 i SNP2.

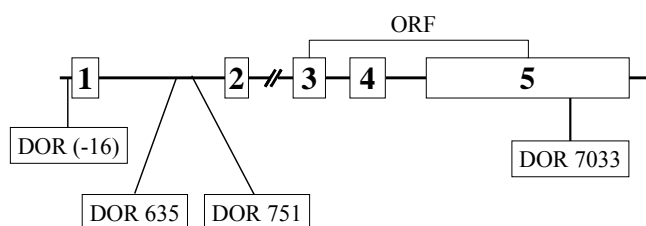


Figura 10. Polimorfismes localitzats en el gen DOR trobats en la seqüenciació del gen.

Posteriorment, aquests SNPs han aparegut a les bases de dades públiques amb els següents números de referència: DOR1: rs2378256; SNP4: rs910869; SNP2: rs910870.

Es van genotipar un total de 58 individus per els 3 polimorfismes i es van determinar les freqüències dels haplotips. Per tal d'avaluar el desequilibri de lligament es va calcular el coeficient $|D'|$ i la significació estadística del desequilibri de lligament. Paral·lelament, per avaluar el desequilibri de lligament en relació amb les freqüències al·lèliques*, es va calcular el paràmetre d^2 (Taula 3).

a)	Haplotip	f (%)	b)	Combinació	D'	d^2	p
	CCC	1		DOR1-SNP4	0.97	0.94-0.93	0.00000
	CTC	40		DOR1-SNP2	1.00	0.83-0.79	0.00000
	GCC	4		SNP4-SNP2	1.00	0.83-0.83	0.00000
	GCT	54					
	GTC	1					

Taula 3. a) Freqüència estimada dels haplotips entre els polimorfismes DOR1-SNP4-SNP2 b) Valors dels paràmetres $|D'|$ i d^2 entre les diferents comparacions dels polimorfismes.

Els resultats indiquen un fort desequilibri de lligament entre els 3 polimorfismes, amb $|D'|$ properes o iguals a 1 i d^2 superiors a 0.80 en la majoria dels casos, i amb dos haplotips majoritaris (quasi el 95%), qual cosa indica que la informació provinent dels 3 polimorfismes és essencialment la mateixa. Per aquest motiu, es va decidir prescindir de la genotipació dels polimorfismes SNP4 i SNP2 en favor de la genotipació de DOR1, ja que per la localització d'aquest semblava un millor candidat a provocar canvis funcionals (d'activitat del promotor).

A més del polimorfisme DOR1, es van seleccionar altres polimorfismes de les bases de dades públiques i de 'Celera': SNP9 (CV1265078; rs17551387), DOR5 (CV1265095; rs6579186), SNP5 (rs1884668), AIB6 (rs17092066), AIB1 (rs910872) i AIB7 (rs959829) (Figura 11); i es van genotipar per a poder estimar els haplotips i els paràmetres $|D'|$ i d^2 .

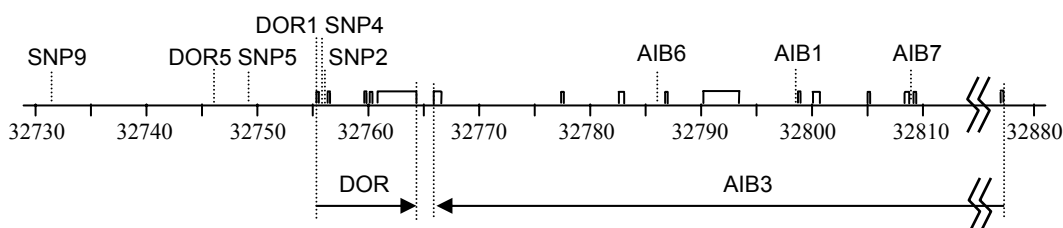


Figura 11. Posició dels polimorfismes estudiats. Els números corresponen a quilobases del cromosoma 20 humà en l'ensamblatge NCBI35. Les posicions dels gens DOR i AIB3 en aquest ensamblatge són: DOR, de 32755809 a 32764898 pb; i AIB3, de 32877094 a 32766240 pb.

* el paràmetre $|D'|$ és independent d'aquestes

Es van fer taules amb totes les combinacions de genotips existents entre els polimorfismes SNP9, DOR5, DOR1, AIB6, AIB1 i AIB7 en 95 individus no diabètics, i es van estimar les freqüències d'haplotips globals i locus per locus. Paral·lelament es van fer taules amb totes les combinacions de genotips existents entre els polimorfismes SNP9, DOR5, SNP5, DOR1, SNP4, AIB6, AIB1 i AIB7 en 49 dels individus anteriors, i es van fer les mateixes estimacions (Taula 4). A partir de les freqüències d'haplotips locus per locus obtingudes, es van calcular els paràmetres $|D'|$ i d^2 . Els resultats es mostren a la Figura 12. També es va calcular la significació estadística del desequilibri de lligament per a cada comparació i així es va observar que aquest és significatiu en tots els casos.

Els resultats indiquen que els polimorfismes estudiats estan en un fort desequilibri de lligament entre ells, amb $|D'|$ superiors a 0.70 en quasi tots els casos. Això indica que la regió (de més de 100 kb) s'hereda preferentment en bloc. A més, també s'observa que en referència al coeficient d^2 els valors resulten en general inferiors, el que suggereix que en general els polimorfismes estudiats són singulars, i que per tant, la informació que es pot obtenir d'aquests serà diferent per a cada un d'ells. En el cas del polimorfisme SNP4 s'observa que està en fort desequilibri de lligament i que té una distribució dels al·lels similar al polimorfisme DOR1 ($d^2=0.97-0.96$), per tant, la informació que obtinguem d'un i altre polimorfisme serà molt semblant. Com ja s'ha comentat, quan s'observen les freqüències d'haplotips entre els polimorfismes DOR1 i SNP4 es veu com els 2 haplotips majoritaris representen el 94% de les combinacions possibles. Per tant, es va decidir prescindir de la genotipació de SNP4.

De forma similar, SNP5 està en fort desequilibri de lligament i té una distribució dels al·lels similar a

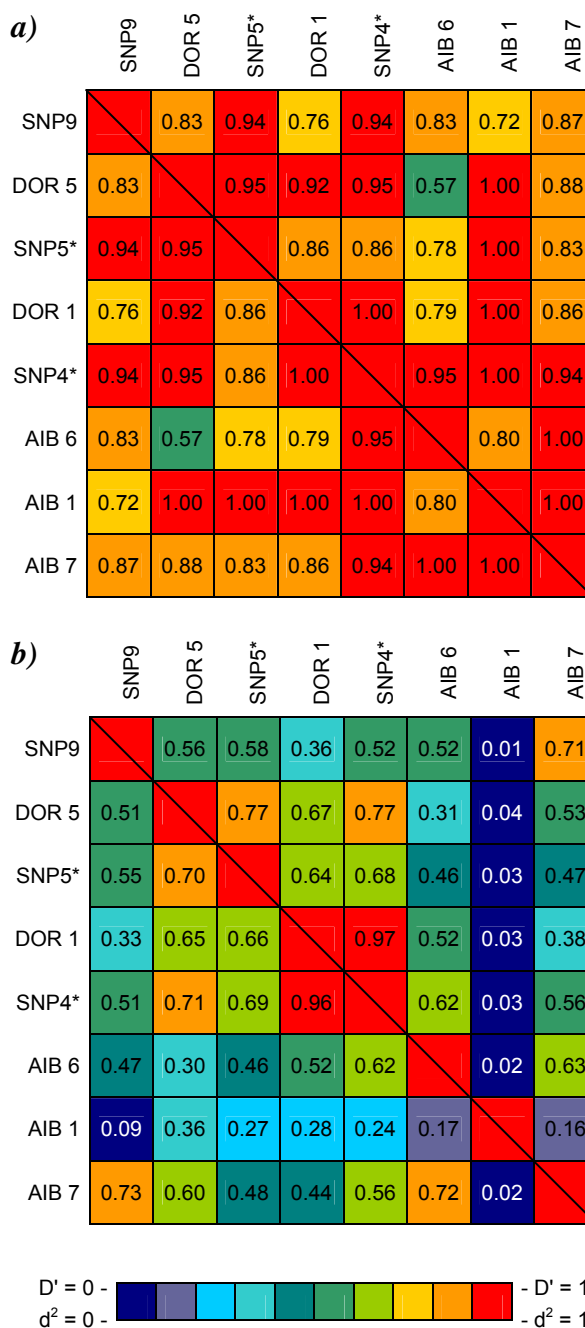


Figura 12. Desequilibri de lligament entre els diferents polimorfismes estudiats en 95 individus*. a) Valors de $|D'|$ en una escala de colors. b) Valors de d^2 en la mateixa escala. *per a SNP5 i SNP4 el n° d'individus utilitzats és de 49.

DOR5 ($d^2=0.77-0.70$). Quan s'observen les freqüències dels haplotips majoritaris entre DOR5 i SNP5 s'observa que aquestes representen el 92% de totes les combinacions possibles. Tot i que la similitud entre DOR5 i SNP5 no és tan bona com entre SNP4 i DOR1, es va descartar la genotipació de SNP5 perquè a més resultava tècnicament més complexe (us de gels d'acrilamida en comptes d'agarosa).

De manera similar es va decidir també prescindir de la genotipació de SNP9, ja que els valors de desequilibri de lligament amb AIB7 donen valors elevats ($d^2=0.73-0.71$), pel que mantenint AIB7 es podien representar la majoria dels haplotips existents entre els polimorfismes.

Entre els polimorfismes seleccionats també s'observen valors de desequilibri de lligament molt elevats (DOR5-DOR1 i AIB6-AIB7), tot i que les diferències en el valor de d^2 són lleugerament més pronunciades. En tot cas no es va voler excloure més polimorfismes de l'estudi perquè el tenir polimorfismes en fort desequilibri de lligament permetia d'alguna manera replicar la genotipació: Els resultats obtinguts per a un polimorfisme, en el cas de ser efectes notables, podrien veure's reflectits en els resultats d'un altre polimorfisme en fort desequilibri de lligament.

a) Haplotip	f (%)	Haplotip	f (%)	b) Genotips	f (%)
CCCCC	2	CCGCT	43	HHHCH	27
GCCCC	1	CGCCC	1	CCGCT	15
GCGCT	2	CGCCT	7	GGCCC	15
GGCCC	34	CGGCT	1	GGHHH	9
GGGTT	1	GGCTT	1	HHGHT	8
CCCCT	2	GGGTT	8	CHHCT	6

Taula 4. a) Freqüència estimada dels haplotips existents entre els polimorfismes DOR5-DOR1-AIB6-AIB1-AIB7. b) Freqüència de les combinacions de genotips.

També es van provar altres polimorfismes de les bases de dades localitzats en el gen DOR, però, o bé no eren polimòrfics, o bé tenien un comportament similar als ja estudiats (és a dir $|D'|$ i d^2 propera a 1 amb algun dels polimorfismes).

Paral·lelament als estudis d'associació genètica es van analitzar més polimorfismes localitzats en el gen AIB3. Amb aquesta finalitat es van buscar polimorfismes al llarg del gen en la base de dades de 'Celera'. La informació obtinguda es va processar amb el programa 'SNP Transformer' per a determinar quins SNPs eren analitzables per digestió amb un enzim de restricció i per quin enzim es podien analitzar.

Un cop obtinguda aquesta informació es va dissenyar una estratègia de genotipació que permetia analitzar més d'un SNP per cada producte de PCR amplificat. D'aquesta manera es podien genotipar un total de 9 SNPs: CV1207894, CV1207891, CV1207869, CV1207872, CV1207864, CV11189436, CV1207855, CV2988250, CV2988252.

Es van dissenyar encebadors específics i es van posar a punt les estratègies de genotipació. En alguns casos es va haver de dissenyar nous encebadors, per tal d'amplificar en dues rondes (veure 'Material i mètodes: VI.2 Genotipació de polimorfismes dels gens DOR i AIB3', pàgina 133).

Es van genotipar 30 individus per als polimorfismes seleccionats, i per a DOR1, AIB1, AIB6 i AIB7, i amb els resultats es van calcular les freqüències d'haplotips i es van estimar els coeficients $|D'|$ i d^2 . Els resultats es mostren a la Taula 5, i indiquen que, a excepció del polimorfisme rs2425005, la resta de polimorfismes es troben en un fort desequilibri de lligament amb algun dels polimorfismes AIB. A més, en la genotipació, es va veure que el polimorfisme CV1207872 no era polimòrfic en la població estudiada.

Amb aquests resultats es va decidir no afegir nous polimorfismes a l'estudi de genotipació i estudiar únicament els polimorfismes DOR5, DOR1, AIB6, AIB1 i AIB7.

CV	1207899		1207894	1207891	1207887
rs	17092066	910872	17092080	2378259	959829
posició*	32786501	32798201	32799318	32805349	32809708
nom	AIB6	AIB1	-	-	AIB7

AIB6	$ D' $	-	0.85	0.85	1.00	1.00
	d^2	-	0,23-0,02	0,23-0,02	1,00-1,00	0,74-0,69
AIB7	$ D' $	1.00	1.00	1.00	1.00	-
	d^2	0,74-0,69	0,21-0,02	0,21-0,02	0,74-0,69	-
AIB1	$ D' $	0.85	-	1.00	0.85	1.00
	d^2	0,23-0,02	-	1,00-1,00	0,23-0,02	0,21-0,02

LD amb			AIB1	AIB6	
--------	--	--	------	------	--

CV	1207869	11189436	1207855	2988250	2988252
rs	6060044	4911444	6060051	6087633	2425005
posició*	32828513	32842109	32842413	32871798	32871376
nom	-	-	-	-	-

AIB6	$ D' $	0.85	1.00	1.00	1.00	0.92
	d^2	0,23-0,02	1,00-1,00	1,00-1,00	0,74-0,69	0,78-0,78
AIB7	$ D' $	1.00	1.00	1.00	1.00	0.93
	d^2	0,21-0,02	0,74-0,69	0,74-0,69	1,00-1,00	0,81-0,81
AIB1	$ D' $	1.00	0.85	0.85	1.00	1.00
	d^2	1,00-1,00	0,23-0,02	0,23-0,02	0,21-0,02	0,04-0,02

LD amb	AIB1	AIB6	AIB6	AIB7	-
--------	------	------	------	------	---

Taula 5. Valor dels coeficients $|D'|$ i d^2 dels polimorfismes seleccionats amb els polimorfismes AIB6, AIB1 i AIB7. S'indiquen els polimorfismes AIB i el desequilibri de lligament amb cada un dels polimorfismes avaluats. *posició en l'ensamblatge NCBI35.

1.1.2. Grups genotipats en els estudis d'associació genètica

Amb els polimorfismes seleccionats es va iniciar la genotipació de diferents grups d'individus. Es van plantejar 3 tipus d'estudis:

1. Associació genètica amb diabetis de tipus 2
2. Associació genètica amb obesitat
3. Associació genètica amb retràs del creixement intrauterí (RCI)

En els dos primers estudis es van utilitzar mostres provinents dels hospitals 'Josep Trueta' de Girona, 'Joan XXIII' de Tarragona, i 'Carlos Haya' de Màlaga. Es van recollir mostres de DNA de 542 individus no diabètics, 188 dels quals tenien un ÍMC inferior a 25, i 655 individus amb diabetis de tipus 2. Tots els individus tenien un ÍMC<40, per tal d'excloure individus amb obesitat mòrbida. En el cas de les mostres provinents de l'hospital 'Josep Trueta' de Girona es disposava d'informació clínica d'algunes d'aquestes. Els detalls dels criteris de selecció dels individus es detallen a 'Material i mètodes: I.2.1 Estudis d'associació genètica' (pàgina 94). Per al tercer estudi es van utilitzar mostres provinents de l'hospital 'Josep Trueta' de Girona.

En totes aquestes mostres es van genotipar els polimorfismes SNP9, DOR5, DOR1, AIB6, AIB1 i AIB7 (en col·laboració amb el Dr. Bernhard Baumgartner per als SNPs DOR i amb l'ajuda de la tècnica Ruth Pareja) segons el procediment descrit a 'Material i mètodes: VI.2 Genotipació de polimorfismes dels gens DOR i AIB3' (pàgina 133). En el cas de les mostres del tercer estudi, però, únicament es van genotipar els polimorfismes AIB6, AIB1, i AIB7.

1.2. Resultats dels estudis d'associació genètica amb diabetis de tipus 2 i amb obesitat

Els resultats que es mostren a continuació provenen dels estudis d'associació genètica en individus amb diabetis de tipus 2 i en individus obesos. Tot i que els resultats es mostren de forma independent, aquests dos estudis són de fet un de sol. Per a l'estudi d'associació amb obesitat s'ha utilitzat el grup de individus no diabètics del primer estudi, separant els individus d'aquest segons tinguin l'ÍMC inferior o igual a 25 (grup normopes), o superior a 25 (grup de sobrepes i obesitat).

Per tal de fer més clara la presentació dels resultats, aquests es mostren separats en dues seccions: en la primera es mostren, per a cada SNP genotipat, els valors de freqüències de cada genotip i al·lels per a cada grup; i en la segona es mostren correlacions dels diferents polimorfismes amb paràmetres clínics dels pacients estudiats, agrupant els polimorfismes en conjunt i presentant els resultats paràmetre a paràmetre. A més, també s'inclouen a resultats suplementaris les freqüències dels SNPs en tots els grups separats segons l'ÍMC, així com l'estadística associada a aquestes freqüències (Taula 31 i Taula 53).

1.2.1. Distribució de freqüències

Polimorfisme DOR5

El polimorfisme DOR5 va ser genotipat en 437 individus no diabètics i en 516 individus diabètics de tipus 2. En els dos grups, la distribució de freqüències genotípiques es troba en equilibri Hardy-Weingberg (No diabètics: $\chi^2=1.100$, $p=0.577$; Diabètics: $\chi^2=0.9959$, $p=0.6078$).

Els resultats (Taula 6) indiquen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els dos grups.

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
No diabètic	437	0.51 (445)	0.49 (429)	0.28 (121)	0.46 (203)	0.26 (113)
Diabètic	516	0.48 (496)	0.52 (536)	0.25 (127)	0.47 (242)	0.28 (147)
Test χ^2		p=0.214		p=0.479		

Taula 6. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme DOR5 en individus no diabètics i diabètics de tipus 2. Entre parèntesi s'indiquen els números absoluts d'individus per a cada al·lel i genotip.

Quan aquest mateix anàlisi es fa únicament amb el grup no diabètic, distribuint els individus en dos grups segons el seu índex de massa corporal, no s'observen diferències significatives en les freqüències al·lèliques i genotípiques entre els dos grups (Taula 7).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
ÍMC \leq 25	143	0.49 (179)	0.51 (129)	0.23 (33)	0.51 (73)	0.26 (37)
ÍMC $>$ 25	294	0.52 (306)	0.48 (282)	0.30 (88)	0.44 (130)	0.26 (76)
Test χ^2		p=0.340		p=0.273		

Taula 7. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme DOR5 en individus amb un ÍMC inferior o igual a 25 kg/m² i en individus amb un ÍMC superior a 25 i inferior a 40 kg/m².

Polimorfisme DOR1

El polimorfisme DOR1 va ser genotipat en 491 individus no diabètics i en 366 individus diabètics de tipus 2. En els dos grups, la distribució de freqüències genotípiques es troba en equilibri Hardy-Weingberg (No diabètics: $\chi^2=0.2435$, $p=0.8854$; Diabètics: $\chi^2=2.213$, $p=0.3308$).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
No diabètic	491	0.59 (575)	0.41 (407)	0.35 (172)	0.47 (231)	0.18 (88)
Diabètic	366	0.59 (432)	0.41 (300)	0.37 (137)	0.43 (158)	0.19 (71)
Test χ^2		p=0.848		p=0.528		

Taula 8. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme DOR1 en individus no diabètics i diabètics de tipus 2. Entre parèntesi s'indiquen els números absoluts d'individus per a cada al·lel i genotip.

Els resultats (Taula 8) indiquen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els dos grups.

Quan aquest mateix anàlisi es fa únicament amb el grup no diabètic, distribuint els individus en dos grups segons el seu índex de massa corporal, no s'observen diferències significatives en les freqüències al·lèliques i genotípiques entre els dos grups (Taula 9).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
ÍMC≤25	176	0.57 (202)	0.43 (150)	0.31 (54)	0.53 (94)	0.16 (28)
ÍMC>25	315	0.59 (373)	0.41 (257)	0.37 (118)	0.43 (137)	0.19 (60)
Test χ^2		0.579		0.107		

Taula 9. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme DOR1 en individus amb un ÍMC inferior o igual a 25 kg/m² i en individus amb un ÍMC superior a 25 i inferior a 40 kg/m².

Els resultats (Taula 9) indiquen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els dos grups. Ara bé, si s'estudia l'estadística dels diferents genotips per separat s'observa que la diferència de freqüències del genotip GC entre els dos grups és significativa (Taula 10).

Genotip	ÍMC≤25	ÍMC>25	OR	CI	p
GG	54	118	1.29	0.85-1.94	0.206
GC	94	137	0.67	0.46-0.99	0.035
CC	28	60	1.24	0.74-2.10	0.385

Taula 10. Valors de odds ratio (OR), intervals de confiança (CI), i p del test χ^2 per a cada genotip del polimorfisme DOR1 individus amb un ÍMC≤25 i un ÍMC>25.

Polimorfisme AIB6

Aquest polimorfisme va ser genotipat en 459 individus no diabètics i en 478 individus diabètics de tipus 2. En els dos grups, la distribució de freqüències genotípiques es troba en equilibri Hardy-Weingberg (No diabètics: $\chi^2=0.02745$, $p=0.9864$; Diabètics: $\chi^2=3.384$, $p=0.1842$).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
No diabètic	459	0.53 (488)	0.47 (430)	0.29 (131)	0.49 (226)	0.22 (102)
Diabètic	478	0.56 (537)	0.44 (419)	0.35 (165)	0.43 (207)	0.22 (106)
Test χ^2		p=0.190		p=0.109		

Taula 11. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB6 en individus no diabètics i diabètics de tipus 2. Entre parèntesi s'indiquen els números absoluts d'individus per a cada al·lel i genotip.

Els resultats (Taula 11) no mostren diferències estadísticament significatives entre els dos grups, ara bé, quan s'analitzen els diferents genotips per separat s'observa que la diferència de freqüències del genotip GG entre els dos grups és significativa (Taula 12).

Genotip	No diabètic	Diabètic	OR	CI	p
GG	131	165	1.32	0.99-1.76	0.049
GC	226	207	0.79	0.60-1.03	0.069
CC	102	106	1.00	0.72-1.37	0.986

Taula 12. Valors de odds ratio (OR), intervals de confiança (CI), i p del test χ^2 per a cada genotip del polimorfisme AIB6 entre individus no diabètics i individus diabètics de tipus 2.

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
a) No diabètic	282	0.53 (300)	0.47 (264)	0.31 (86)	0.45 (128)	0.24 (68)
Diabètic	253	0.54 (272)	0.46 (234)	0.32 (81)	0.44 (110)	0.25 (62)
Test χ^2		0.854		0.897		
b) No diabètic	174	0.53 (185)	0.47 (163)	0.26 (45)	0.55 (95)	0.20 (34)
Diabètic	216	0.59 (256)	0.41 (176)	0.38 (82)	0.43 (92)	0.19 (42)
Test χ^2		0.088		0.027		

Taula 13. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB6 en individus no diabètics i en individus amb diabetis de tipus 2, separats segons el sexe: a) homes, b) dones.

Al fer un anàlisi més profund dels resultats, s'observa que al diferenciar els resultats entre sexes, l'associació observada en obesitat prové del grup de dones (Taula 13).

Quan s'analitzen els diferents genotips per separat, en el grup de dones, s'observa que la diferència de freqüències dels genotips GG i GC entre els dos grups és significativa (Taula 14).

Genotip	No diabètic	Diabètic	OR	CI	p
GG	45	82	1.75	1.11-2.78	0.011
GC	95	92	0.62	0.40-0.94	0.018
CC	34	42	0.99	0.58-1.70	0.981

Taula 14. Valors de odds ratio (OR), intervals de confiança (CI), i p del test χ^2 per a cada genotip del polimorfisme AIB6 entre dones no diabètiques i dones amb diabetis de tipus 2.

Quan s'analitzen les diferències en el grup no diabètic, distribuint els individus en dos grups segons el seu índex de massa corporal, no s'observen diferències significatives en les freqüències al·lèliques i genotípiques entre els dos grups (Taula 15).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		G	C	GG	GC	CC
ÍMC ≤ 25	165	0.50 (165)	0.50 (165)	0.24 (40)	0.52 (85)	0.24 (40)
ÍMC > 25	294	0.55 (323)	0.45 (265)	0.31 (91)	0.48 (141)	0.21 (62)
Test χ^2		0.151		0.299		

Taula 15. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB6 en individus amb un ÍMC inferior o igual a 25 kg/m² i en individus amb un ÍMC superior a 25 i inferior a 40 kg/m².

Polimorfisme AIB1

Aquest polimorfisme va ser genotipat en 504 individus no diabètics i en 618 individus diabètics de tipus 2. En els dos grups, la distribució de freqüències genotípiques es troba en equilibri Hardy-Weingberg (No diabètics: $\chi^2=0.003617$, $p=0.9982$; Diabètics: $\chi^2=0.05864$, $p=0.9711$).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		C	T	CC	CT	TT
No diabètic	504	0.88 (884)	0.12 (124)	0.77 (388)	0.21 (108)	0.02 (8)
Diabètic	618	0.87 (1071)	0.13 (165)	0.75 (465)	0.23 (141)	0.02 (12)
Test χ^2		p=0.461		p=0.761		

Taula 16. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB1 en individus no diabètics i diabètics de tipus 2. Entre parèntesi s'indiquen els números absoluts d'individus per a cada al·lel i genotip.

Els resultats (Taula 16) indiquen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els dos grups. Ara bé, quan aquest mateix anàlisi es fa únicament amb el grup no diabètic, distribuint els individus en dos grups segons el seu índex de massa corporal, no s'observen diferències significatives en les freqüències al·lèliques i genotípiques entre els dos grups (Taula 17), si bé en la comparació de les freqüències genotípiques el valor de p del test χ^2 s'acosta a 0.05.

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		C	T	CC	CT	TT
ÍMC \leq 25	179	0.90 (323)	0.10 (35)	0.82 (147)	0.16 (29)	0.02 (3)
ÍMC $>$ 25	325	0.86 (561)	0.14 (89)	0.74 (241)	0.24 (79)	0.02 (5)
Test χ^2		0.105		0.070		

Taula 17. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB1 en individus amb un ÍMC inferior o igual a 25 kg/m² i en individus amb un ÍMC superior a 25 i inferior a 40 kg/m².

Quan s'analitzen els diferents genotips per separat s'observa que la diferència de freqüències dels genotips CC i CT entre els dos grups és significativa (Taula 18), observant-se una disminució de la freqüència del genotip CC en els individus amb un ÍMC superior, i un increment de la freqüència del genotip CT en aquests mateixos individus.

Genotip	ÍMC \leq 25	ÍMC $>$ 25	OR	CI	p
CC	147	241	0.62	0.39-1.01	0.042
CT	29	79	1.66	1.01-2.74	0.034
TT	3	5	0.92	0.19-4.89	0.906

Taula 18. Valors de odds ratio (OR), intervals de confiança (CI), i p del test χ^2 per a cada genotip del polimorfisme AIB1 entre individus amb normopes i individus amb sobrepes o obesitat.

Quan s'analitzen les mitjanes d'ÍMC per a cada genotip, no es veuen diferències significatives en conjunt, i tampoc al agrupar els portadors d'al·lel T (n=105, mitja±error=29.05±0.486; p=0.065) (Taula 19), tot i que sembla observar-se una tendència en el sentit de tenir una mitjana d'ÍMC superior en els individus portadors de l'al·lel T.

Genotip	n	mitjana±error	p
CC	348	28.05±0.260	0.183
CT	98	29.05±0.494	
TT	7	29.00±2.523	

Taula 19. Valors de mitjanes i desviació estàndard d'ÍMC segons el genotip d'AIB1. Es mostra el valor de p corresponent a un test ANOVA.

Si es fa un anàlisi amb més profunditat dels resultats d'AIB1, s'observa que al diferenciar els resultats entre sexes, l'associació observada en obesitat per als genotips CC i CT prové del grup de dones (Taula 20). A més, quan en el grup de dones s'analitzen els diferents genotips per separat, s'observa que la diferència de freqüències dels genotips CC i CT entre els dos grups és significativa (Taula 21). Com s'observava al analitzar totes les mostres, la freqüència del genotip CC està disminuïda en dones amb un ÍMC superior a 25, mentre que la freqüència del genotip CT està augmentada en aquest grup.

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		C	T	CC	CT	TT
a) ÍMC≤25	122	0.89 (218)	0.11 (26)	0.80 (97)	0.20 (24)	0.01 (1)
ÍMC>25	177	0.87 (309)	0.13 (45)	0.77 (136)	0.21 (37)	0.02 (4)
Test χ^2		0.445		0.602		
b) ÍMC≤25	54	0.92 (99)	0.08 (9)	0.87 (47)	0.09 (5)	0.04 (2)
ÍMC>25	135	0.85 (230)	0.15 (40)	0.71 (96)	0.28 (38)	0.01 (1)
Test χ^2		0.090		0.009		

Taula 20. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB1 en individus amb un ÍMC inferior o igual a 25 kg/m² i en individus amb un ÍMC superior a 25 i inferior a 40 kg/m², separats segons el sexe: a) homes, b) dones.

Genotip	ÍMC≤25	ÍMC>25	OR	CI	p
CC	47	96	0.37	0.13-0.92	0.021
CT	5	38	3.84	1.38-13.2	0.005
TT	2	1	-	-	-

Taula 21. Valors de odds ratio (OR), intervals de confiança (CI), i p del test χ^2 per a cada genotip del polimorfisme AIB1 entre dones amb un ÍMC≤25 i dones amb un ÍMC>25.

Quan s'analitzen les mitjanes d'ÍMC per a cada genotip, es veuen diferències significatives en conjunt, i a més al agrupar els portadors d'al·lel T (n=44, mitja±error=30.99±0.784), les diferències valorades amb un test t de Student també són significatives (p=0.037) (Taula 22).

Genotip	n	mitjana±error	p
CC	136	29.03±0.467	0.021
CT	41	31.40±0.763	
TT	3	25.46±4.272	

Taula 22. Valors de mitjanes i desviació estàndard d'ÍMC en dones segons el genotip d'AIB1. Es mostra el valor de p corresponent a un test ANOVA.

Ara bé, quan es fa un anàlisi de regressió multivariable introduïnt l'edat i AIB1 com a variables independents, l'única variable predictora és l'edat, pel que sembla que l'associació observada és deguda a diferències en les mitjanes d'edat entre els diferents genotips.

Polimorfisme AIB7

Aquest polimorfisme va ser genotipat en 462 individus no diabètics i en 515 individus diabètics de tipus 2. En els dos grups, la distribució de freqüències genotípiques es troba en equilibri Hardy-Weingberg (No diabètics: $\chi^2=1.431$, $p=0.4890$; Diabètics: $\chi^2=0.6246$, $p=0.7318$).

Els resultats (Taula 23) indiquen que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els dos grups.

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		C	T	CC	CT	TT
No diabètic	462	0.40 (371)	0.60 (553)	0.18 (83)	0.44 (205)	0.38 (174)
Diabètic	515	0.38 (393)	0.62 (637)	0.16 (81)	0.45 (231)	0.39 (203)
Test χ^2		p=0.367		p=0.627		

Taula 23. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB7 en individus no diabètics i diabètics de tipus 2. Entre parèntesi s'indiquen els números absoluts d'individus per a cada al·lel i genotip.

Quan aquest mateix anàlisi es fa únicament amb el grup no diabètic, distribuïnt els individus en dos grups segons el seu índex de massa corporal, no s'observen diferències significatives en les freqüències al·lèliques i genotípiques entre els dos grups (Taula 24).

Grup	n	Freqüències al·lèliques		Freqüències genotípiques		
		C	T	CC	CT	TT
ÍMC≤25	170	0.40 (137)	0.60 (203)	0.17 (29)	0.42 (72)	0.36 (62)
ÍMC>25	292	0.40 (234)	0.60 (350)	0.18 (54)	0.43 (126)	0.38 (112)
Test χ^2		0.946		0.782		

Taula 24. Freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme AIB7 en individus amb un ÍMC inferior o igual a 25 kg/m² i en individus amb un ÍMC superior a 25 i inferior a 40 kg/m².

2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS DOR I AIB3

Amb l'objectiu d'entendre la regulació dels gens AIB3 i DOR es va estudiar l'expressió d'aquests gens en mostres de múscul esquelètic i de teixit adipós, d'individus amb diferents fenotips, així com de diferents models animals.

2.1.1. Quantificació relativa dels gens DOR i AIB3 en mostres humanes de múscul esquelètic i teixit adipós blanc

En el laboratori del Dr. Hubert Vidal, del 'Centre de Recherche en Nutrition Humaine de la Faculté de Médecine R.T.H. Laennec' (Lyon, França), es va valorar l'expressió dels gens DOR i AIB3 en mostres provinents de biòpsies de múscul esquelètic fetes en voluntaris (en les que es va valorar l'expressió de DOR i d'AIB3) i de teixit adipós blanc (en les que es va valorar l'expressió de DOR). En aquest conjunt de mostres, les quals es descriuen amb més detall a 'Material i mètodes: I.2.2 Estudis de quantificació de RNA missatger de múscul esquelètic humà' (pàgina 96), es va valorar l'expressió d'aquests gens per PCR a temps real segons es descriu a 'Material i mètodes: VI.3.1 Quantificació relativa dels transcrits del gen DOR i AIB3 per PCR a temps real' (pàgina 138), i relativitzant l'expressió per l'expressió de ciclofilina A. Aquestes mostres provenien d'individus control, no diabètics i amb un pes normal, d'individus obesos no diabètics, i d'individus diabètics, i es disposava de dades clíniques, amb les quals es podia estudiar correlacions entre l'expressió d'aquests gens i aquests paràmetres.

Expressió relativa de DOR en múscul esquelètic humà

L'estudi més extens en aquestes mostres es va fer amb el gen DOR. Per a aquest es va valorar l'expressió relativa del gen en múscul esquelètic i en teixit adipós blanc, d'individus control, d'individus obesos, i d'individus diabètics de tipus 2.

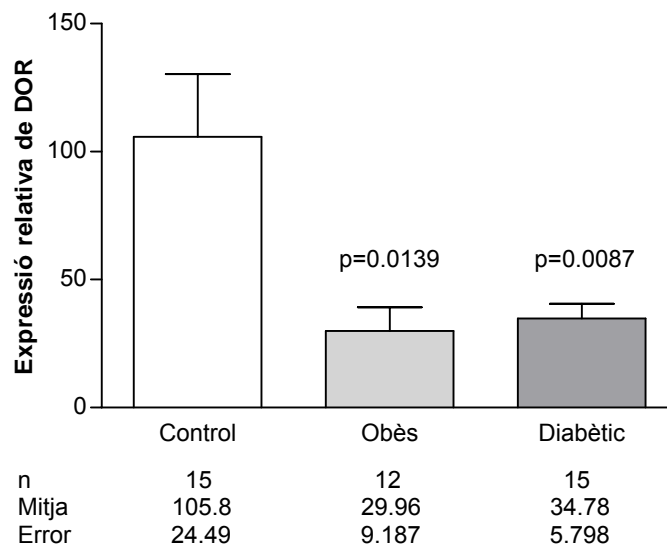


Figura 13. Expressió relativa del gen DOR (en unitats arbitràries) en múscul esquelètic en diferents grups d'individus. Es mostren els valors de mitja i error estàndard.

En el cas de múscul esquelètic es va valorar l'expressió del gen en 15 mostres d'individus control (10 dones i 5 homes), 12 mostres d'obesos (10 dones i 2 homes), i 15 mostres de diabètics de tipus 2 (9 dones i 6 homes) (Figura 13).

Els resultats mostren com l'expressió del gen DOR en múscul esquelètic humà està disminuïda tant en obesitat com en diabetis de tipus 2: Tant en la mostra d'obesos, com en la de diabètics, s'observa una disminució de l'expressió mitja del gen DOR d'aproximadament el 70 %. Aquests resultats confirmen estudis anteriors realitzats pel Dr. Daniel Bach en col·laboració amb el Dr. Hubert Vidal, que demostraven una disminució del gen DOR similar a la observada en el grup d'obesos, i al voltant del 50% en el grup de diabètics.

Quan s'analitzen correlacions entre l'expressió de DOR i els diferents paràmetres clínics valorats en aquest grup de mostres, s'observen resultats positius per a alguns d'aquests paràmetres. Així, en individus no diabètics, s'observa una correlació negativa entre l'ÍMC i l'expressió de DOR ($p=0.049$, $r^2=0.1459$; Figura 14), que concorda amb la disminució de l'expressió observada entre el grup control i l'obès (Figura 13). Aquesta correlació es manté quan s'inclouen els diabètics ($p=0.013$, $r^2=0.1441$).

Observant la figura es pot veure a més, com les mostres amb més expressió es localitzen en el grup control, amb diferències d'expressió entre individus força notables (de 53 vegades entre l'individu amb menor expressió i el de més alta).

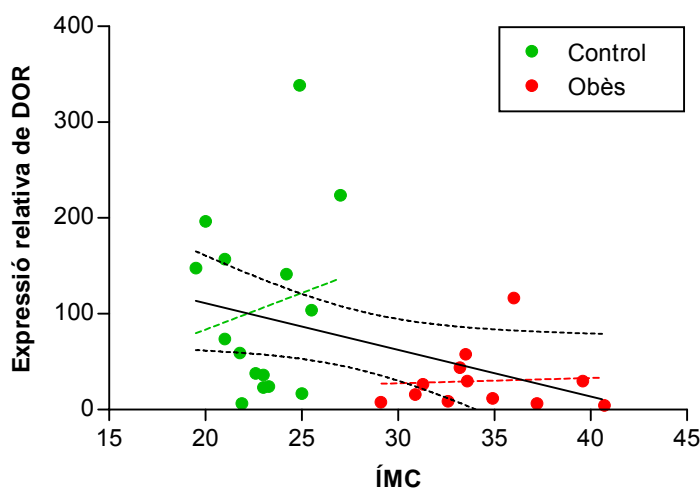


Figura 14. Correlació entre l'expressió de DOR en múscul esquelètic humà i l'índex de massa corporal en individus no diabètics. L'expressió de DOR és relativa a ciclofilina i s'expressa en unitats arbitràries, l'índex de massa corporal en kg/m^2 . Es mostren les rectes corresponents a les regressions lineals pel grup control, el grup obès, així com pel conjunt dels dos (en negre). Per a aquesta última es mostren els intervals de confiança al 95%.

Igualment, també s'observa una correlació positiva entre l'expressió del gen DOR i l'oxidació de glucosa en individus no diabètics ($p=0.022$, $r^2=0.1916$; Figura 15 gràfic superior). Aquesta correlació és manté al afegir el grup diabètic en el càlcul ($p=0.049$,

$r^2=0.0936$) si bé en aquest grup la tendència sembla l'oposada (Figura 15 gràfic inferior).

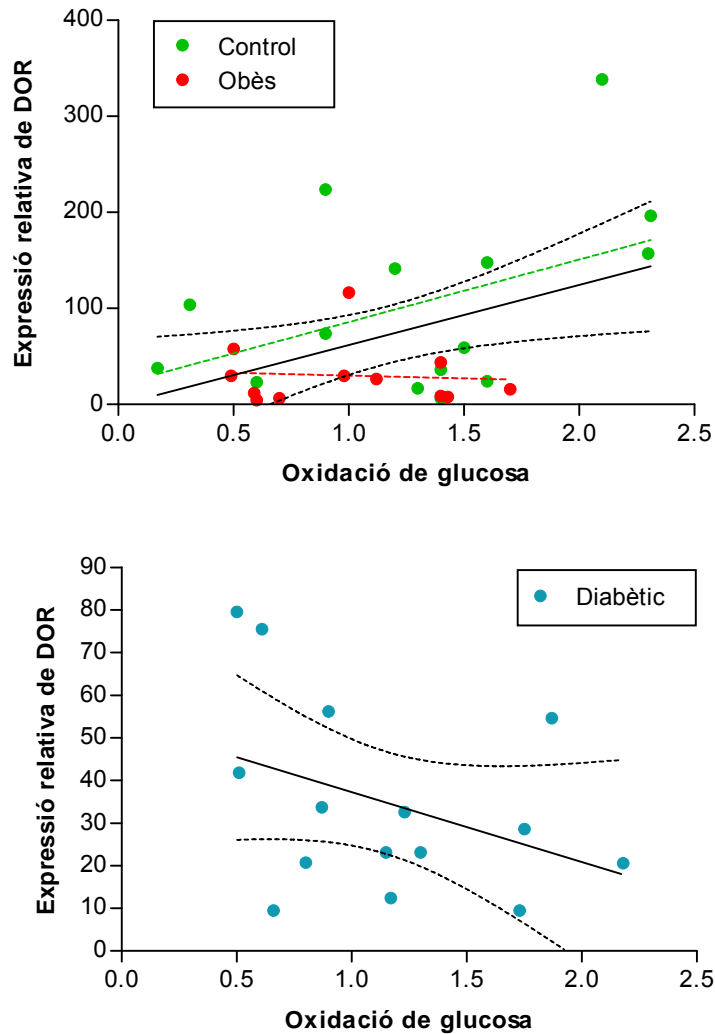


Figura 15. Correlació entre l'expressió de DOR en múscul esquelètic i l'oxidació de glucosa en individus no diabètics (superior) i en individus diabètics (inferior). L'expressió de DOR és relativa a ciclofilina A i s'expressa en unitats arbitràries, l'oxidació de glucosa en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Es mostren les rectes corresponents a les regressions lineals per a cada grup, així com per el conjunt dels dos en la part superior de la figura (en negre). Per a aquesta última i la corresponent a la part inferior de la figura es mostren els intervals de confiança al 95%.

Si únicament s'analitza el grup control es troben noves correlacions (Figura 16): una correlació positiva amb la concentració d'insulina basal ($p=0.019$, $r^2=0.355$), i correlacions negatives amb utilització de glucosa després d'un clamp euglucèmic hiperinsulinèmic ($p=0.018$, $r^2=0.359$), i l'estoc ($p=0.030$, $r^2=0.315$).

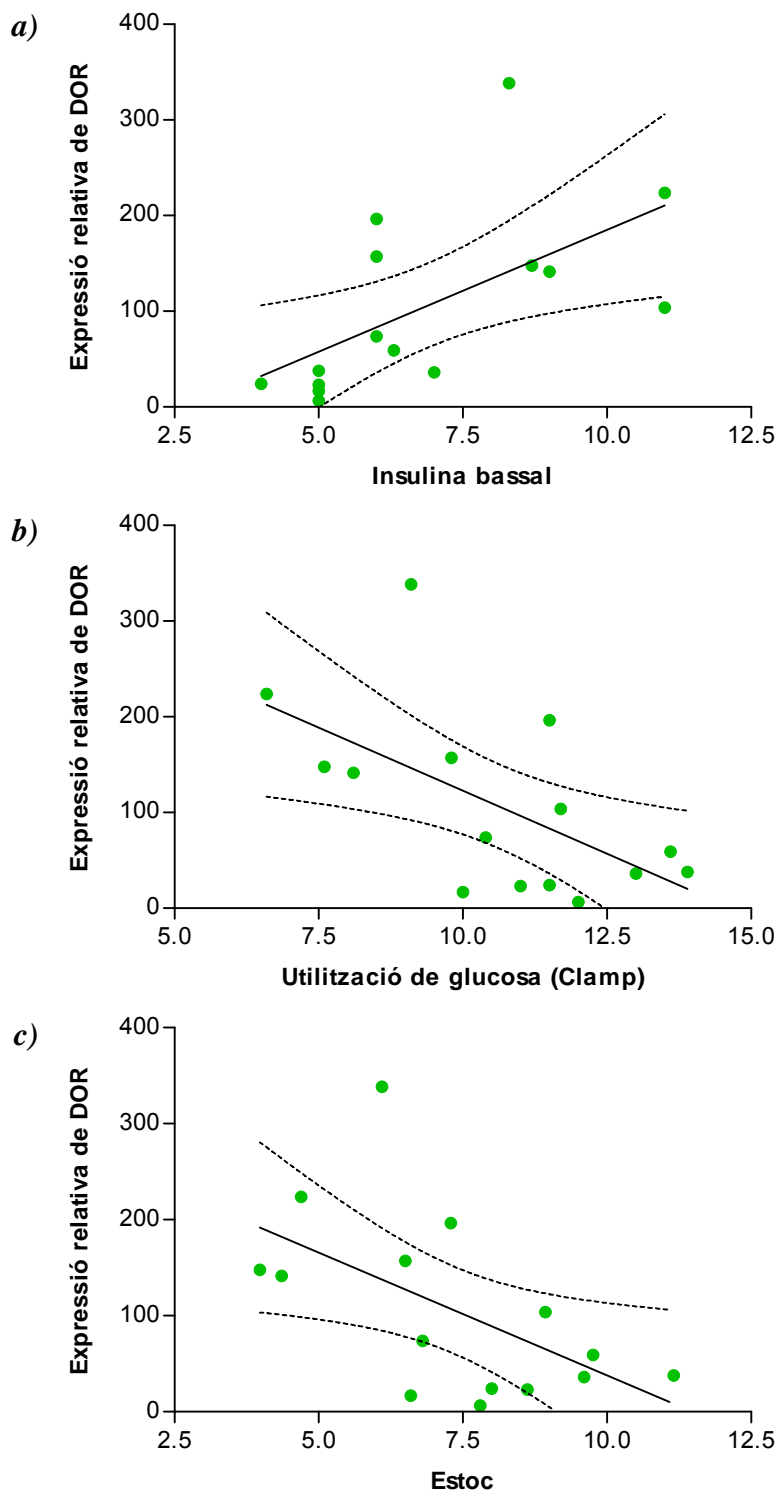


Figura 16. Correlació entre l'expressió de DOR en múscul esquelètic humà d'individus no diabètics i amb un ÍMC inferior a 28 i a) insulina basal; b) utilització de glucosa després d'un clamp euglucèmic hiperinsulinèmic; c) l'estoc. L'expressió de DOR és relativa a ciclofilina i s'expressa en unitats arbitràries, la insulina basal en mUI/l, i la utilització de glucosa i l'estoc en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Es mostren les rectes corresponents a les regressions lineals i els intervals de confiança al 95%.

Expressió relativa de DOR en teixit adipós blanc humà

En teixit adipós blanc, l'expressió del gen DOR es va valorar en 10 mostres d'individus control (7 dones i 3 homes), 10 mostres d'obesos (7 dones i 3 homes), i 10 mostres de diabètics de tipus 2 (3 dones i 7 homes) (Figura 17).

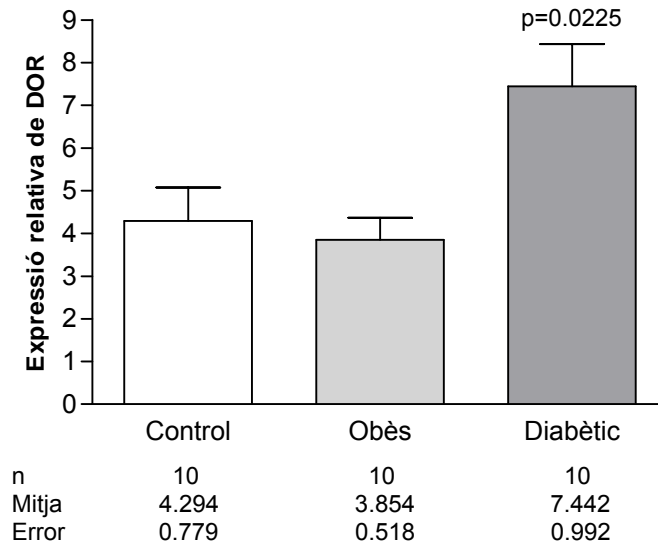


Figura 17. Expressió relativa del gen DOR (en unitats arbitràries) en teixit adipós blanc en diferents grups d'individus. Es mostren els valors de mitja i error estàndard.

Els resultats indiquen un increment d'expressió del gen DOR en el grup de diabètics de quasi un 75%, mentre que en el grup d'obesos no s'observen diferències amb el grup control. El comportament de l'expressió de DOR observat en el teixit adipós blanc dels

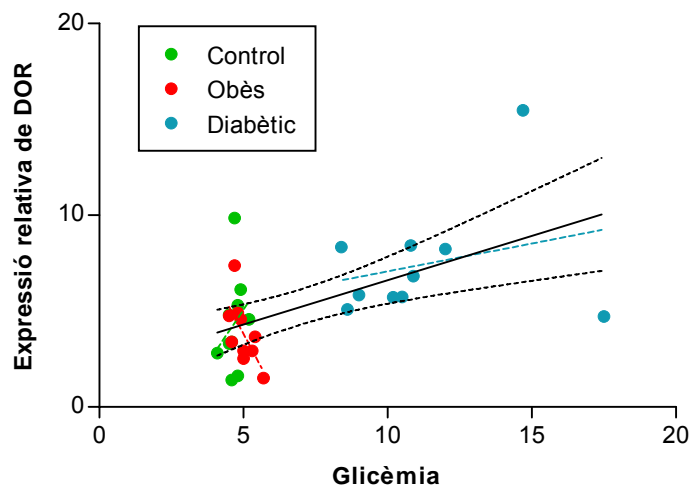


Figura 18. Correlació entre l'expressió de DOR en teixit adipós blanc i la glucèmia. L'expressió de DOR és relativa a ciclofilina A i s'expressa en unitats arbitràries, la glucèmia en mmol/l. Es mostren les rectes corresponents a les regressions lineals per al grup control, el grup obès, així com per el conjunt dels dos (en negre). Per a aquesta última es mostren els intervals de confiança al 95%.

individus diabètics respecte als controls, és oposat al que s'observa en múscul esquelètic.

A l'analitzar amb més detall els resultats, s'observa una correlació positiva entre l'expressió de DOR i la glucèmia ($p=0.0015$, $r^2=0.3082$: Figura 22), que concorda amb la major expressió en diabetis de tipus 2.

Expressió relativa d'AIB3 en múscul esquelètic humà

Pel gen AIB3 es va valorar l'expressió del gen en 8 mostres d'individus control (6 dones i 2 homes), 8 mostres d'obesos (7 dones i 1 homes), i 8 mostres de diabètics de tipus 2 (6 dones i 2 homes) (Figura 19).

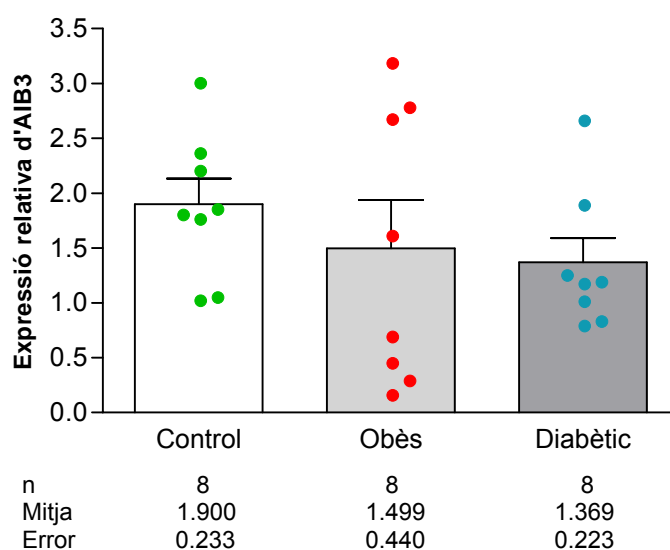


Figura 19. Expressió relativa del gen AIB3 (en unitats arbitràries) en múscul esquelètic en diferents grups d'individus. Es mostren els valors de mitja i error estàndard així com els valors individuals de cada individu.

Els resultats no mostren diferències significatives entre els grups (Figura 19), si bé, si s'observen detingudament els resultats sembla haver-hi dos grups diferenciats dintre del grup obès. Per aquest motiu es va decidir comparar la mitjana dels diferents paràmetres clínics entre les 3 mostres amb major expressió i les 4 amb la inferior. En aquest anàlisi no s'observa cap diferència significativa, tot i que sembla haver-hi una tendència per a la insulina basal ($p=0.0639$): els 3 individus amb una major expressió d'AIB3 (mitja d'expressió de 2.897 u.a.) tindrien una insulina basal inferior a la dels 4 individus amb una menor expressió (mitja d'expressió de 0.4175 u.a.). Així en els primers aquesta té un valor mitjà de $8.667 \text{ mUI/l} \pm 0.6667$ i en els segons de $12.75 \text{ mUI/l} \pm 1.377$.

Quan es fan anàlisis més detallats de l'expressió del gen AIB3 en aquestes mostres s'observen algunes correlacions amb paràmetres clínics. En conjunt, s'observen correlacions entre l'expressió d'AIB3 i la insulina basal ($p=0.02647$, $r^2=0.1877$: Figura 20a), així com amb l'oxidació de glucosa després d'un clamp euglicèmic hiperinsulinèmic en els controls ($p=0.0038$, $r^2=0.7767$: Figura 20b).

La correlació observada amb insulina basal en el conjunt de les mostres concorda amb l'observació d'una tendència al comparar els individus obesos amb més i menys expressió d'AIB3.

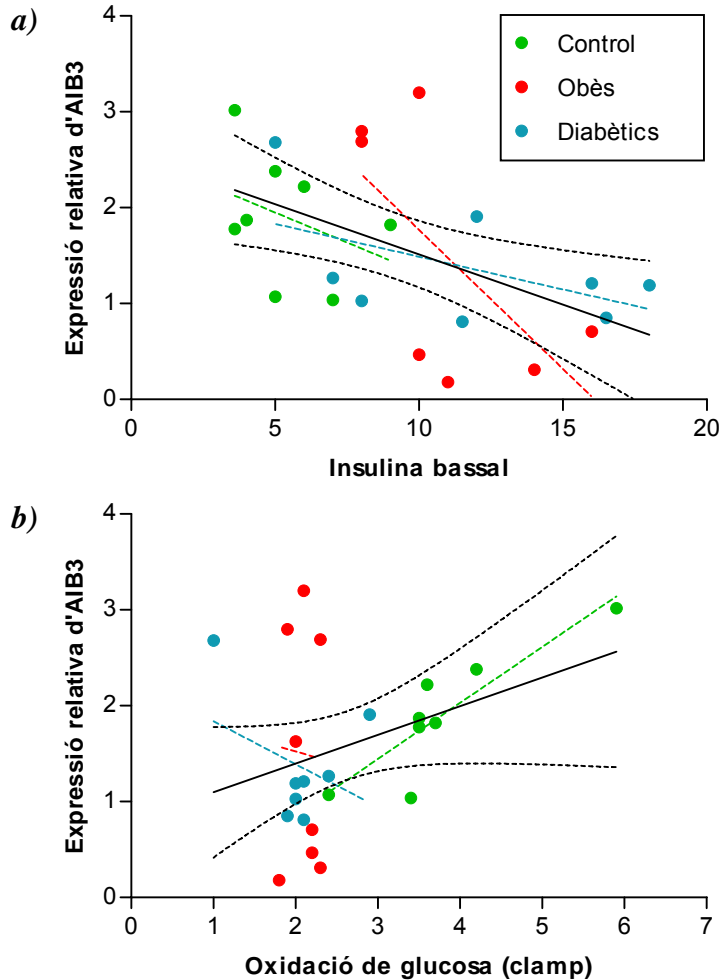


Figura 20. Correlació entre l'expressió d'AIB3 en múscul esquelètic humà i a) insulina basal; b) oxidació de glucosa després d'un clamp euglucèmic hiperinsulinèmic. L'expressió d'AIB3 és relativa a ciclofilina i s'expressa en unitats arbitràries, la insulina basal en mUI/l, i l'oxidació de glucosa després del clamp en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Es mostren les rectes corresponents a les regressions lineals i els intervals de confiança al 95%.

En base a l'observació del comportament diferenciat entre mostres del grup d'obesos es van repetir els mateixos anàlisis excloent les 3 mostres amb més expressió. Quan es fa aquest anàlisi s'observa la millora de les correlacions ja observades (insulina basal $p=0.0049$, $r^2=0.3637$; oxidació de glucosa després del clamp $p=0.0004$, $r^2=0.4866$), així com l'aparició de correlació amb l'ÍMC en el conjunt de les mostres ($p=0.0004$, $r^2=0.4906$: Figura 21).

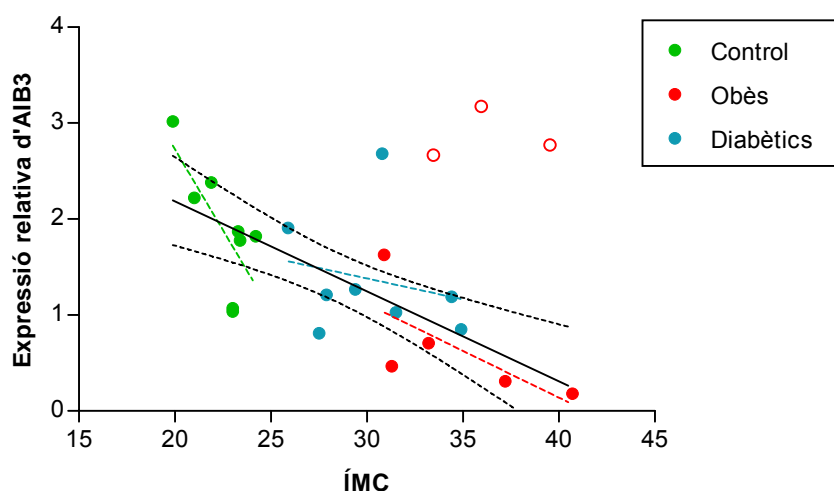


Figura 21. Correlació entre l'expressió d'AIB3 en múscul esquelètic humà i l'índex de massa corporal després d'excloure 3 individus obesos en l'anàlisi (punts vermells buits). L'expressió d'AIB3 és relativa a ciclofilina i s'expressa en unitats arbitràries, l'índex de massa corporal en kg/m^2 . Es mostren les rectes corresponents a les regressions lineals per cada grup així com pel conjunt (en negre). Per a aquesta última es mostren els intervals de confiança al 95%.

2.1.2. Quantificació relativa dels gens DOR i AIB3 en mostres humanes de múscul esquelètic ('mostres de Suècia')

Aprofitant la disposició d'algunes dades clíniques en les 'mostres de Suècia' es van fer anàlisis de correlacions per tal de detectar alguna possible relació entre l'expressió dels gens DOR i AIB3 i algun dels paràmetres disponibles.

Les mostres estudiades consistien en 30 mostres provinents d'individus no diabètics i no obesos (tots ells homes) i de 8 individus diabètics (també homes). Per a les 30 mostres de no diabètics ja s'havia valorat l'expressió dels gens DOR i AIB3 per tal de cercar, com ja s'ha vist, alguna correlació entre l'expressió dels gens i els polimorfismes estudiats en els estudis anteriors. En el cas de la mostra de diabètics, únicament es va valorar l'expressió del gen AIB3, ja que anteriorment el gen DOR ja havia estat valorat pel Dr. Daniel Bach.

Dels resultats obtinguts en aquests anàlisis s'observa l'existència de diferències significatives entre l'expressió d'AIB3 entre mostres control i mostres de diabètics (Figura 22). Aquesta observació va en la mateixa línia del que s'observava per les 'mostres de Lyon', si bé en aquestes la diferència no era significativa, i indicaria que de mitjana, l'expressió del gen AIB3 en diabètics estaria lleugerament disminuïda, al voltant d'un 30%.

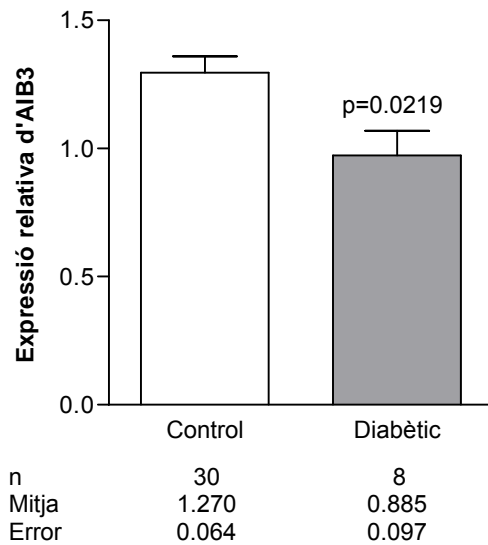


Figura 22. Expressió relativa del gen AIB3 (en unitats arbitràries) en múscul esquelètic d'individus no diabètics i individus diabètics corresponents a les 'mostres de Suècia'. Es mostren els valors de mitja i error estàndard així com els valors individuals de cada individu.

2.1.3. Quantificació relativa de l'expressió del gen AIB3 en diferents models animals

Per tal d'aprofundir en la regulació del gen AIB3, es va decidir estudiar l'expressió del transcrit AIB3 en models animals de rata diabètica de tipus 1, de rata diabètica de tipus 2, i de rata obesa.

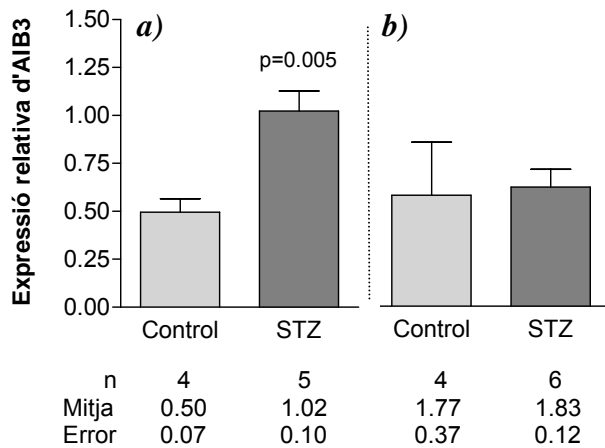


Figura 23. Expressió relativa d'AIB3 (en unitats arbitràries) en a) teixit adipós blanc i b) múscul soleus de rates Wistar tractades amb estreptozotocina (STZ).

gen AIB3 en el teixit adipós de rates tractades amb STZ, increment que no s'observa en múscul esquelètic d'aquestes rates.

Per al model de rata diabètica de tipus 1 es van tractar 6 rates Wistar amb estreptozotocina (STZ). Aquesta provoca la destrucció selectiva de cèl·lules β pancreàtiques, donant lloc a un fenotip de diabetis de tipus 1. De les rates així tractades es va obtenir múscul *soleus*, teixit adipós blanc, i cor. Aquests teixits van ser processats pel mètode de TRIZOL per a l'obtenció de RNA, i posteriorment tractats amb DNAsa. De l'RNA així obtingut es va preparar cDNA i aquest es va usar per a quantificar l'abundància relativa del transcrit del gen AIB3 (Figura 27). Els resultats indiquen un clar increment de l'expressió del

Per al model de rata diabètica de tipus 2, es van utilitzar mostres provinents de rates Goto-Kakizaki, en les que es va valorar l'expressió relativa d'AIB3 en cDNAs obtinguts a partir de teixit adipós blanc i múscul *soleus*. En total es disposava de 17 cDNAs provinents de múscul esquelètic (7 controls i 10 GK) i de 9 cDNAs provinents de teixit adipós blanc (4 controls i 5 GK). En aquest cas no s'observen diferències significatives d'expressió entre els dos grups (Figura 24a i b).

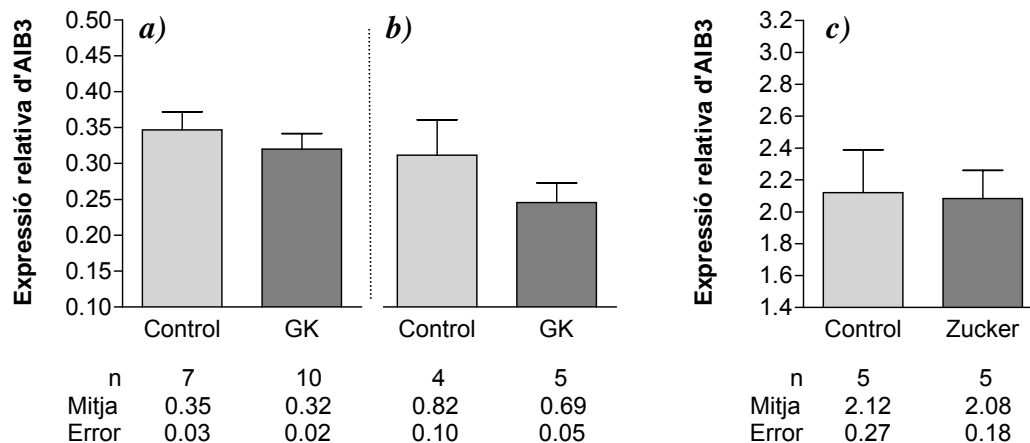


Figura 24. Expressió relativa d'AIB3 (en unitats arbitràries) en a) teixit adipós blanc de rates GK; b) múscul soleus de rates GK; i c) múscul soleus de rates Zucker obeses.

De la mateixa manera es van preparar cDNAs provinents de múscul esquelètic de rates Zucker i es van valorar per PCR a temps real. A l'igual que en múscul de rates GK, en rates Zucker tampoc s'observen diferències d'expressió en múscul entre el grup control i el de rates Zucker (Figura 24c).

3. GENERACIÓ D'UN VECTOR DE REEMPLAÇAMENT DEL GEN DOR

Per tal de poder preparar un vector de reemplaçament del gen DOR en ratolí, per així poder generar un ratolí *knock-out* (KO), era necessari disposar d'informació de la seqüència, i l'estructura del gen DOR en aquesta espècie. Quan es va plantejar aquest objectiu, aquesta informació no era disponible, ja que encara no s'havia finalitzat el projecte de seqüenciació del genoma de ratolí, pel que es va decidir fer aquesta seqüenciació com a primer pas per a la generació del ratolí KO.

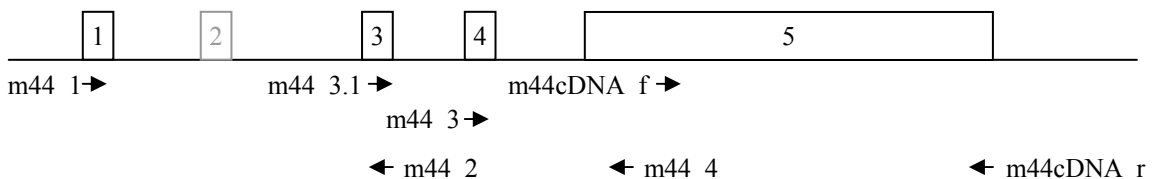
3.1.1. Seqüenciació del gen DOR en ratolí

Per a la seqüenciació del gen, i donat que en alguns casos hi ha diferències de seqüència notables entre soques, es va utilitzar DNA provinent de ratolins de la soca SvJ/129, que és la mateixa soca de la que provindrien les cèl·lules mare per a generar el ratolí KO.

A partir de la informació de seqüència del cDNA de que es disposava (bàsicament corresponent a la pauta oberta de lectura), es van dissenyar encebadors en diferents exons del gen que permetessin seqüenciar les regions intròniques. Així, tal com es descriu amb més detall en la secció de 'Material i mètodes: VI.1 Seqüenciació del gen DOR en ratolí' (pàgina 131), es van dissenyar 7 encebadors repartits pels diferents exons (deduïts a partir de l'estructura del gen humà), al llarg del cDNA, els quals van permetre dur a terme 5 amplificacions diferents: m44_1/2, m44_1/4, m44_3.1/4, m44_3/4 i m44cDNA_f/r.

No es van dissenyar encebadors en l'exó equivalent a l'exó 2 humà, perquè en la seqüenciació del cDNA de que es disposava, aquest exó no hi era present. La seqüenciació del gen també havia de permetre determinar si aquest exó és inexistent en ratolí, o bé si el cDNA seqüenciat correspon a alguna forma de *splicing* en la que s'elimina l'exó 2.

Posicions aproximades d'hibridació dels encebadors*:



Els productes de les 5 amplificacions es van purificar i clonar en un vector p-GEM-T. En aquest primer pas ja es va poder fer una primera estimació del tamany dels introns. Així, el producte m44_1-m44_2 té una longitud aproximada de 3.5 kb; el producte m44_1-m44_4 de quasi 5 kb; el producte m44_3.1-m44_4 d'aproximadament 1.3 kb; el producte m44_3-m44/4 d'entre 0.7 i 0.8 kb; i el producte m44cDNA_f-m44cDNA_r de quasi 3 kb. D'aquí es podia deduir la següent estructura intrònica del gen: Intró 1 (+Intró 2?) d'aproximadament 3.5 kb; intró 2 (3?) d'aproximadament 0.5 kb; i intró 3 (4?) d'aproximadament 0.3 kb.

* en l'estructura equivalent del gen en humà

Els productes de PCR clonats van ser seqüenciats amb els encebadors T7 i SP6 que hibriden en el vector. A més, es van preparar mapes de restricció de les diferents construccions que van servir per a dissenyar l'estratègia de subclonacions que es seguiria (més detalls en la secció de 'Material i mètodes: VI.1 Seqüenciació del gen DOR en ratolí', pàgina 131).

Paral·lelament es van dur a terme dues rondes de LM-PCR que van permetre obtenir informació de la regió gènica situada més enllà de l'últim exó del gen. La primera es va fer amb els encebadors específics m44LM_Ext (1a. ronda), i m44LM_Int (2a. ronda), i es van obtenir els clons LM-7 i LM-6, corresponents a amplificacions de 500 pb i 800 pb, obtingudes a partir de digestions amb Ssp I i Hae III respectivament. La segona es va fer amb els encebadors específics LM2_Ext (1a. ronda), LM2_Ext2 (1a. ronda), i LM2_Int (2a. ronda). Així es va obtenir el clon LM2-5, corresponent a una amplificació de 800 pb amb els encebadors específics LM2_Ext2 i LM2_Int, obtinguda a partir d'una digestió amb Stu I.

Tots els clons obtinguts van ser seqüenciats i les seqüències obtingudes es van ensamblar en una única seqüència mitjançant el programa 'SeqMan' juntament amb diferents seqüències de ESTs (*expressed sequence tags*) que hibridaven amb les seqüències de cDNA de que es disposava prèviament, o amb les seqüències obtingudes. El *contig* així obtingut té un tamany de 9052 parells de bases. En total el *contig* conté una longitud de seqüències de 45025 pb, amb un total de 94 seqüències i una cobertura mitjana del *contig* de 4.97 seqüències. La posició de les seqüències dels diferents clons i ESTs utilitzades en la seqüenciació es detallen a continuació.

1-461	ESTs*	*En l'ensamblatge del <i>contig</i> es van utilitzar les
58-3528	m1/2	següents ESTs: AA073311, AA097358,
58-4844	m1/4	AA098074, AA244780, AA260950, AA509488,
3507-4844	m3.1/4	AI614681, AI852438, AW823142, AW913213,
3533-4844	m3/4	AA203965, AA422249, AA463119, AI956704,
5117-7790	mcDNA 2	AW823142, BE192671, BE286247, AA097812,
5330-7909	ESTs*	AA466015, AI152413, AI427977, AI467249,
7620-8083	LM-6	AI844158, AL034819, AW491874.
7620-8360	LM-7	
8319-9052	LM2-5	

El resultat de la seqüenciació es mostra a la Figura 30. A partir d'aquesta seqüència es va poder determinar l'estructura del gen. La posició dels exons és relativa a la seqüència del gen DOR de la taula i es va obtenir per comparació amb els exons presents en el gen humà així com mitjançant la seqüència del cDNA obtinguda prèviament pel Dr. Baumgartner (Figura 29). Aquest resultat va confirmar la inexistència de l'exó 2 en ratolí, que posteriorment, en disposició de la informació dels genomes de ratolí, rata, gos i ximpanzé, s'ha observat que únicament existeix complet en ximpanzé i parcialment en gos, pel que sembla que aquest exó podria estar present únicament en primats.

1...147	Exó 1
3427...3601	Exó 2
4018...4306	Exó 3
4601...7907	Exó 4

Figura 25. Posició relativa dels exons de DOR en la seqüència de la figura.

cgggccgcagc	agctccggggc	gtccggttcgg	gggccccgcc	gtctctcggc	ccgtccccgg	60
tatgcccgtc	cagttgtgag	caccggcgac	ccggggacgc	ccggccgcac	aactacctca	120
gcgagcgggt	tgctgcagcg	gccccaggtg	agtcccgacc	tccgggctgg	gggctccggg	180
cacccccagg	acacgccttg	cgccccccyc	tcccgttctt	tgtctgtctc	cgccggcggc	240
agccggagct	gcgttcttgg	ctcccatttg	gttgctccaa	gccggtaggc	catgacggtg	300
ctttatttgc	atatgacatt	gagacgtcac	caaggccagc	cccgccttcc	aggcttgcac	360
gggtgcttgt	cctctggtga	cccgggtggc	gctatgtcgt	gcccggccgg	ccgaggggtg	420
aagagacgct	gaaagacaag	cgggatccga	agggactcgg	cggtttcctg	ggctaatacta	480
aggactgggg	tcaggcctct	catttgtttt	tcccttgtga	cctgagagag	ggtaggacgg	540
caaagctcga	ttaagttga	nagggcggtg	agtanatgga	gcttcagact	ccaggctcctg	600
gagacactaa	canatgggag	cngnttccct	ctgcttcaa	ggctccgccc	cctaacataa	660
taacatcctt	ctaatecctg	acatgtgtgc	agagcctgag	ttgatgtcat	tttcagccta	720
caaataattg	gggtcttaaa	ccccacttca	cggaagagg	aaactgagac	tcagagagac	780
gtagtttact	ggagatctca	gccaataga	atcacactca	ctaagtggta	gattccttag	840
ctgaagtata	agctacatgc	ttacatacat	ctactgagga	ccctatcttg	ggttcagcac	900
caaccacaat	ttgatgggat	gcttcagtct	tcatgatctc	ggacattttc	ccaggaggctc	960
tctgaaaatt	gggtctctta	caaggccctg	acctctctg	ccttctttct	agttcaaac	1020
ccaataaatg	gcegtctccc	agctgttttg	accacagaaa	ggtagagcac	tagttgcctg	1080
cctccagggt	tctccagggc	agatgttgag	agggagttgg	gagttccctc	tgtgggctc	1140
ccatcagagc	tgctcagctg	gagaaccaga	cccttccctg	gcattagtga	tgagagctt	1200
atgctgttcc	ctgaggctgc	ttccacagtg	acagaaggat	gtctcttact	ttccaagtaa	1260
gtagactctg	agtccttccc	aggttgaggg	tccgtcaaga	atggcctggg	ctagggttgg	1320
cctaggcctc	cagtgcattt	ctaggcacag	cctctgtagt	attaagggaa	tggttcttcc	1380
tgagcagag	ccaggaatct	gagaaccagg	aagccagcag	gctaggaaa	aaaaccagg	1440
aggctctcct	agtggcctaaa	ggaggggggc	agtcatagct	ggctgggtgc	taccatctct	1500
cctggctgtc	actcacttct	gtatgatctc	caccagggag	cttctcactt	gacatgtcaa	1560
cagttgaaaa	ggctcattgc	agggactggt	gcacagtgtg	aaccctggga	aatgcatgca	1620
aaagtttag	gccagggacc	agatctacag	ggaccagaga	ccagggcctg	tgtctgattt	1680
ccctgtttcc	tggtatttat	atttttggat	attacctggt	gaggttttcc	tgattgtatg	1740
tattctgcat	tgccacacca	ccactaagct	atagctttat	tggttagatt	catgttccca	1800
atgtgatac	accattccta	aaacaggaga	ctgtgtgtct	tggtccaggg	aaggaggctt	1860
gggtctgaag	gcttgatcy	tggtccaaag	cattgtgttt	atcctcaagg	ggatcccctg	1920
gatctgacag	cttcttctt	ccactgtcta	tcactgacat	gtggtctcac	tggaacaggat	1980
tcttctctt	ggctagtgat	gctgagtttg	aacaagagtc	taggggaaag	gggagttaga	2040
gtagtggggc	agacctatag	gcacaggtcc	tcctcatctg	agggttgccc	aatctcatgg	2100
taagattgta	kaactgagcc	gggcgtgggtg	gcgctcgct	ttaatcccag	cactcgggk	2160
gcagaggcag	gtggatttct	gaattctang	ccagcctggg	ctacaaagtg	agctccagga	2220
cagccagggc	tacacagaga	aaccctgtct	cgaaaaacca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	2280
aaaaaaaaag	tgtagaactg	tagtgattac	ggatgctatt	aggttcaaat	actacctgtg	2340
tcttctacta	gctgtgagac	ttaggttagt	tatcttattt	cgctgggctt	tttaaaaaaa	2400
ttaattaatt	aaatgtatgt	gagtaactgt	ttgttctct	cagccacacc	agaagagagt	2460
atccgatccc	atcacagctg	gttgtgagcc	accatgtggt	tgctgggaat	tgaactcagg	2520
acctctggaa	gaacagtcgg	tgctcttgac	tactgaacca	tctctccagc	tctctgggct	2580
tggttttatt	tatctctcta	tcagaaaaaa	aaattttctc	ttcctcccac	cccttttcag	2640
tccttttgac	aggatcttat	gtagccagga	actatttttt	tttttttttt	tttttttttt	2700
ttaggtagg	ccccatgtag	ttcagactgg	cctttaactc	actatgtagc	ctaagcagga	2760
cttgactct	gatccccctg	cctctacctt	ctaaagtcta	ggataataga	caggaggctt	2820
tcatgtcttt	gaactcttgt	cctcttgctt	ctagccccta	agtcctaaga	ttccaggctt	2880
gccctttcac	acactgtgag	gatataagga	aaaatggacc	aggtttctta	gtatagtgtt	2940
gtatgttact	gacacaggaa	tgtaatttat	gatgatggta	ataagaacaa	tttttttccc	3000
ttaatggaaa	attcctattt	actcctcaaa	gcccaggttg	gctgttatct	tcctctagag	3060
acttaccctg	gcaaagcttg	gtaatatata	tcacttcttc	catatcccca	aagcaccctg	3120
tcataacacc	aagtttatta	gcttattgaa	tgtttactgt	gtgctcaggc	actgttctaa	3180
acatgtcatt	aagtgtttcc	tcatttaagt	cttattacga	ttgtcatttg	acagatgaga	3240
aaacaaagac	ccagcacctt	tctaagtgca	tacaggaaca	cccactgaat	gcagaaaagc	3300
acacatacca	agagcttctc	tgctattact	gctctggcag	ctaggggcta	tagccttgtc	3360
tccagctacc	aactgaaggg	ctgactttag	ttcgtgcttc	tactaatgtc	tttctatgct	3420
tctcagggct	ttaaactgcc	atagggcgcc	cccttgaggt	tgcttcccc	gctgaccatg	3480
				M		
ttccagcget	tcaccagcct	tttcttcaac	acccttgccg	ctcctgaaga	ctccaactgt	3540
F Q R	F T S L	F F N	T P A	P P E D	S N C	

Figura 26. Seqüència de nucleòtids del gen DOR i regions flanquejants obtinguda per seqüenciació de DNA de ratolí provinent de la soca SvJ/129, corresponent al n° d'accés AJ311669. Els exons estan ressaltats. La pauta oberta de lectura s'indica amb un subratllat. Els aminoàcids corresponents s'indiquen en la línia inferior.

ccgggggcct	ttgtctctga	ggaggatgaa	gtggatggct	ggctcatcat	cgacctacag	3600
P G A	F V S E	E D E	V D G	W L I I	D L Q	
ggtgaggctt	gagtcaggat	ccagcactct	tgattccocta	gtctatgagc	ataatgagga	3660
caggaggtgt	tgcaatatag	aggggaagag	ggctattttg	atggtggagt	ccccctaggc	3720
ctactgggaa	aattaaagta	gaagccgtga	gcccagaggt	gaggtaacac	agacccttct	3780
cttgaaagct	ctggctcctg	ccatttggtg	gggcacacac	ctgggacacc	tagggcggtg	3840
ggctaaggat	cctggccttc	akgtgctctc	tgggacgat	ggatagaggt	gcaggtctga	3900
ctaacgatgc	cctttctctc	cccatcccat	gtgtctggta	tatgtgtgtg	tgtgtatgtg	3960
tgtcccacc	tgctgctccc	tctcctctgc	atggsctccc	attcccacac	cctatagaca	4020
					D	
gctatacagc	tcctcccagc	cccggggcct	ckcctgctcc	tgacaggccgc	tctcccaccg	4080
S Y T A	P P D	P G A	S P A P	A G R	S P P	
cgccctcctt	gatggatgag	agctggtttg	ttaccctcc	cgctgtttt	actgcagagg	4140
A P S L	M D E	S W F	V T P P	A C F	T A E	
ggccccgcct	tgggcctgcc	cgccctccaga	gcaatccgct	ggaggacctc	ctcattgagc	4200
G P G L	G P A	R L Q	S N P L	E D L	L I E	
atcccgat	gtccgtttat	gtcaccggca	gcaccatagt	gctggagtct	gggccacctt	4260
H P S M	S V Y	V T G	S T I V	L E S	G P P	
cccctcacc	tgaagctgcc	ttgcctgac	aggacctcag	cgatgg	gtga	4320
S P H P	E A A	L P D	Q D L S	D G		
ggtggagact	ggaggctagg	gtctakgaga	ctagcagggg	ctcagaggat	tgggagggac	4380
cagcctgatc	tgccagacag	aatcagagta	ggacttgtat	tgggggtcag	ggttttttcc	4440
ctgttctgcc	tagttacctg	tgccaggtgc	ttaatcacia	ctctaattgt	gaytaaagga	4500
agaatttga	cccctcagtg	gtctgccccg	cagaaatagg	gtgtgggatr	ccaaccctga	4560
tctcttccct	ctctgacaga	gttgtactct	gtttctgcag	agagctggcg	cctgcctcc	4620
				E L A	P A L	
gggaaccag	ggccttgcac	cacgcagctg	ctcctatgcc	cgctcagact	gtgctgctgg	4680
R E P R	A L H	H A A	A P M P	A R A	V L L	
agaaggctgg	ccaggctcgg	aggctgcaga	gagcccagca	gccccctgag	cgccacacat	4740
E K A G	Q V R	R L Q	R A R Q	R A E	R H T	
tgagtgmtaa	agtgttgcaa	cggcagaatc	gccccgggga	gagccgttcg	cgccggccca	4800
L S X K	V L Q	R Q N	R A R E	S R S	R R P	
agcaccagg	cagcttcatt	taccagccgt	gcccagccca	gttcaactac	tgagcgcccc	4860
K H Q G	S F I	Y Q P	C Q R Q	F N Y	end	
tgctgcaccg	cgaatccctc	gccgactcct	ggctccangn	gcctcctctg	cagcagccag	4920
tgtgctgctc	gaggggtgtg	gggggtccac	ccgcctccat	ctggatacta	caacctccct	4980
ccttcttaag	ttttgaggtg	gggtgatggc	cctctacttc	cctgtttata	gtctaactca	5040
cctattaacc	tctctcatcc	tgggtcatcc	tcctcctttt	ctcagtgctc	gattctccac	5100
cctcacactc	cccacacca	ctctcccatg	cttcttttta	ggacctctat	tcttgtctct	5160
cgccccctca	ccttttccct	cttagcccc	ccgattccta	agaccctgac	ttggcacctt	5220
ctccgcttca	gctcctactt	tccaaractt	actctctgt	ttgggatcgc	tcccactctt	5280
gttccctttt	tttcattcct	ggcaattccc	toccaatcct	gcaggtgcaa	cctgccaggc	5340
ctgggccatt	gtcctcatcc	tgtagtcagg	gatcaggcat	gggttttgat	ttcagttttc	5400
cccctttctc	tgccctgggg	gctgggctcc	ttattgctgc	ttaggcctag	aaagtttaag	5460
tatgtggaag	aggagagtga	gttgtaagt	agataagggt	aagggaatgg	agggaaacag	5520
gcagcctagt	gggrgcccga	gatggggaca	ggtgggttga	gaagtagcag	ggagcagggc	5580
atcttgggag	ctgttattgt	gcttggctcag	agtagctaa	ccctggctct	aggcctgagc	5640
ctggagtctg	ccccatttc	cttttccctat	aatcctgctc	tccagggttc	ccccctccct	5700
gaaatttgtc	cttcaggagt	aaccctacc	caccctgtc	cctgtgagtc	tggagtccga	5760
agggcttgta	ccttgtcacc	ttaccttgtc	atgccacccc	aggagtagaa	gctgggtaag	5820
gccccatcat	cctgaccatc	tctgttcata	tgoccaaagg	gctagaatta	gcttaggaga	5880
gatgcagggc	agaggatttc	caggcagggga	aaaggaaaca	caccccagg	caagaatgag	5940
gagccatgat	gctaaggagg	acaactatga	ggtaaagcca	tcccagact	gacagctctg	6000
cctttatctt	gcctctggcc	ttatatctca	tactttgttc	aatatggctg	gataataaac	6060
actcctgggt	agaggaggcc	aggagcctca	ctgtcccaat	tcccaaattt	ttcttacaga	6120
gattcagggc	cttcaagagt	cttctwaatg	ttctcccaca	gggctctttc	tgagtgcctc	6180
ataatccctc	ccccctttct	aattcaatat	ctggagtaag	gaattcttgg	gtagggcaca	6240
gggatgggg	tgccagcttc	ttctttcttg	tggtggggct	cagacaccag	caacagctcc	6300
ttgggatgcc	ccaagtgtgt	tccggttctt	ctagctgtc	ctttttaaag	tgtgtgctct	6360
tccttccctt	aaacctttag	atgtcctgtt	acaactaacac	aggtcttccc	ttccctccaa	6420
cccaggttt	caggtctcag	agccaagcca	gggttgagga	aaactgcatt	cctacgaggg	6480
taaaagtgc	tgccctcttt	gatcctttct	tactaggctt	catgtgggat	gggagaggat	6540
gtccccatga	tggggacaga	ggaagccctg	ctagggctct	ctagcccagt	aagccaaatg	6600
ggaactataa	gcagatcaaa	attttacat	agcttattag	agccctatta	gttctgtctc	6660
caagttcttc	agttacaacc	tagtagtata	cttactcttc	caactgtcct	aaggctcact	6720
cccagccagc	ttaggatctt	cagcattttt	aagagctgaa	gctccctctt	gcccttcttg	6780

Continuació de la figura.

tctactcctc	actgccagtt	ggggcctagg	cttagtcctg	ggcaaagtgc	catgatcttg	6840
ctgctgtagg	aagcttgata	gggcatttgg	ctcaaatttc	agaaggcctc	gctcctgacc	6900
taatttctca	aagctccggt	agttctagac	ccctccaatt	tctcatctgg	ttgcaaggct	6960
tatttttctt	ttgtactttc	ctatagatgc	tatagcattt	gagtgtggca	atatttttgt	7020
tgtgtataga	tgtctaagaa	ccaacactac	tcagtctcct	gctagtctga	ctcctgaagc	7080
atcagaccct	gtcatactgt	attgactgtg	tatgtgcctt	tcaccttgag	catgcttcag	7140
gaattttttt	ttttcttaaa	ccacagaact	tgaatacaca	aggggaaccag	aattcacaaa	7200
gtcctatgca	accctagaca	ggaggaggtt	agagagtctg	tcttgatttg	tggtttcaga	7260
gaccctagag	aaatttgtac	cagtttgtat	taaagtcagt	actaccagca	ctttgccaaa	7320
actacggatg	tcagagggac	cttgtttmta	gagtgagtc	caattacatc	aaagggcaac	7380
stgcgctttc	yccaataagt	stgggtggtt	ctcttgagcn	tgggtgctact	ttataacctt	7440
tggcagtcta	gccccagcag	ggcacctgtg	gtgtgagtg	ggtttggtgc	tgttttggag	7500
tgtgcctgcc	ccccagcctg	gaaccctctg	atcaacttgc	tgggacctat	aacgtcttag	7560
gtgcaacaag	gaccctacca	gagctcctgg	gtggccttgt	gtgaggggac	tgaacgcaga	7620
caaaccacag	cctgcttcta	ataccttctt	tccctaccac	ctagttccaa	atggaaccaa	7680
caagttgagt	gcactctctg	tgggtgtttt	gtgttgagac	tggctgaagt	gaagaacttt	7740
tgacttacca	tgttgtagt	tgtcgacaga	ctcaaggaca	caaccacctc	gatctgttca	7800
tgtggcatgc	ctgtgtatgt	gtgtaacagg	attctgaatg	ttaggttgta	atgctattcc	7860
tgtwtgggag	aaaaataaat	ataaacaaat	aaaaatctat	ttaaagcaca	ttatgctttc	7920
tgcctcagct	gagctaaagt	atgagaaaca	ctataatttc	aagatcatc	aaggcagagg	7980
atactattat	taggctaate	ttcgttctcc	tttgtcatat	aagaaagcaa	gaggacaaat	8040
agttcactag	aaaaggacaa	tatagggctc	gactcataaa	tawttttaga	agatccttat	8100
aaggcacata	tatgaagata	cctggataca	gaaatgagaa	agaaagcaca	gcaaacactg	8160
gtccactctt	tagtcccaag	tactgggsta	tgccaaagyc	caagagctac	ctagttaact	8220
gtagaactgt	gttaaacaa	mwtgctggtc	agtgtgagtg	catatcgatg	atggagcagc	8280
acaagcattg	cgtgggagga	agcaccatct	gtgatsttga	cagtctctca	cctctaaaac	8340
ctttgatgga	aggctggttc	tactttctga	gacaaagtc	aacctggcct	cgaactcttt	8400
ctgtaccgga	gggtgacctt	gaacttgtga	ttcttatgcc	tctacatccc	aagcactatg	8460
attacaagtg	tataccacca	tacttgggta	ttattttcag	acaacccaag	ttagtgcacg	8520
cgcgcgacaca	cacacacaca	cacatacccc	tccagtatgt	tgctaaacag	atntgatttg	8580
ttcaaagcca	agaatgagtt	gaatgagcag	gtagatgcat	tttctcagc	ttgctgggag	8640
ggcatttcag	gtgtgatgtg	tctgagttac	aatgaaagct	ctgtttactc	atctttgacc	8700
cacaagaaaa	gcttgctcat	tctttccaat	aacatacctt	taagttctat	gacaaaaaca	8760
tttattaaca	cgttcagtat	ttcacattgt	acaacacctt	agattctctt	tattcactgg	8820
tcattttcta	caacaaatac	atccaaaaca	ctataataata	aaattattta	caacatttcc	8880
aatgacaag	attgctgttt	gccccactac	tgctattcac	acacagtaact	tccacagcac	8940
aatacatcat	tagaagatct	acaatgttc	accctgtact	ctaggctgct	taagaaatgt	9000
gaaactaata	acatttacia	tggcattagc	gcctttcaat	acatggcgaa	ca	9052

Figura 26. Seqüència de nucleòtids del gen DOR i regions flanquejants obtinguda per seqüenciació de DNA de ratolí provinent de la soca SvJ/129, corresponent al n° d'accés AJ311669. Els exons estan ressaltats. La pauta oberta de lectura s'indica amb un subratllat. Els aminoàcids corresponents s'indiquen en la línia inferior.

De la seqüència obtinguda es dedueix la mateixa seqüència d'aminoàcids que s'havia deduït previament en el nostre laboratori de la seqüenciació del cDNA (Figura 31). La proteïna DOR conté 221 aminoàcids, i és per tant, una proteïna relativament petita.

3.1.2. Disseny del vector de reemplaçament

Un cop finalitzada la seqüenciació del gen DOR en ratolí es va dissenyar l'estratègia de generació del vector de reemplaçament. Amb aquesta finalitat es va consultar en la bibliografia i a les empreses a les que es podia encarregar la generació dels ratolins, els requeriments bàsics de disseny del vector.

MFQRFTSLFFNTPAPPEDSNCPGAF	25
VSEEDVDGWLIIIDLQDSYTAPPDP	50
GASPAPAGRSPPAPSLMDESWFVTP	75
PACFTAEGPGLGPARLQSNPLEDLL	100
IEHPSMSVYVTGSTIVLESGLPPSPH	125
PEAALPDQDLSDGELAPALREPRAL	150
HHAAAPMPARAVLLEKAGQVRRRLQR	175
ARQRAERHTLSXKVLQRQNRARESR	200
SRRPKHQGSFIYQPCQRQFNY	221

Figura 27. Seqüència d'aminoàcids de la proteïna DOR deduïda a partir de la seqüència de nucleòtids obtinguda per seqüenciació de DNA de ratolí provinent de la soca SvJ129.

Inicialment es va pensar en el disseny d'un vector de reemplaçament dissenyat per a un criatge per *southern blot*. En aquest tipus de vector els requeriments demanen uns braços d'homologia amb el gen a deleccionar de més de 6kb, augmentant la taxa de recombinació homòloga al augmentar la longitud d'aquests, així com la presència de dos cassets de selecció: un casset de resistència a neomicina per a la selecció negativa amb G418 (tòxic per a les cèl·lules); i un casset amb el gen de la timidina quinasa per a la selecció positiva amb ganciclovir (tòxic per a les cèl·lules amb activitat timidina quinasa).

El disseny que es va escollir era el d'un vector amb uns braços d'homologia que en total sumen 7.4 kb repartides pràcticament en parts iguals entre el braç 5' i el 3' d'homologia i que permetien reemplaçar la quasi totalitat de la pauta oberta de lectura del gen, per el casset de resistència a neomicina, deixant únicament una pauta oberta de lectura remanent de 22 aminoàcids (16 dels quals provenen del gen DOR). No es va eliminar la totalitat de la pauta oberta de lectura per tal deixar un lloc de traducció que evités que altres possibles pautes de lectura presents en el transcrit poguessin ser traduïdes al desaparèixer l'inici de traducció de la proteïna principal (Figura 28).

Vector de reemplaçament pBS II DOR KO South

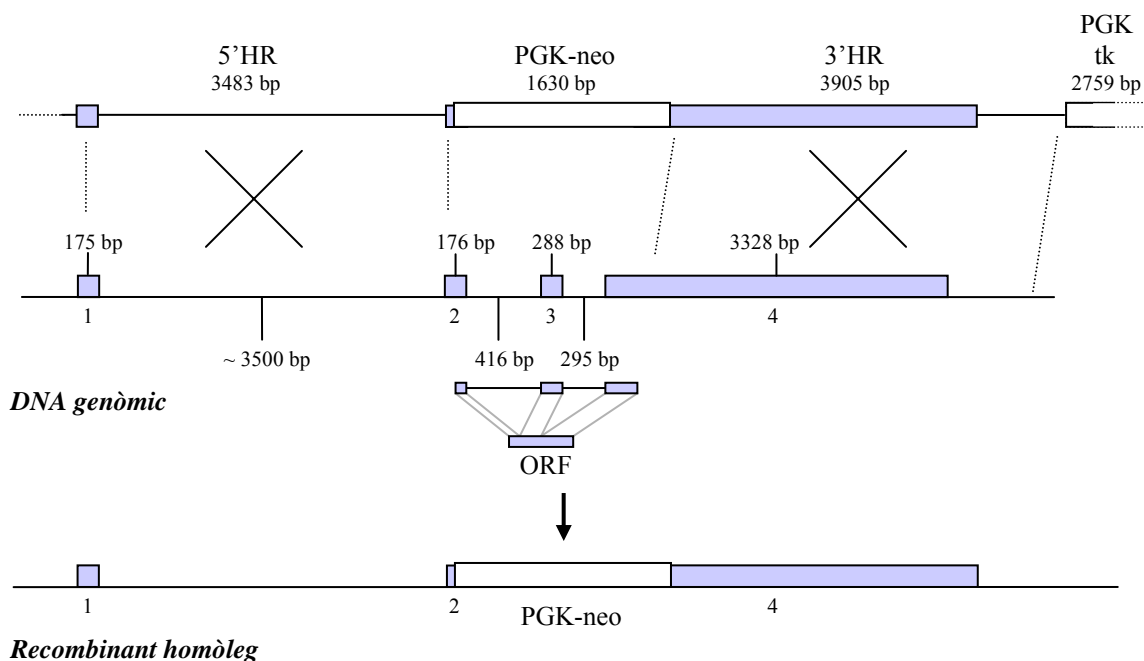


Figura 28. Diagrama esquemàtic del vector de reemplaçament del gen DOR dissenyat per a un criatge per *southern blot* (pBS II DOR KO South), estructura del gen en el genoma de ratolí, i resultat de la recombinació homòloga del vector amb el gen DOR. Es mostren les regions de recombinaçió homòloga entre el vector de reemplaçament i el gen salvatge (5'HR i 3'HR) així com els cassets de selecció per G418 (PGK-neo) i ganciclovir (PGK-tk).

Amb el disseny del vector decidit, es va procedir a obtenir-lo, utilitzant com a vector de suport un plasmidi pBluescript II SK. El procediment es detalla a 'Material i mètodes: IV.1.1 Procediment per a l'obtenció del vector pBS DOR KO South', pàgina 109.

Un cop obtingut aquest vector (pBS II DOR KO South) es va contactar amb diferents empreses per a contractar l'obtenció del ratolí KO a partir del vector obtingut. L'empresa escollida (Afigen) tenia posat a punt el sistema de criatge per PCR, sistema que requereix un disseny de vector lleugerament diferent, pel que després de provar infructuosament diferents estratègies de criatge per PCR amb el vector inicial, es va decidir introduir modificacions en el vector que l'adaptessin als requeriments d'un vector de reemplaçament preparat per a un criatge per PCR.

Aquests requeriments consisteixen en augmentar la longitud del braç 5' d'homologia, alhora que es redueix la longitud del braç 3' a 0.5-2 kb. Així, es va augmentar la longitud del braç 5' d'homologia fins arribar a 6.8 kb, i es va reduir la longitud del braç 3' d'homologia fins a 1.7 kb, sumant un total de regions homòlogues al gen d'aproximadament 8.5 kb. La descripció detallada del procediment amb el qual es van introduir aquestes modificacions en el vector pBS II DOR KO South, i que van permetre obtenir el vector pBS II DOR KO PCR, dissenyat per al criatge per PCR, es descriu a 'Material i mètodes: IV.1.2 Procediment per a l'obtenció del vector pBS DOR KO PCR', pàgina 113)

Vector de reemplaçament pBS II DOR KO PCR

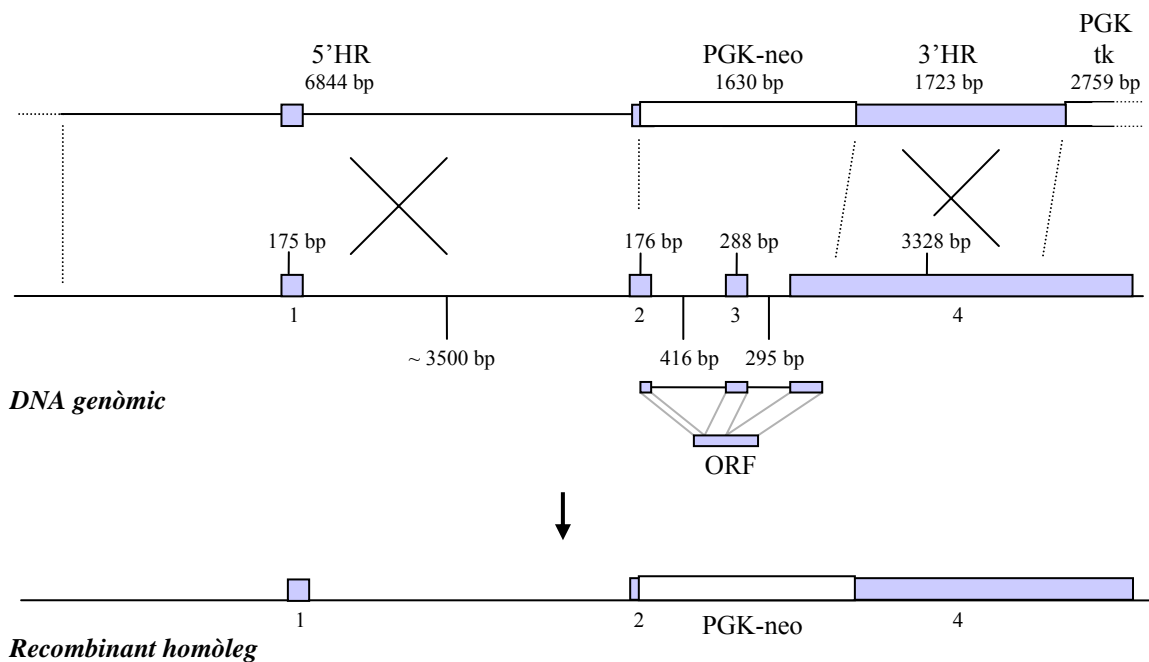


Figura 29. Diagrama esquemàtic del vector de reemplaçament del gen DOR dissenyat per a un criatge per PCR (pBS II DOR KO PCR), estructura del gen en el genoma de ratolí, i resultat de la recombinació homòloga del vector amb el gen DOR. Es mostren les regions de recombinació homòloga entre el vector de reemplaçament i el gen salvatge (5'HR i 3'HR) així com els cassets de selecció per G418 (PGK-neo) i ganciclovir (PGK-tk).

Un cop obtingut el vector pBS II DOR KO PCR es van fer diferents comprovacions que van consistir en fer anàlisis de restricció amb diferents enzims, així com en seqüenciar els extrems dels diferents elements del vector per assegurar-se que tots els elements del vector estiguessin degudament insertats (els encebadors utilitzats es detallen a 'Material

i mètodes: IV.1.3 Comprovacions per seqüenciació del vector generat', pàgina 116). Els resultats d'aquesta seqüenciació van confirmar que els inserts estaven correctament insertats i en l'orientació correcte.

3.1.3. *Obtenció dels animals knock-out*

La generació dels ratolins es va encarregar al 'Departament de reproducció animal' de l'INIA (Madrid). Després de 3 intents de generació fallits, en que només s'obtenien quimeres incapaces de transemetre el transgen a la descendència, es va abandonar la generació d'aquest model animal.

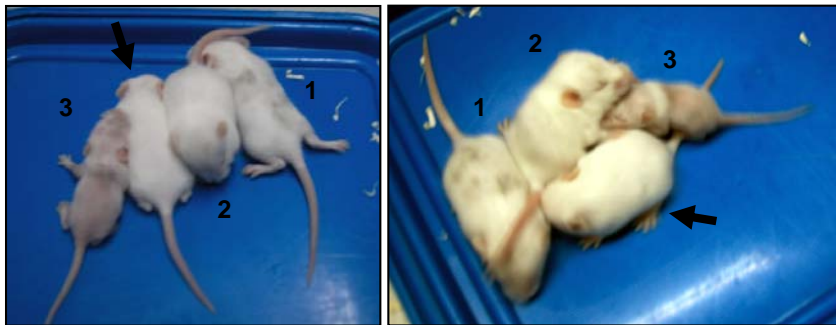


Figura 30. *Fotografies dels ratolins quimèrics obtinguts en la primera producció de ratolins knock-out. 1: mascle quimèric amb taques a tot el cos. 2: mascle quimèric amb taques en el cap i el llom. 3: femella quimèrica amb taques en tot el cos. La fletxa senyala un ratolí control de la mateixa edat que els quimèrics.*

Discussió

Associació genètica de la regió que conté els gens DOR i AIB3 amb patologies humanes

Entendre les causes i el desenvolupament de les malalties permet aprofundir en la comprensió que es té de la fisiopatologia d'aquestes i obrir la porta al desenvolupament de nous fàrmacs destinats a pal·liar l'impacte d'aquestes malalties. Aquesta comprensió, però, no és senzilla, ja que entren en joc nombrosos factors, provinents tant del propi organisme com de l'ambient. En el cas de malalties amb un origen genètic únic (malalties monogèniques) es troba un únic gen responsable del desencadenament d'aquesta, al voltant del qual s'explica la fisiopatologia de la malaltia. Els estudis de lligament genètic, els estudis de mutacions en gens candidats, i d'altres, permeten determinar quin és el gen responsable d'aquestes malalties, i els estudis posteriors en permeten demostrar el rol en la malaltia.

En el cas de les malalties multigèniques, delimitar la component genètica no és una tasca senzilla. Les raons d'aquesta dificultat ja s'han discutit breument en la introducció, i bàsicament es poden resumir en què les malalties multigèniques són heterogènies, tant pel que fa al seu origen, com al seu desenvolupament. De fet, englobat sota el nom d'una mateixa malaltia, amb una simptomatologia similar, es troben diferents alteracions combinades amb diferents efectes ambientals, que tot i que comparteixen símptomes comuns, a vegades presenten grans diferències en l'origen que acaben resultant en una important variabilitat entre els individus amb la malaltia.

A més, pel fet que existeixi aquesta variabilitat causal, i que els símptomes siguin semblants, resulta difícil delimitar els elements que originen la malaltia. Òbviament, aquells elements més representats en la patologia són els que presenten menys problemes, ja que els presenten la majoria dels malalts. Però en el cas de factors menys determinants, o que tenen un impacte que depèn del concurs d'altres factors poc freqüents, la presència d'aquest en el conjunt dels malalts pot ser baixa i quedar emmascarada, sent difícil arribar a identificar-lo. No obstant això, existeixen dissenys experimentals que permeten dur a terme aquesta tasca. Un d'aquests són els estudis d'associació genètica.

El primer objectiu d'aquesta tesi es va plantejar en aquesta direcció. En el nostre laboratori disposàvem d'informació que suggeria que el gen DOR podia ser un gen candidat a diabetis de tipus 2. El Dr. Daniel Bach havia identificat el gen en experiments d'hibridació substractiva en el que DOR mostrava una expressió disminuïda en múscul esquelètic de rates Zucker diabètiques (ZDF), respecte al respectiu control, i a més s'havia demostrat que la seva expressió també estava disminuïda en múscul esquelètic de persones obeses (resultats presentats en la seva tesi doctoral: Bach, 2001).

Estudi de la regió que conté els gens DOR i AIB3

El primer que es va fer per a satisfer aquest objectiu va ser l'estudi de la regió que conté el gen DOR: Es van seleccionar polimorfismes en el gen, la seva regió promotora, així com en el gen AIB3, situat a 3 kb del gen DOR.

Els resultats d'aquest estudi demostren que els polimorfismes de la regió estan en un fort desequilibri de lligament, conformant una illa de desequilibri de lligament que conté els dos gens (Goldstein, 2001). La majoria de valors de $|D'|$ són superiors a 0.70 el que indica un fort desequilibri de lligament entre els diferents polimorfismes estudiats.

En base al desequilibri de lligament observat, es va decidir estudiar 5 polimorfismes: DOR5, DOR1, AIB6, AIB1 i AIB7. L'elecció no es va fer a l'atzar, sinó en base als haplotips descrits pels diferents polimorfismes estudiats i al valor de d^2 . Es van seleccionar polimorfismes que en conjunt permetien representar amb la màxima riquesa el conjunt d'haplotips observats, i es van descartar polimorfismes que estan en fort desequilibri de lligament amb aquests (*i.e.* amb un valor de $|D'|$ proper a 1) i que tenen una distribució dels al·lels similar (d^2 propera a 1).

L'observació d'un fort desequilibri de lligament en la regió estudiada té fortes implicacions en la interpretació dels resultats de l'estudi d'associació genètica. El fet que polimorfismes situats a 80 kb l'un de l'altre (com en el cas de SNP9 i AIB7) estiguin en fort desequilibri de lligament, complica molt l'atribució funcional dels efectes observats, ja que si es troba associació genètica en un dels polimorfismes, el polimorfisme causal pot estar situat a 80 kb d'aquest, amb el que és difícil, no només trobar la variació causal, sinó també atribuir els efectes observats a un gen concret. La regió que potencialment conté la variació causal és una regió mínima de 80 kb que conté més d'un gen.

La presència a tan sols 3 kb de DOR del gen AIB3, el qual codifica per a un coactivador transcripcional que també podria jugar un cert rol en diabetis de tipus 2 o en obesitat, al coactivar receptors nuclears com PPAR γ (Zhu *et al.*, 2000; Stumvoll *et al.*, 2002), els quals han estat implicats en aquestes patologies, va fer que el plantejament de l'estudi d'associació genètica no fos exclusivament amb el gen DOR, sinó també conjuntament, amb el gen AIB3. Així, el plantejament inicial es va redefinir per tal d'acomodar-se a la nova situació: Es va passar d'un estudi d'associació genètica amb un gen candidat (DOR) a un estudi d'associació genètica amb una regió genòmica candidata (la que conté els gens DOR i AIB3).

Amb els polimorfismes seleccionats i amb un cert coneixement de l'estructura genètica de la regió que es volia estudiar, es va iniciar l'avaluació de l'associació genètica entre els gens DOR i AIB3 amb la diabetis de tipus 2 i l'obesitat.

Resultats dels estudis d'associació genètica

Els resultats dels estudis d'associació genètica presentats en aquesta tesi suggereixen associació genètica amb diabetis de tipus 2 i amb obesitat, a més de mostrar nombroses correlacions entre els polimorfismes estudiats i diferents paràmetres clínics relacionats amb les anteriors patologies (Taula 25).

	Paràmetre	DOR5	DOR1	AIB6	AIB1	AIB7
Haplotips majors.	41%	C	C	G	C	T
	33%	G	G	C	C	C
	7%	G	G	G	T	T
	6%	C	G	C	C	T
Combinacions de genotips	27%	H	H	H	C	H
	15%	C	C	G	C	T
	15%	G	G	C	C	C
	9%	G	G	H	H	H
	8%	H	H	G	H	T
	6%	C	H	H	C	T
Obesitat	ÍCC					CT (↑,♂)
	<i>Suprailiac, subscapular, biceps skinfold</i>		GG (↑,♀)			
Sensibilitat a insulina	Sensibilitat a insulina		GG (↓,♂)	GG (↓,♀)		
	Glucosa		~			T/ (↑,♂)
	Triglicèrids	GG (↑,♂)				
DM2	Associació amb DM2			GG (risc) (♀)	GC (prot.)	

Taula 25. Resum d'associacions i correlacions observades en els estudis de genotipació dels gens DOR i AIB3. Es mostra per a cada paràmetre els resultats positius (en gris), indicant el genotip associat i entre parèntesi l'efecte observat. risc: genotip de risc; prot.: genotip protector; ↑: augmentat; ↓: disminuït; ♂: observat en dones; ♀: observat en homes.

Els resultats es poden agrupar en diferents blocs. Per començar, hi ha diferents associacions relacionades amb obesitat:

Existeixen correlacions amb paràmetres clínics que es relacionen amb obesitat, tals com l'ÍCC, o les mesures dels plecs de pell suprailiacs, subscapulars i del bíceps, que permeten reforçar la idea que en aquesta regió existeix un gen associat amb obesitat. El primer d'aquests, l'índex de cintura-cadera correlaciona amb AIB7, sent més elevat aquest en el grup heterozigot, mentre que els plecs de pell, indicadors d'obesitat subcutànea, són menors en dones amb el genotip heterozigot de DOR1.

En els estudis d'associació, també s'observen associacions amb diabetis de tipus 2:

En els resultats del polimorfisme AIB6 s'observa una distribució de genotips en dones diabètiques diferent a la que s'observa en el corresponent grup control (Taula 13 i Taula 14). Així, el grup de dones amb el genotip GG està augmentat en el grup diabètic (OR=1.75, p=0.011), acompanyat de la disminució dels heterozigots (OR=0.62, p=0.018) i el manteniment de la freqüència dels homozigots C. Aquesta associació no s'observa en homes ni tampoc s'observa amb obesitat. L'efecte observat es considerable en diabetis de tipus 2, però no cal oblidar que la grandària mostral és reduïda, pel que

els intervals de confiança dels ORs, indicadors de la magnitud de l'efecte, són força amplis. El resultat no permet afirmar amb rotunditat l'existència d'una associació genètica entre el polimorfisme AIB6 i diabetis de tipus 2 en dones, però sí que ho suggereix, pel que resultaria interessant ampliar aquest estudi a altres poblacions amb grups amb una grandària mostral superior a l'estudiada.

En conjunt, podem afirmar que hi ha indicis que suggereixen el paper d'algun dels gens de la regió, en les patologies de la diabetis de tipus 2 i la obesitat, malalties que d'altra banda estan relacionades, i que tindria una major repercussió en dones.

Però a més d'aquests resultats, aquests estudis presenten una forta evidència que la regió genòmica que conté els gens DOR i AIB3 associa amb paràmetres clínics relacionats, entre d'altres, amb la diabetis de tipus 2 i l'obesitat.

Així, s'observen correlacions entre els polimorfismes estudiats i concentració de triglicèrids, índex cintura-cadera, sensibilitat a insulina, i també amb osteocalcina: El polimorfisme DOR5 correlaciona amb concentració de triglicèrids circulants; DOR1 lleugerament amb sensibilitat a insulina; i AIB7 amb triglicèrids, i índex cintura-cadera.

En relació amb la síndrome metabòlica, els paràmetres amb els que s'observa correlació són paràmetres d'una gran rellevància en aquesta síndrome, éssent fins i tot algun d'ells, paràmetres diagnòstics.

Els nivells de triglicèrids es relacionen amb el metabolisme lipídic i en situació elevada són un factor de risc a patologies cardiovasculars. A més, els nivells de triglicèrids estan elevats en situacions d'obesitat i de diabetis de tipus 2 i correlacionen amb la sensibilitat a insulina. Quan aquests nivells s'han analitzat per a cada genotip dels polimorfismes estudiats, s'observen diferències significatives de les mitjanes de triglicèrids en la distribució de genotips del polimorfisme DOR5. Aquesta diferència es manifesta en uns nivells més elevats en el genotip GG de DOR5 que disminueixen progressivament fins a arribar als nivells més baixos que s'observen en l'homozigot de l'altre al·lel. Quan es fa l'anàlisi de regressió multivariable es confirma el paper d'aquest polimorfisme com a modulador dels nivells de triglicèrids. Els nivells elevats de triglicèrids en GG de DOR5 coincideixen amb un efecte de risc d'aquest polimorfisme al desenvolupament d'obesitat, però associat a un efecte protector al desenvolupament de diabetis de tipus 2.

Els resultats mostren certa complexitat que pot ser deguda a l'existència d'efectes provinents de diferents polimorfismes, i a més, aquests efectes podrien tenir una explicació complexa, ja que podrien provenir d'efectes en diferents teixits.

Anàlisi de l'expressió dels gens DOR i AIB3

Per tal d'obtenir informació de la regulació de l'expressió dels gens DOR i AIB3 que permetés entendre millor el seu possible rol com a gens de susceptibilitat a diabetis de tipus 2 i obesitat, es va valorar l'expressió d'aquests gens mitjançant PCR a temps real, en diferents mostres de RNA, provinent de biòpsies en humans i de models animals.

Els resultats obtinguts indiquen regulacions d'aquests gens sota diferents condicions. Així, el primer que s'observa és que DOR és un gen regulat negativament en múscul

esquelètic per l'ÍMC: En obesos, l'expressió de DOR disminueix un 75% de mitja ($p=0.0139$), existint una correlació de l'expressió de DOR i l'ÍMC, en el conjunt de les mostres ($r^2=0.1441$, $p=0.013$); en el cas d'AIB3 no s'observa aquesta correlació, tot i que no es pot descartar que l'existència d'alguna variable de confusió l'emascari, ja que si s'exclouen els 3 individus del grup d'obesos amb els valors més alts d'expressió (amb els valors més baixos d'insulina basal entre els obesos), aleshores s'observa una forta correlació amb l'ÍMC ($r^2=0.4906$, $p=0.0004$). Però, si bé els resultats de DOR es basen en resultats directes, el fet de no observar les correlacions amb ÍMC per a AIB3, a menys que s'excloïn algunes de les mostres no permet afirmar una relació directe entre ambdós.

També s'observa una disminució de l'expressió dels gens en múscul esquelètic en diabetis de tipus 2. L'expressió de DOR disminueix fortament, en un 75% ($p=0.0087$), mentre que la d'AIB3 ho fa un moderat 30% ($p=0.0219$). La disminució de l'expressió de DOR pot ser explicada com a conseqüència de la correlació observada entre l'expressió dels gens i l'ÍMC, ja que el grup diabètic està format d'individus amb un elevat ÍMC. Ara bé, el que no es pot explicar a partir de la correlació amb ÍMC és l'augment d'un 75% de l'expressió de DOR en teixit adipós blanc de diabètics ($p=0.0225$), ja que en aquest teixit no s'observa una correlació entre l'expressió de DOR i l'ÍMC.

A més de les correlacions amb ÍMC (obesitat) i amb diabetis de tipus 2 també s'observen altres correlacions. Així, per a AIB3, en múscul esquelètic s'observa una correlació negativa amb insulina basal ($r^2=0.1877$, $p=0.02647$), que és especialment pronunciada, tot i no ser significativa, en el grup d'obesos ($r^2=0.4191$, $p=0.1160$). Aquesta observació va acompanyada de l'observació de correlació positiva en controls amb l'oxidació de glucosa després d'un clamp ($r^2=0.7767$, $p=0.0038$).

En el cas de DOR s'observa una correlació positiva entre l'expressió en no diabètics i l'oxidació de glucosa basal ($r^2=0.1916$, $p=0.022$), i l'expressió en no diabètics primis i insulina basal ($r^2=0.355$, $p=0.019$). També s'observa en controls una correlació negativa de l'expressió de DOR amb la utilització de glucosa després d'un clamp ($r^2=0.359$, $p=0.018$), i l'estoc ($r^2=0.315$, $p=0.030$). Ara bé, aquestes correlacions observades en els controls (no diabètics primis) no s'observen quan s'analitzen en el conjunt dels individus.

Els canvis d'expressió detectats en gen DOR demostren que aquests gen té una important regulació de l'expressió en funció de la situació metabòlica de l'individu. Les grans diferències d'expressió de DOR en obesos i diabètics respecte als controls, així ho indiquen.

Els resultats dels estudis d'expressió d'AIB3 en models animals no mostren gaires canvis d'expressió del gen. Únicament s'observa un increment de l'expressió del gen en teixit adipós blanc de rates tractades amb estreptozotocina (STZ). En el TAB d'aquestes rates l'expressió d'AIB3 és el doble de la que s'observa en rates control. En les rates STZ el TAB experimenta una clara regressió, pel que aquest increment podria guardar alguna relació amb aquest procés. Però també podria ser un efecte de la dràstica disminució d'insulina circulant, fruit de la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques, ja

Discussió

que en múscul esquelètic humà AIB3 sembla estar regulat per insulina, pel que no seria estrany que aquesta regulació també es donés en teixit adipós blanc de rates.

Conclusions

Conclusions

Els resultats de la tesi permeten arribar a les següents conclusions:

1. **La regió que conté els gens DOR i AIB3 (aproximadament 140 kb) està en fort desequilibri de lligament**, conformant una illa de desequilibri de lligament.
2. **S'ha detectat associació entre els polimorfismes DOR5, DOR1, AIB1 i AIB7 i diferents paràmetres relacionats amb adipositat o resistència a la insulina.** Aquesta observació permet postular un possible rol dels gens DOR i/o AIB3 en el control de la massa adiposa i la sensibilitat a la insulina.
3. **L'expressió del gen DOR està fortament regulada en múscul esquelètic i teixit adipós blanc humà.** Així, l'obesitat i la diabetis de tipus 2 causen la repressió de l'expressió de DOR en múscul esquelètic, mentre que la diabetis de tipus 2 n'incrementa l'expressió en teixit adipós blanc.

Material i mètodes

Contingut de Material i mètodes

I. MOSTRES BIOLÒGIQUES.....	93
I.1. Animals.....	93
<i>I.1.1. Tractament de rates amb estreptozotocina (STZ).....</i>	<i>93</i>
<i>I.1.2. Extracció de teixits</i>	<i>93</i>
I.2. Individus.....	94
<i>I.2.1. Estudis d'associació genètica.....</i>	<i>94</i>
<i>I.2.2. Estudis de quantificació de RNA missatger de múscul esquelètic humà.....</i>	<i>96</i>
II. EINES INFORMÀTIQUES I ESTADÍSTICA	99
II.1. Bases de dades	99
<i>II.1.1. Bases de dades del National Center of Biotechnology Information (NCBI).....</i>	<i>99</i>
<i>II.1.2. Bases de dades del Celera Discovery System</i>	<i>99</i>
II.2. Anàlisi de seqüències	99
<i>II.2.1. Alineament de seqüències amb el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</i>	<i>99</i>
<i>II.2.2. Alineament de seqüències amb l'algoritme 'ClustalW'</i>	<i>100</i>
<i>II.2.3. Alineament de seqüències de DNA amb el programa 'Seqman'</i>	<i>100</i>
<i>II.2.4. Cerca de RFLPs amb el programa 'SNPtransformer'</i>	<i>100</i>
II.3. Disseny d'encebadors	101
II.4. Disseny de Small Interference RNAs (siRNA)	101
II.5. Estimació de la freqüència d'haplotips i del desequilibri de lligament	101
II.6. Gestió de vectors	102
II.7. Anàlisi estadístic.....	102
<i>II.7.1. Comparacions dels nivells d'expressió de mRNA amb el programa 'GraphPad Prism'</i>	<i>102</i>
<i>II.7.2. Comparacions de freqüències genotípiques o al·lèliques entre dos grups i càlcul de odds ratio</i>	<i>103</i>
<i>II.7.3. Estimació del Population attributable risk (PAR)</i>	<i>103</i>
<i>II.7.4. Anàlisi de regressió lineal multivariable.....</i>	<i>103</i>
<i>II.7.5. Anàlisi de resultats de xips de DNA (microarray).....</i>	<i>103</i>

III. TÈCNiques GENERALS D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	105
III.1. Tècniques d'obtenció de RNA total	105
<i>III.1.1. Aïllament de RNA total mitjançant el reactiu 'Trizol'</i>	<i>105</i>
<i>III.1.2. Tractament del RNA amb dnasa.....</i>	<i>105</i>
<i>III.1.3. Aïllament de RNA total mitjançant 'RNeasy'</i>	<i>106</i>
<i>III.1.4. Concentració del RNA per precipitació</i>	<i>106</i>
III.2. Obtenció de cDNA	107
III.3. Obtenció de DNA plasmídic.....	107
III.4. Purificació de DNA en gel d'agarosa	108
III.5. Clonació de productes de PCR en un vector pGEM-T Easy.....	108
IV. TÈCNiques ESPECÍFIQUES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS.....	109
IV.1. Generació del vector de reemplaçament del gen DOR.....	109
<i>IV.1.1. Procediment per a l'obtenció del vector pBS DOR KO South.....</i>	<i>109</i>
<i>IV.1.2. Procediment per a l'obtenció del vector pBS DOR KO PCR.....</i>	<i>113</i>
<i>IV.1.3. Comprovacions per seqüenciació del vector generat.....</i>	<i>116</i>
<i>IV.1.4. Cribratge per PCR dels recombinants homòlegs.....</i>	<i>117</i>
IV.2. Generació de vectors lentivirals 1: Obtenció dels plasmidis.....	118
<i>IV.2.1. pLVTHM siRNA.....</i>	<i>119</i>
V. TÈCNiques GENERALS D'AMPLIFICACIÓ I DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	121
V.1. Amplificació de DNA per PCR.....	121
<i>V.1.1. Disseny d'encebadors</i>	<i>121</i>
<i>V.1.2. Selecció de la DNA polimerasa</i>	<i>122</i>
<i>V.1.3. Optimització de les condicions de la reacció</i>	<i>122</i>
<i>V.1.4. Estratègies en dues rondes.....</i>	<i>123</i>
<i>V.1.5. Paràmetres que afecten les condicions de la PCR</i>	<i>124</i>
V.2. LM-PCR: 'Ligation Mediated-PCR'	125
V.3. Seqüenciació de DNA	127
V.4. Selecció de polimorfismes per a la genotipació.....	127
V.5. Amplificació i detecció de DNA per PCR a temps real.....	128
<i>V.5.1. Criteris de disseny dels encebadors.....</i>	<i>129</i>

V.5.2. Optimització de les condicions d'amplificació.....	130
VI. TÈCNiques ESPECÍFIQUES D'AMPLIFICACIÓ I DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	131
VI.1. Seqüenciació del gen DOR en ratolí	131
VI.1.1. Amplificació de regions del gen DOR.....	131
VI.1.2. LM-PCR del gen DOR	132
VI.2. Genotipació de polimorfismes dels gens DOR i AIB3.....	133
VI.2.1. Encebadors i condicions de l'amplificació	133
VI.2.2. Condicions i anàlisi de les digestions	136
VI.2.3. Interpretació dels resultats	138
VI.3. Quantificació relativa de mRNA per PCR a temps real.....	138
VI.3.1. Quantificació relativa dels transcrits del gen DOR i AIB3 per PCR a temps real	138
VII. TÈCNiques GENERALS DE CULTIUS CEL·LULARS	141
VII.1. Tripsinització.....	141
VII.2. Congelació de cèl·lules	141
VII.3. Descongelació de cèl·lules	142
VII.4. Introducció de DNA exògen en cèl·lules.....	142
VII.4.1. Transfecció de cèl·lules pèl mètode del fosfat càlcic.....	142
VII.4.2. Transfecció de cèl·lules amb Lipofectamina 2000.....	144
VII.4.3. Transfecció de cèl·lules per electroporació.....	144
VII.4.4. Transfecció de cèl·lules per infecció amb vectors lentivirals.....	144
VII.4.5. Determinació de l'eficiència de transfecció per citometria de flux (FACS)	145
VII.5. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux.....	146
VII.6. Generació de vectors lentivirals 2: Obtenció de les partícules virals.....	147
VII.6.1. Purificació i concentració de lentivirus.....	149
VII.7. Titolat de vectors lentivirals.....	149
VIII. TÈCNiques ESPECÍFIQUES DE CULTIUS CEL·LULARS	151
VIII.1. Cultiu de línies cel·lulars.....	151
VIII.1.1. Cultiu de cèl·lules de la línia cel·lular HeLa.....	151
VIII.1.2. Cultiu de cèl·lules de la línia cel·lular 293T	151

I. MOSTRES BIOLÒGIQUES

I.1. Animals

S'han utilitzat rates albines (*Rattus norvegicus*) de raça *Wistar* comprades a 'Harlan' (Interfauna Ibèrica SA): Mascles de 180-220 g, alimentats *ad libitum* amb pinso de tipus A04 de la casa 'Panlab' i mantinguts en unes condicions d'establació controlades automàticament: temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, humitat relativa 80-90%, cicles de llum/fosc de 12 hores cadascun.

Tots els protocols utilitzats han estat prèviament autoritzats pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona.

I.1.1. Tractament de rates amb estreptozotocina (STZ)

Un dels models de diabetis mellitus de tipus 1 més utilitzats és el de les rates STZ. En aquestes rates l'administració d'estreptozotocina, un tòxic específic de cèl·lula beta pancreàtica, provoca la destrucció d'aquestes, donant lloc a un fenotip de diabetis de tipus 1.

Material, solucions i reactius:

Estreptozotocina
Citrat sòdic 50mM pH 4.5

Procediment:

Es dissol la STZ en tampó citrat sòdic 50 mM, pH 4.5 i es manté a 4°C . S'injecta intraperitonealment a una dosi de 70 mg/kg de pes corporal (en un volum de 300 μl / 200 g) una setmana abans del dia d'experimentació. Per estar segurs de l'eficàcia del tractament amb STZ es controla la glucèmia dels animals dos dies després de la injecció i en cas de no observar un augment en la glucèmia es repeteix la injecció. Només s'utilitzen animals amb glucèmies superiors a 300 mg/dl.

I.1.2. Extracció de teixits

Previ a l'extracció dels teixits els animals han estat anestesiats amb pentobarbital. Abans de sacrificar-los se'ls ha extret el múscul sòleus, el cor, i teixit adipós blanc epididimal, que són congelats immediatament en nitrogen líquid. La conservació dels teixits es fa en un congelador a -80°C .

En el cas dels experiments amb el model de rata diabètica de tipus II 'Goto-Kakizaki' (GK) i dels experiments amb el model de rata obesa Zucker s'han fet servir teixits que han estat amablement cedits pel Dr. Luc Martí i la Dra. Anna Abella (GK), i pel Dr. Daniel Bach (Zucker).

I.2. Individus

I.2.1. Estudis d'associació genètica

Per als estudis d'associació genètica s'han utilitzat DNAs provinents de diferents hospitals. Bàsicament s'han genotipat pacients de 3 hospitals diferents:

- Pacients de l'Hospital 'Josep Trueta' de Girona: corresponents als estudis d'associació genètica amb diabetis, obesitat i retràs del creixement intrauterí.
- Pacients de l'Hospital 'Joan XXIII' de Tarragona: corresponents als estudis d'associació genètica amb diabetis o obesitat.
- Pacients de l'Hospital 'Carlos Haya' de Màlaga: corresponents als estudis d'associació genètica amb diabetis o obesitat.

a) Estudis d'associació genètica amb diabetis de tipus 2 i obesitat

Els criteris de selecció que s'han seguit són els següents:

Els individus normotolerants tenen una concentració de glucosa en plasma en dejuni inferior a 7 mM i una concentració de glucosa en plasma 2h després d'un test de tolerància a la glucosa oral inferior a 11.1 mM. La intolerància a la glucosa s'ha definit segons els criteris de l'Associació Americana de Diabetis, és a dir, si tenen concentracions de glucosa a 2h després d'un test de tolerància a la glucosa oral, entre 7.8 i 11.1 mM. Cap dels individus no diabètics tenia cap alteració metabòlica a banda d'obesitat i tots ells tenien un ÍMC<40. Els problemes hepàtics i les disfuncions de la tiròides es van descartar per anàlitiqües específiques.

Per als pacients diabètics de tipus 2, d'acord amb els criteris de l'Associació Americana de Diabetis, es van reclutar en base a un control metabòlic estable en els 6 mesos previs, definit per valors estables de HbA1c. Els criteris d'exclusió que es van seguir són els següents: 1) presència significativa de malalties sistèmiques, hepàtiques, neurològiques, endocrinològiques, o altres; 2) historial o evidència actual d'hemocromatòsi; 3) historial d'abús de drogues o alcohol, definit com més de 80 g/dia en homes i més de 40g/dia en dones, o activitat de transaminàses en sèrum més de dues vegades superior al límit normal superior; 4) una concentració elevada de creatinina en sèrum; 5) algun episodi major agut d'accident cardiovascular en els 6 mesos previs; 6) evidències de malalties inflamatòries cròniques o evidència actual de malaltia inflamatòria aguda o de malaltia infecciosa; 7) malaltia mental que impedeixi entendre la naturalesa, objectiu, i possibles conseqüències de l'estudi. L'estudi va ser aprovat pels corresponents Comitès d'Ètica.

Algunes dades generals dels individus es mostren a la Taula 26. Tots els DNAs han estat obtinguts a partir de la seva extracció de sang.

	No diabètic	Diabètic de tipus 2
n total	542	655
ÍMC (kg/m ²)		
n	515	626
Mitjana±error	28.07±0.22	29.30±0.19
Edat (anys)		
n	465	623
Mitjana±error	45.43±0.61	60.21±0.44
Sexe		
n	468	625
homes/dones	278/190	328/297

Taula 26. Mitjanes i error típic d'ÍMC i d'edat per cada grup estudiat, així com el número d'homes i dones per cada grup.

b) Estudi d'associació genètica amb retràs del creixement intrauteri

En la Taula 27 es mostren els valors de les variables clíniques dels dos grups estudiats en aquest estudi. Tots els nens seleccionats són pre-pubertals (<10 anys en nenes, i <12 anys en nens) per tal d'evitar els canvis importants de sensibilitat a insulina causats per la pubertad.

	SGA	AGA	p
n	74	74	
Al naixement			
Sexe (male/female)	32/42	44/30	0.35
Edat gestacional (setmanes)	39.0 ± 2.0	39.3 ± 1.3	ns
Pes naixement SDS	-2.1 ± 0.6	-0.1 ± 0.8	<0.0001
Longitud naixement SDS	-2.2 ± 0.9	-0.4 ± 1.0	<0.0001
Al moment de l'estudi			
Edat (anys)	5.7 ± 3.1	6.1 ± 3.2	ns
Pes SDS	-1.1 ± 1.4	0.3 ± 1.4	<0.0001
Alçada SDS	-1.7 ± 1.3	-0.3 ± 1.4	<0.0001
ÍMC SDS	-0.4 ± 1.4	0.5 ± 1.6	<0.0001
ÍCC	0.93 ± 0.1	0.96 ± 0.1	0.048
Glucosa (mmol/l)	4.7 ± 0.5	4.8 ± 0.5	0.076
Insulina (pmol/l)	32.3 (20.8-44.5)	35.2 (14.9-57.4)	ns
HOMA-IR	0.9 (0.6-1.3)	1.0 (0.4-1.7)	ns
HOMA-β-cell	73.4 (51.8-105.0)	71.2 (47.5-120.6)	ns

Taula 27. Característiques dels grups estudiats en l'estudi d'associació genètica amb RCI. SGA: small for gestational age; AGA: appropriate for gestational age; SDS: age- and sex-adjusted standard deviation score; SBP/DBP: systolic and diastolic blood pressure. Les dades s'expressen com a mitja ± desviació estàndard per a les variables Gaussianes i com a mitjana i rang interquartil per a variables no Gaussianes variables. Valors de p corresponents al test t de Student.

1.2.2. Estudis de quantificació de RNA missatger de múscul esquelètic humà

Mostres de Suècia:

Per als estudis de correlació entre expressió de missatger i genotip s'ha utilitzat RNA total provinent de múscul esquelètic humà *vastus lateralis*. El primer grup consisteix en 17 individus, tots ells de sexe masculí: 9 individus control, i 8 individus diabètics de tipus 2. Les biòpsies de múscul van ser realitzades al 'Department of Clinical Physiology' del 'Karolinska Institute' (Estocolm, Suècia), complint la normativa vigent al respecte a Suècia i van ser enviades a Barcelona en neu carbònica, on es va obtenir el RNA. El segon grup consisteix en 21 individus control de sexe masculí amb el mateix origen però que van ser enviats directament en forma de cDNA. Aquestes mostres estan referides en el text com a 'mostres de Suècia'.

	Controls	Diabètics
n	30	8
ÍMC (kg/m ²)	24.09±0.55	27.50±1.40
Edat (anys)	50.77±1.80	58.33±1.53
Sexe	masculí	masculí

Taula 28. Característiques dels individus estudiats en les 'mostres de Suècia'. Es mostren els valors de mitjana±error típic d'índice de massa corporal, edat, i sexe.

Mostres de Lyon:

Per als estudis de correlació entre l'expressió dels gens DOR i AIB3 amb diferents paràmetres clínics es va utilitzar RNA total que havia estat extret de múscul *vastus lateralis* i en alguns casos de teixit adipós blanc al 'Centre de Recherche en Nutrition Humaine de la Faculté de Médecine R.T.H. Laennec' (Lyon, França). Les biòpsies i l'extracció d'RNA les van realitzar el personal de l'INSERM U.449, segons la metodologia del seu laboratori i complint la legislació vigent a França en quant a protocols d'experimentació amb humans.

a)	Controls	Obesos	Diabètics
n	8	8	8
ÍMC (kg/m ²)	22.5±0.5	35.3±1.3	30.3±1.2
Edat (anys)	42.4±5.3	39.9±4.5	53.3±2.7

b)	Controls	Obesos	Diabètics
n	15	12	15
ÍMC (kg/m ²)	22.9±0.6	34.4±1.0	31.6±1.2
Edat (anys)	38.8±3.9	38.9±3.6	53.1±2.2

Taula 29. Característiques dels individus estudiats en les 'mostres de Lyon'. a) Valors corresponents al primer grup estudiat. b) Valors corresponents al segon grup estudiat. Es mostren els valors de mitjana±error típic d'índice de massa corporal, edat, i sexe.

Els pacients que es van estudiar eren un primer grup de 8 voluntaris sans i prims (6 dones i 2 homes), 8 voluntaris obesos (7 dones i 1 home), i 8 voluntaris diabètics de tipus 2 (6 dones i 2 homes); i un segon grup de 15 voluntaris sans i prims (10 dones i 5

homes), 12 voluntaris obesos (10 dones i dos homes) i 15 voluntaris diabètics de tipus 1 (9 dones i 6 homes). Aquestes mostres estan referides en el text com a 'mostres de Lyon' (Taula 29).

II. EINES INFORMÀTIQUES I ESTADÍSTICA

Una part important d'aquesta tesis ha estat realitzada amb suport informàtic. Així el disseny de primers, el disseny de vectors, la cerca de SNPs, i un llarg etc. han estat possibles o s'han agilitzat enormement gràcies a la disponibilitat de bases de dades o programes que ho han permès. A continuació es descriuen algunes de les moltes eines que s'han utilitzat.

II.1. Bases de dades

II.1.1. Bases de dades del National Center of Biotechnology Information (NCBI)

Una de les bases de dades més completes que existeix a internet és la del NCBI, centre que forma part dels 'National Institutes of Health' dels Estats Units. Aquesta integra gran quantitat d'informació que va des de la informació del genoma humà a articles, incloent a més eines molt útils com per exemple les que permeten navegar en aquesta informació, com en el cas d'alguns genomes, o cercar seqüències homòlogues a una seqüència donada, com el blast.

Per a la cerca de nous polimorfismes una de les bases de dades que s'ha utilitzat ha estat la base de dades de SNPs d'aquest servidor, que ofereix aquesta informació per diferents mitjans, un d'ells el navegador del genoma humà (amb la informació del consorci públic de seqüenciament del genoma humà).

Enllaç: <http://www.ncbi.nih.gov>

II.1.2. Bases de dades del Celera Discovery System

L'alternativa comercial als servidors públics de recursos del genoma humà és el 'Celera Discovery System' que utilitza la informació de la seqüenciament del genoma humà provinent de l'empresa 'Celera'. Aquest servidor, tot i que no tant complet com el públic, ofereix als seus inicis certs avantatges sobre el públic. Principalment ens referim a la informació de polimorfismes, que inicialment era superior. Alguns dels polimorfismes estudiats tan sols es trobaven en aquesta base de dades, si bé actualment la majoria també es troben en les bases de dades públiques.

Enllaç: <http://www.celeradiscoverysystem.com>

II.2. Anàlisi de seqüències

II.2.1. Alineament de seqüències amb el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

El blast permet la cerca de seqüències homòlogues en les bases de dades de seqüències de DNA o proteïna. El programa compara la seqüència problema amb totes les

seqüències de la base de dades mostrant com a resultat aquelles seqüències amb un grau d'homologia superior.

Si bé originalment s'ha utilitzat el blast del NCBI, des de l'aparició del blast del projecte 'Ensembl' aquest és el que s'ha utilitzat per a les cerques en genoma humà, de rata, o de ratolí, per ser més ràpid i més amigable en quant a l'obtenció del resultat.

Enllaços: <http://www.ncbi.nih.gov/blast>
<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>

II.2.2. Alineament de seqüències amb l'algoritme 'ClustalW'

L'algoritme 'clustalw' permet obtenir el millor alineament entre múltiples seqüències de DNA o proteïna. Per tal de fer aquest anàlisi existeixen diferents llocs d'internet i programes que faciliten l'anàlisi. En aquesta tesi s'ha usat el programa 'MegAlign' del paquet 'Lasergene' (DNASStar) que a més de permetre l'alineament de seqüències per clustal també permet usar altres mètodes d'alineament com el 'Jotun-Hein', 'Wilbur-Nipman', i altres, o la construcció d'arbres filogenètics entre les diferents seqüències.

II.2.3. Alineament de seqüències de DNA amb el programa 'Seqman'

La seqüenciació d'una regió ampla de DNA s'ha de fer forçosament en etapes, seqüenciant per separat fragments de 500-700 parells de bases. Com a resultat s'obtenen múltiples seqüències que un cop alineades permeten obtenir la seqüència de tota la regió (el que en anglès es coneix com a *contig*), però el procés pot resultar molt laboriós si es fa a mà. És per això que existeixen programes específics que fan l'alineament. El que s'ha utilitzat en aquesta tesi és el 'SeqMan' del paquet de programes 'Lasergene' (DNASStar). El programa permet introduir les seqüències en diferents formats, entre ells el cromatograma que s'obté del seqüenciador. Això facilita l'anàlisi de les seqüències, ja que a més d'alinear-les permet retallar-les (filtrat) segons la qualitat que fixi l'usuari, i permet veure el cromatograma quan hi ha algun conflicte en la seqüència.

II.2.4. Cerca de RFLPs amb el programa 'SNPtransformer'

Els RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*) són aquells SNPs que poden ser analitzats mitjançant un enzim de restricció, ja que provoquen l'aparició/desaparició d'una diana de restricció. Per tal de determinar si un determinat SNP és un RFLP cal analitzar les dianes de restricció en la seqüència de DNA que conté el SNP per a cada al·lel. Si s'observa algun enzim que talla únicament en la seqüència d'un dels al·lells podem afirmar que es tracta d'un RFLP. Per tal d'agilitzar el procés de selecció de RFLPs, el Dr. Bernhard Baumgartner del nostre grup va desenvolupar un programa que permetia fer l'anàlisi automàtic de les dades de SNPs provinents del 'Celera Discovery System'. Aquest programa està disponible a través d'internet.

Enllaç: http://www.geocities.com/bernhard_baumgartner/SNP-Transformer

II.3. Disseny d'encebadors

El programa que s'ha utilitzat en aquesta tesi per al disseny d'encebadors és el 'PrimerSelect' del paquet de programes 'Lasergene' (DNASTar). Aquest programa cerca primers sobre una seqüència donada per l'usuari, permetent fixar certs paràmetres relacionats amb els encebadors o la PCR, com la temperatura d'hibridació dels encebadors, la longitud del producte de PCR, etc.

Enllaç: <http://www.dnastar.com>

II.4. Disseny de *Small Interference RNAs* (siRNA)

Els siRNAs son dúplex de RNA amb un tamany comprès entre 21 i 23 nucleòtids. Aquests dúplex actuen com a intermediaris funcionals en el procés d'interferència del RNA dirigint el trencament de mRNA complementari. El procés d'interferència del RNA és un procés de regulació postranscripcional altament coordinat en el qual es produeix la degradació específica de mRNA. Es considera que a més el procés és un sistema de defensa antiviral.

La transfecció d'aquests siRNAs o d'un vector capaç d'expressar-los en un tipus cel·lular permet la inhibició total o parcial de l'expressió del gen diana. El grau d'inhibició depèn de diferents paràmetres biofísics i termodinàmics relacionats amb el mecanisme catalític del que resulta la degradació del mRNA. Així doncs, cal tenir en compte una sèrie de criteris empírics per tal d'obtenir un siRNA funcional.

En aquesta tesi, per al disseny dels siRNAs es va utilitzar el programa 'Sfold' que és accessible de forma gratuïta a través d'internet. Aquest programa té en compte diferents criteris en el disseny, alguns d'ells no sempre considerats en altres programes, com l'accessibilitat del RNA o alguns criteris termodinàmics. Principalment utilitza els criteris descrits a Reynolds et al., 2004.

Enllaç: <http://sfold.wadsworth.org>

II.5. Estimació de la freqüència d'haplotips i del desequilibri de lligament

Per tal de calcular les freqüències d'haplotips s'ha utilitzat el programa 'Arlequin', disponible gratuïtament a través d'internet. Aquest programa, assumint l'existència d'equilibri 'Hardy Weinberg', fa per a cada grup de mostres una estimació de la freqüència d'haplotips a partir de les freqüències de les diferents combinacions de genotips que existeixen entre els diferents polimorfismes analitzats, utilitzant el mètode de màxima verosimilitud basat en l'algoritme EM (Dempster *et al.*, 1977).

Enllaç: <http://lgb.unige.ch/arlequin>

Amb els haplotips obtinguts es poden calcular els coeficients de desequilibri de lligament D' i D definits per Lewontin (Lewontin, 1964). El coeficient D' avalua el desequilibri de lligament i li adjudica un valor que va des de 0 (absència de desequilibri

de lligament) a 1 (desequilibri de lligament complet). Per fer aquest càlcul s'ha utilitzat un programa dissenyat pel grup del Dr. Bertranpetit (no publicat). La significació estadística del desequilibri de lligament s'ha calculat mitjançant el programa 'Arlequin'.

A més, per tal de valorar el desequilibri de lligament en relació amb les freqüències dels al·lels dels loci s'ha calculat el coeficient d^2 . Aquest es defineix: $d^2 = D^2 / [f(1-f)]^2$; on D és el paràmetre de Lewontin relacionat amb D' , i f és la freqüència de l'al·lel major del locus estudiat. Donat que la comparació és entre dos loci, la f pot ser la del primer locus, o la del segon, donant resultats diferents segons el cas.

II.6. Gestió de vectors

Per a la gestió dels nombrosos vectors que s'han preparat en aquesta tesi es va escollir el programa 'pDRAW32', gratuït i descarregable d'internet. El programa resulta fàcil de manejar i satisfà la majoria de les necessitats bàsiques en quant a treball amb plasmidis: permet fer clonacions *in silico*, anàlisis de restricció, etc.

Enllaç: <http://www.acaclone.com>

II.7. Anàlisi estadístic

II.7.1. Comparacions dels nivells d'expressió de mRNA amb el programa 'GraphPad Prism'

Per als anàlisis de correlacions entre nivells d'expressió i genotips dels polimorfismes estudiats, així com per a avaluar la significació de diferències en l'expressió en diferents tractaments s'ha utilitzat el programa 'GraphPad Prism v4.0'. El programa permet l'anàlisi de diferents estadístics com el test t, la prova ANOVA, etc.

En el cas de les correlacions entre expressió i genotip, per a les comparacions dels nivells d'expressió entre els tres genotips, s'ha aplicat un test ANOVA *one-way* amb anàlisi de les variàncies, i alternativament, per a comparar dos grups concrets, un test t de Student a dues cues. Per a la comparació de l'expressió entre un grup control i un tractat s'ha aplicat un test t de Student a dues cues. En tots els tests s'ha assumit que la distribució dels valors d'expressió s'ajustava a una distribució de tipus Gaussià (distribució normal), supòsit que s'ha comprovat aplicant un test de normalitat a la mostra.

Per tal d'avaluar correlacions entre nivells d'expressió i variables contínues com l'índex de massa corporal (ÍMC) s'han utilitzat regressions lineals en que la variable dependent (y) eren els nivells d'expressió i en que la variable independent (x) eren els valors de la variable contínua.

II.7.2. Comparacions de freqüències genotípiques o al·lèliques entre dos grups i càlcul de odds ratio

Per a avaluar diferències entre freqüències genotípiques o al·lèliques entre dos grups s'ha utilitzat la prova 'Xi-Quadrat' (χ^2). Per tal de fer la prova χ^2 s'ha utilitzat el programa 'Microsoft Excel'.

Com a mesura del risc relatiu conferit per el polimorfisme estudiat, s'ha utilitzat el paràmetre *odds ratio* (OR), el qual es calcula, per a una determinada població, dividint la proporció de casos observada entre els portadors de l'al·lel o el genotip de risc, per la proporció de casos observada entre els no-portadors. Per a aquest càlcul s'ha utilitzat el programa 'EpiInfo' versió 6.0, que a més a més permet el càlcul dels intervals de confiança al 95%.

II.7.3. Estimació del Population attributable risk (PAR)

El càlcul del PAR s'ha fet amb el programa '*Mach 2010 Quick Risk Calculator*' disponible a internet en la següent adreça:

<http://www.urmc.rochester.edu/cpm/education/mach/productspubs.html>

II.7.4. Anàlisi de regressió lineal multivariable

La regressió lineal permet estimar els coeficients de l'equació lineal, amb una o més variables independents, que millor predigui el valor de la variable dependent. D'aquesta manera es pot determinar quines variables independents són predictores d'una variable presumiblement dependent de les variables testades.

Per tal de fer aquests càlculs, en aquesta tesi s'ha utilitzat el programa 'SPSS 11.0', el qual permet fer nombrosos càlculs estadístics a partir d'una fulla de dades que pot ser importada del programa 'Microsoft Excel'.

II.7.5. Anàlisi de resultats de xips de DNA (microarray)

Per a l'anàlisi de resultats dels xips de DNA utilitzats en aquesta tesi es va utilitzar el programari facilitat pel comerciant dels xips (Affymetrix), el '*Gene Chip Operating System*' (GCOS) i el '*Data Mining Tool*', així com la fulla de càlcul 'Excel' (Microsoft).

Mitjançant el primer es van fer les comparacions entre els diferents xips i es van seleccionar aquelles sondes en les que s'observava un canvi de senyal significatiu al comparar entre dos xips. La informació seleccionada es va exportar a la fulla de càlcul 'Excel' per al seu anàlisi posterior. Mitjançant el programa '*Data Mining Tool*' es van fer altres anàlisis com ara els clusters observats, etc.

III. TÈCNiques GENERALS D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Moltes de les tècniques d'obtenció i manipulació d'àcids nucleics que s'han utilitzat en aquesta tesi són d'ús més o menys habitual en els laboratoris de Biologia Molecular. La majoria d'elles es poden trobar detallades en manuals de protocols o bé preparades en forma d'equip comercial amb un protocol detallat inclòs en el mateix. En concret, les primeres s'han basat en els protocols continguts en els manuals '*Molecular Cloning*'. *A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1998) i '*Current Protocols in Molecular Biology*' (Ausubel <Editor>, 2001) i inclouen tècniques habituals en un laboratori de Biologia Molecular com la generació de bacteris competents, la transformació de bacteris competents, l'anàlisi del DNA amb enzims de restricció, l'electroforesi en gel d'agarosa, etc.

Pel que fa a les tècniques preparades en forma d'equip comercial es detallaran els que s'han utilitzat per a les tècniques més rellevants.

III.1. Tècniques d'obtenció de RNA total

Aquestes tècniques permeten l'aïllament de RNA total a partir de qualsevol tipus de teixit o cultiu cel·lular. La manipulació de les mostres s'ha de fer amb prevenció de contaminacions per rnases que puguin provenir de l'ambient o de les mans del manipulador.

Bàsicament s'han utilitzat dos mètodes per a la obtenció de RNA total. El primer és mitjançant el reactiu 'Trizol' (Invitrogen); el segon amb l'equip 'RNeasy' (Qiagen). Generalment s'ha utilitzat el primer a excepció dels RNAs obtinguts per a l'anàlisi amb xips de DNA (microarrays) en que es requereix un elevat grau de puresa del RNA. Aquest és l'avantatge principal del sistema 'RNeasy', tenint com a principal inconvenient el rendiment, que resulta més elevat pel mètode de 'Trizol'.

III.1.1. Aïllament de RNA total mitjançant el reactiu 'Trizol'

El 'Trizol' és un reactiu comercial que permet l'obtenció de RNA a partir de teixits o cultius cel·lulars. Consisteix en una solució de fenol i isotiocianat de guanidini que preserva la integritat del RNA (a l'inactivar les rnases) alhora que lisa les cèl·lules i en dissol els seus components. L'addició posterior de cloroform seguida de centrifugació, permet la separació de la solució en dues fases, una aquosa i una orgànica. El RNA es manté soluble en la fase aquosa, de la qual es precipita amb alcohol isopropílic.

Procediment segons les instruccions del producte.

III.1.2. Tractament del RNA amb dnasa

Per a certes aplicacions resulta convenient tractar el RNA amb dnasa per tal d'eliminar les restes de DNA. Amb tal finalitat s'usa una dnasa lliure de rnases.

Material, solucions i reactius:

Dnasa I (Ambion)
Tampó 10x (inclòs amb la dnasa)
Aigua lliure de rnases

Procediment:

- 1- Afegir 2U de dnasa I, i el tampó apropiat a 10µg de RNA. Afegir aigua fins al volum desitjat. Usualment entre 20 i 50 µl. NO VORTEJAR, ja que la dnasa I és un enzim sensible al tractament mecànic.
- 2- Incubar durant 30' a 37°C.
- 3- Procedir a la purificació del RNA mitjançant 'Trizol', columnes 'RNeasy' o qualsevol altre protocol de purificació de RNA.

III.1.3. Aïllament de RNA total mitjançant 'RNeasy'

En algunes extraccions s'ha utilitzat l'equip comercial d'extracció de RNA total de la casa 'Qiagen', que permet obtenir preparacions de RNA total de fins a 100 µg a partir de cèl·lules animals i teixits, bacteris i llevats (mitjançant el 'RNeasy Mini kit').

El protocol consisteix bàsicament en una lisi i homogeneïtzació de les mostres en presència d'isotiocianat de guanidini (potent desnaturalitzant que preserva la integritat del RNA a l'inactivar les rnases). L'ús d'una columna de gel de sílice permet la separació del RNA total (de llargada superior a 200 bases). A més, el protocol inclou un pas alternatiu de tractament amb dnasa que permet la digestió del DNA durant el procediment de purificació.

Procediment segons les instruccions del producte.

III.1.4. Concentració del RNA per precipitació

En molts casos ha estat necessari treballar amb concentracions elevades de RNA (p.e. per al xip de DNA). En aquests casos pot ser necessari concentrar la mostra obtinguda i és per això que s'ha emprat la coprecipitació del RNA amb acrilamida. Aquesta actua com a vehicle de l'àcid nucleïc facilitant-ne la recuperació i incrementant el rendiment.

Material, solucions i reactius:

Acetat d'amoni 5M lliure de rnases
Acrilamida lineal 5mg/ml (Ambion)
Etanol absolut
Etanol 80%

Procediment:

- 1- Afegir 0.1 volums d'acetat d'amoni 5M i 10 µg d'acrilamida lineal.

- 2- Afegir 2-2.5 volums d'etanol absolut, mesclar, i deixar un temps mínim de 30 minuts a -20°C.
- 3- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 minuts.
- 4- Eliminar el sobrenedant assegurant-se d'eliminar qualsevol resta d'aquest.
- 5- Fer un rentat amb etanol 80% i centrifugar 5' a màxima velocitat.
- 6- Assecar a l'aire i resuspendre en el volum desitjat d'aigua o solució tamponadora.

III.2. Obtenció de cDNA

Per a diferents aplicacions resulta necessari fer el pas de RNA a DNA. És el cas d'aplicacions com la quantificació del RNA missatger d'un transcrit determinat per PCR a temps real, o quan es vol amplificar una determinada seqüència de RNA (amb la finalitat de seqüenciar-la, clonar-la, etc.). El procés de conversió del RNA en DNA s'aconsegueix per acció d'una retrotranscriptasa, enzim capaç de sintetitzar una cadena de DNA usant RNA com a motlle, en presència d'un encebador, que pot ser específic, cas de voler una seqüència concreta, o inespecífic, això és un oligonucleòtid polidT, que hibrida amb les seqüències poliA dels RNA missatger; o bé oligonucleòtids degenerats que idealment permetran la retrotranscripció de tot el RNA.

Amb tal finalitat existeixen diferents equips comercials que inclouen tots els reactius necessaris. L'usat en aquesta tesis és el de 'Invitrogen'.

Procediment segons el protocol.

Nota: Al finalitzar el protocol es pot procedir a la comprovació de la reacció mitjançant una PCR amb primers específics que hibridin en el transcrit d'algun gen que sapiguem que s'expressa en aquella mostra (usualment un gen constitutiu).

III.3. Obtenció de DNA plasmídic

La clonació d'una determinada seqüència de DNA en un vector plasmídic permet l'amplificació d'aquesta seqüència per a diferents aplicacions. Els sistemes d'obtenció de DNA plasmídic més utilitzats són aquells que utilitzen un agent alcalí com a sistema de lisi. La majoria dels equips comercials estan basats en aquest mètode, i és per això que en aquesta tesis s'ha treballat principalment amb aquest mètode. Els equips que s'han utilitzat són els de QIAgen.

Depenent de la quantitat de DNA plasmídic que es vulgui produir existeixen diferents equips amb rangs de purificació diferents. Així per a obtenir quantitats de DNA entre 5 i 15 µg, es disposa d'equips de miniprep (QIAprep Miniprep); entre 300 i 500 µg d'equips de maxiprep (QIAgen Plasmid Maxi Kit); i entre 7 i 10 mg d'equips de gigaprep (QIAgen Plasmid Giga Kit).

Procediment indicat en les especificacions dels equips.

III.4. Purificació de DNA en gel d'agarosa

Per tal de purificar fragments de DNA continguts en un gel d'agarosa s'han utilitzat dos equips comercials diferents: El "QIAex II" de 'Qiagen' i el "GFX PCR and gel band extraction kit" (Amersham). Els dos equips utilitzen una solució amb alt contingut d'una sal caotrópica que combinada amb escalfament (50-60°C) permet la solubilització de l'agarosa i l'alliberament del DNA. Posteriorment el DNA és retingut en una matriu de la que després d'uns rentats s'elueix.

Procediment segons les instruccions dels productes.

III.5. Clonació de productes de PCR en un vector pGEM-T Easy

En molts casos ha resultat útil o necessari clonar productes amplificats per PCR en un vector. En aquests casos l'opció escollida ha estat la clonació en el pGEM-T Easy, inclòs en l'equip del mateix nom (Promega). Breument es tracta d'un vector obert pel lloc de clonació múltiple (EcoR V) al qual s'han afegit dues timidines als extrems 3'. Moltes DNA polimerases afegeixen una adenina als extrems 3' dels productes amplificats (activitat desoxiadenina terminal transferasa) de manera que es poden lligar al vector fàcilment a través de les timidines protuberants.

Procediment segons les instruccions del producte.

Nota: en el cas de voler clonar productes provinents d'una amplificació amb una DNA polimerasa sense activitat dA terminal transferasa (p.e. Pfu polimerasa) es poden afegir fàcilment les adenines afegint 1µl de dATP 2 mM a la mescla de PCR, 1U de Taq polimerasa, i incubant 5' a 96°C seguit de 20' a 72°C (també es pot fer sobre el producte purificat suplementant convenientment amb el buffer de la polimerasa).

IV. TÈCNiques ESPECÍFIQUES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

IV.1. Generació del vector de reemplaçament del gen DOR

Per tal de generar el ratolí KO del gen DOR es van generar dos vectors de reemplaçament. Inicialment es va preparar un vector dissenyat per a un cribratge de recombinants per *southern blot* (pBS DOR KO South), que va ser modificat posteriorment per adaptar-lo a un cribratge per PCR (pBS DOR KO PCR).

Plasmids:

pBluescript II KS
pBluescript II SK
pBluescript II SK-PGK neo
pSP72-PGK tk

Oligonucleòtids:

5'mcs_up	CGCGGCCGCGGGTCTGACTGACTGACTGAGAGCTCGAAT TCCTGAGTAGCT
5'mcs_down	ACTCGAGGAATTCGAGCTCTCAGTCAGTCAGTCGACCC GCGGCCGCGGTAC
3'mcs_up	GGCCGCCTCGAGGGATCCGGTACCATCGATGGAAG CTTGATC
3'mcs_down	AAGCTTCCATCGATGGTACCGGATCCCTCGAGGC
m44_1 (Not I)	ATCCTCGAGCCGGTATGCGGCTCCAGTTGTGA
m44_2 (Xho I)	GCTCTCGAGCAGGAGGCGCAGGGGTGTTGA
3'HR(Xho I)_f	CTCGAGACCCACTCTCCCATGCTTCTTTTT
3'HR(BamH I)_r	GGATCCTTAGTTTCACATTTCTTAAGCAGCC
3'HR(BamH I)_r2	GGATCCGGACATTTGCCAGGACTAAG
5'HR_ext_f(Sal)	GTCGACCATTGGGGCTTCTGCTATAACCACTAAAGC
5'HR_ext_r	TAAAAGGCCAGCGAAATAAGATAACTACC

Material, solucions i reactius:

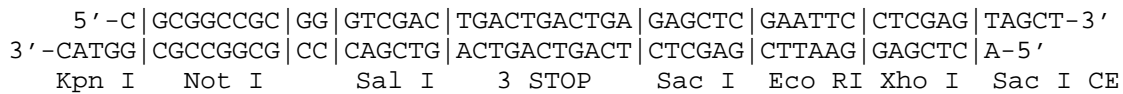
Taq Expand HF
T4 DNA lligassa
T4 DNA polimerasa
Enzims de restricció: BamH I, Sal I, Not I, EcoR I, Kpn I, Sac I, Hind III, Pvu I

IV.1.1. Procediment per a l'obtenció del vector pBS DOR KO South

a) Generació dels vectors pBS II 5'KO i pBS II 3'KO

Per tal de poder clonar els dos braços d'homologia i els cassets de resistència a G418 (neo) i de sensibilitat a ganciclovir (tk) es van preparar dos llocs de clonació múltiple

per a dos vectors pBluescript II. El pBS II 5'KO es va generar reemplaçant el lloc de clonació múltiple del vector pBluescript II KS per el fragment obtingut de la hibridació dels oligonucleòtids 5'mcs_up i el 5'mcs_down:



Amb aquesta finalitat es va digerir el vector amb els enzims Kpn I i Sac I i el producte purificat en gel d'agarosa es va lligar al producte hibridat. Un cop finalitzada la reacció de lligació es van afegir 10 unitats de l'enzim EcoR I (el qual s'havia comprovat previament que tallés) i es va purificar el producte lligat i digerit amb EcoR I mitjançant un gel d'agarosa i la posterior purificació amb QIAex II. El producte extret va ser relligat (Figura 41).

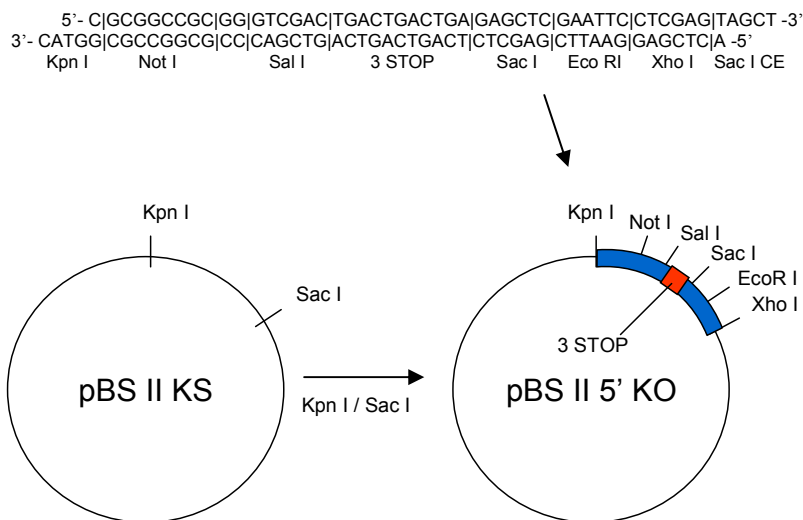
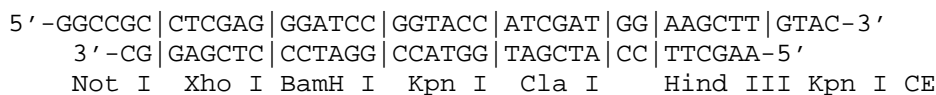


Figura 31. Esquema de la preparació del vector pBS II 5'KO a partir del vector pBluescript II KS i el nou lloc de clonació múltiple preparat amb oligonucleòtids sintètics.

Per el pBS II 3'KO es va partir del vector pBluescript II SK, reemplaçant-li el lloc de clonació múltiple per el fragment obtingut de la hibridació dels oligonucleòtids 3'mcs_up i el 3'mcs_down:



La digestió del vector es va fer amb els enzims Not I i Kpn I. A continuació es va seguir el mateix procediment que s'ha descrit amb el vector pBS II 5'KO (Figura 42).

b) Generació dels vectors pBS II 5'KO-neo i pBS II 3'KO-tk.

Un cop obtinguts els vectors pBS II 5'KO i el pBS II 3'KO es van clonar els cassets de selecció neo en el primer, i tk en el segon. Es van digerir els vectors pBS II 5'KO i

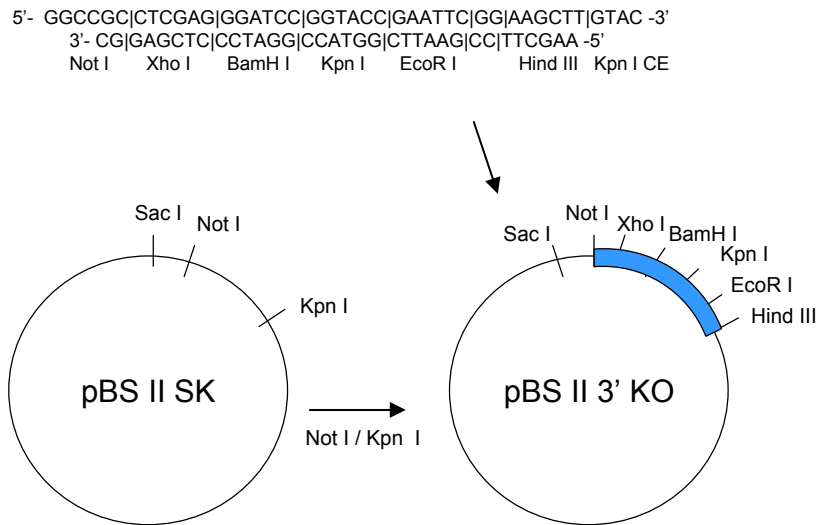


Figura 32. Esquema de la preparació del vector pBS II 3'KO a partir del vector pBluescript II KS i el nou lloc de clonació múltiple preparat amb oligonucleòtids sintètics.

pBluescript II SK-PGK neo amb els enzims Sac I i EcoR I i l'insert alliberat en el segon (aprox. 1.6 kb) es va lligar al vector pBS II 5'KO obert per Sac I i EcoR I, resultant-ne el vector pBS II 5'KO-neo. Per al pBS II 3'KO-tk es van digerir els vectors pBS II 3'KO i pSP72-PGK tk amb els enzims Hind III, EcoR I i Pvu I, i l'insert alliberat en el segon (aprox. 2.7 kb) es va lligar al vector pBS II 3'KO obert per Hind III i EcoR I (Figura 33).

c) Amplificació de les regions d'homologia i clonació en vectors pGEM-T.

L'amplificació de les regions 5' i 3' d'homologia es va fer per PCR usant com a motlle DNA procedent de ratolins SvJ/129 (soca de la qual provenen les cèl·lules mare).

Per a l'amplificació de la regió 5' es van usar els primers m44_1 (Not I) i m44_2 (Xho I) que donen lloc a un producte de 3.5 kb, amb TaqExpand HF i afegint un 6.6% de DMSO. L'amplificació es va fer en les següents condicions:

3'	96°C		x30
30"	96°C		
30"	58°C		
5'	68°C		

Per a l'amplificació de la regió 3' es van usar els primers 3'HR (Xho I)_f i 3'HR (BamH I)_r que donen lloc a un producte de 3.9 kb, amb TaqExpand HF i afegint un 6.6% de DMSO. L'amplificació es va fer en les següents condicions:

3'	96°C		x30
30"	96°C		
30"	60°C		
5'	68°C		

Els productes amplificats van ser carregats en gels d'agarosa per a la seva comprovació i posterior purificació. Un cop finalitzada la seva obtenció es van lligar en un vector p-GEM-T.

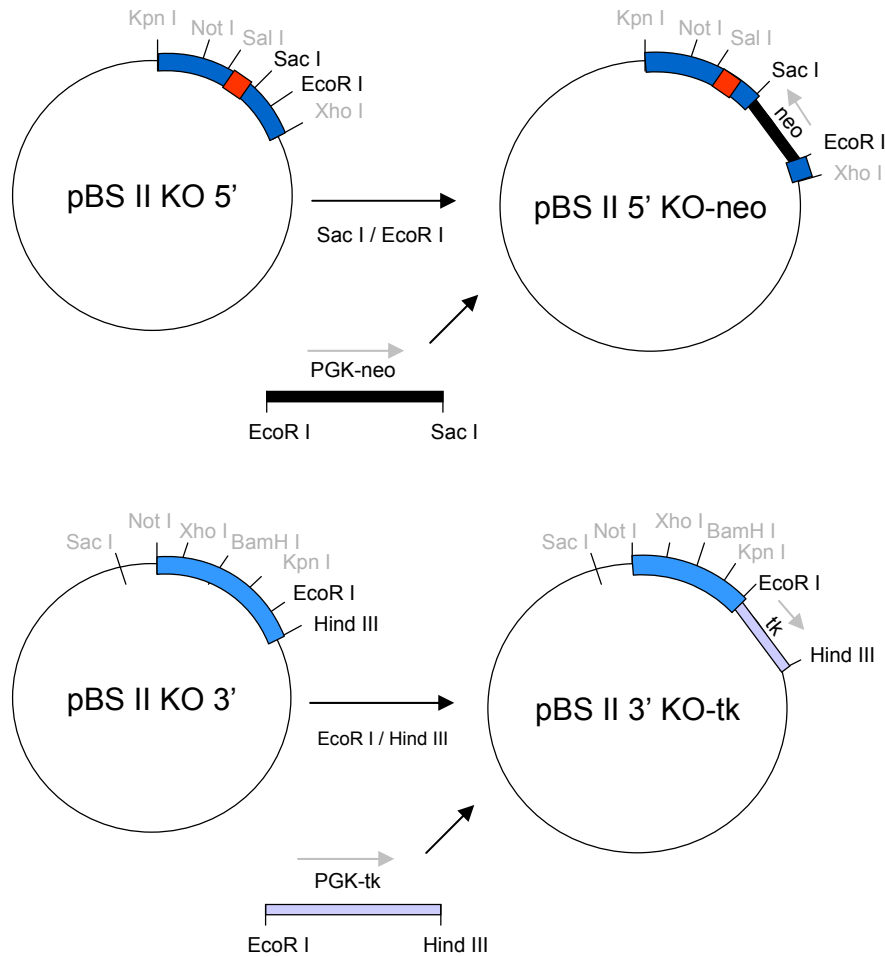


Figura 33. Esquema de la preparació dels vectors pBS II 5'KO-neo i pBS II 3'KO-tk.

d) Generació dels vectors pBS DOR 5'KO-neo i pBS DOR 3'KO-tk.

Per a la generació del vector pBS DOR 5'KO-neo es va clonar l'insert 5'HR alliberat del vector pGEM-T 5'HR amb Not I i Xho I al vector pBS 5'KO-neo obert per Not I i Sal I. La generació del vector pBS DOR 3'KO-tk es va fer clonant l'insert 3'HR alliberat del vector pGEM-T 3'HR amb Xho I i BamH I al vector pBS 3'KO-tk obert per les mateixes dianes de restricció (Figura 34).

e) Generació del vector pBS DOR KO South.

El pas final en el procés d'obtenció del vector va ser la clonació del conjunt format pel braç d'homologia 5' i el casset neo en el vector pBS DOR 3'KO-tk. Per tal de dur a terme aquesta clonació es va digerir el vector pBS DOR 5'KO-neo amb Not I i Xho I, i l'insert alliberat (aprox. 5.1 kb) es va lligar al vector pBS DOR 3'KO-tk obert per les mateixes dianes de restricció (Figura 35).

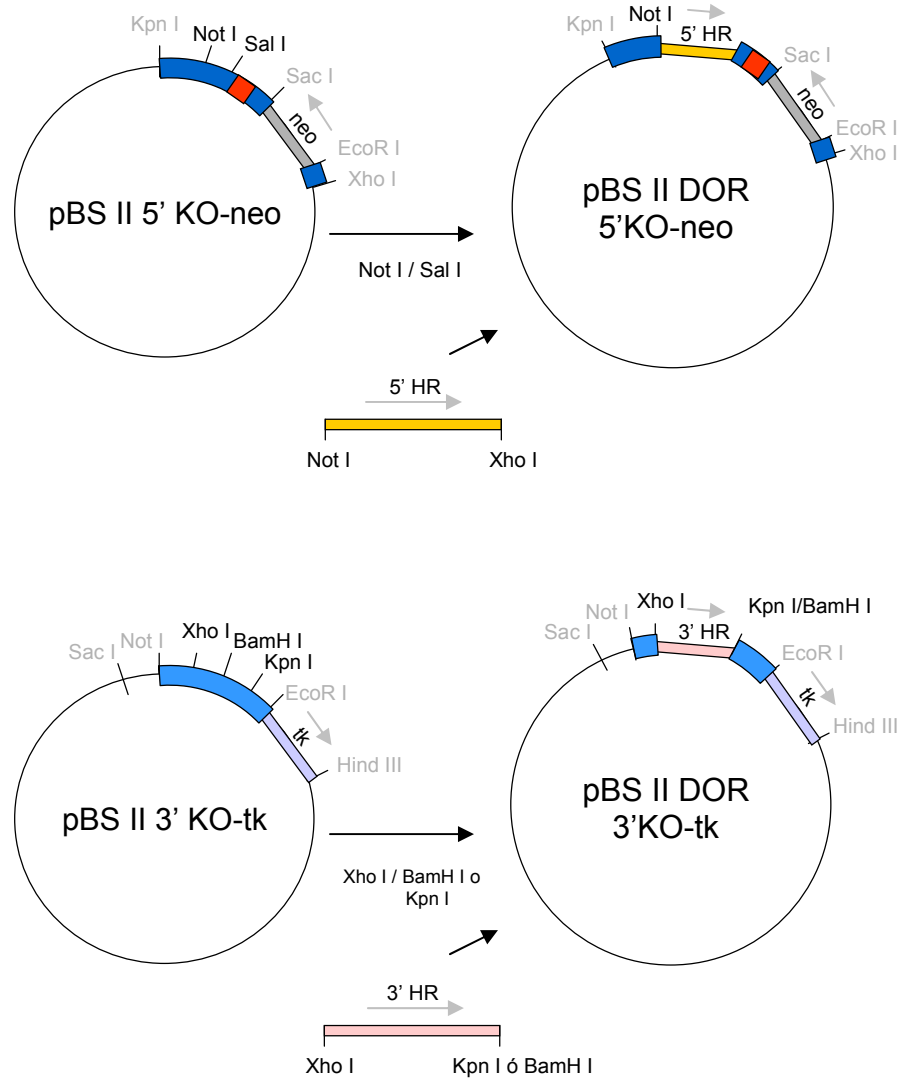


Figura 34. Esquema de les preparacions dels vectors pBS II DOR 5'KO-neo i pBS II DOR 3'KO-tk.

IV.1.2. Procediment per a l'obtenció del vector pBS DOR KO PCR

a) Amplificació de les regions d'homologia i clonació en vectors pGEM-T.

La modificació de l'extensió de les regions d'homologia va obligar a amplificar una nova regió 3' d'homologia amb una longitud inferior i a amplificar una extensió de la regió 5' d'homologia. Com a motlle per a l'amplificació novament es va utilitzar DNA procedent de ratolins SvJ/129. Per a l'amplificació de l'extensió de la regió 5' es van usar els primers 5'HR ext_f(Sal) i 5'HR ext_r, i es va amplificar amb TaqExpand HF en presència de un 6.6% de DMSO, en les següents condicions:

3'	96°C	x35
30"	96°C	
30"	60°C	
5'	68°C	

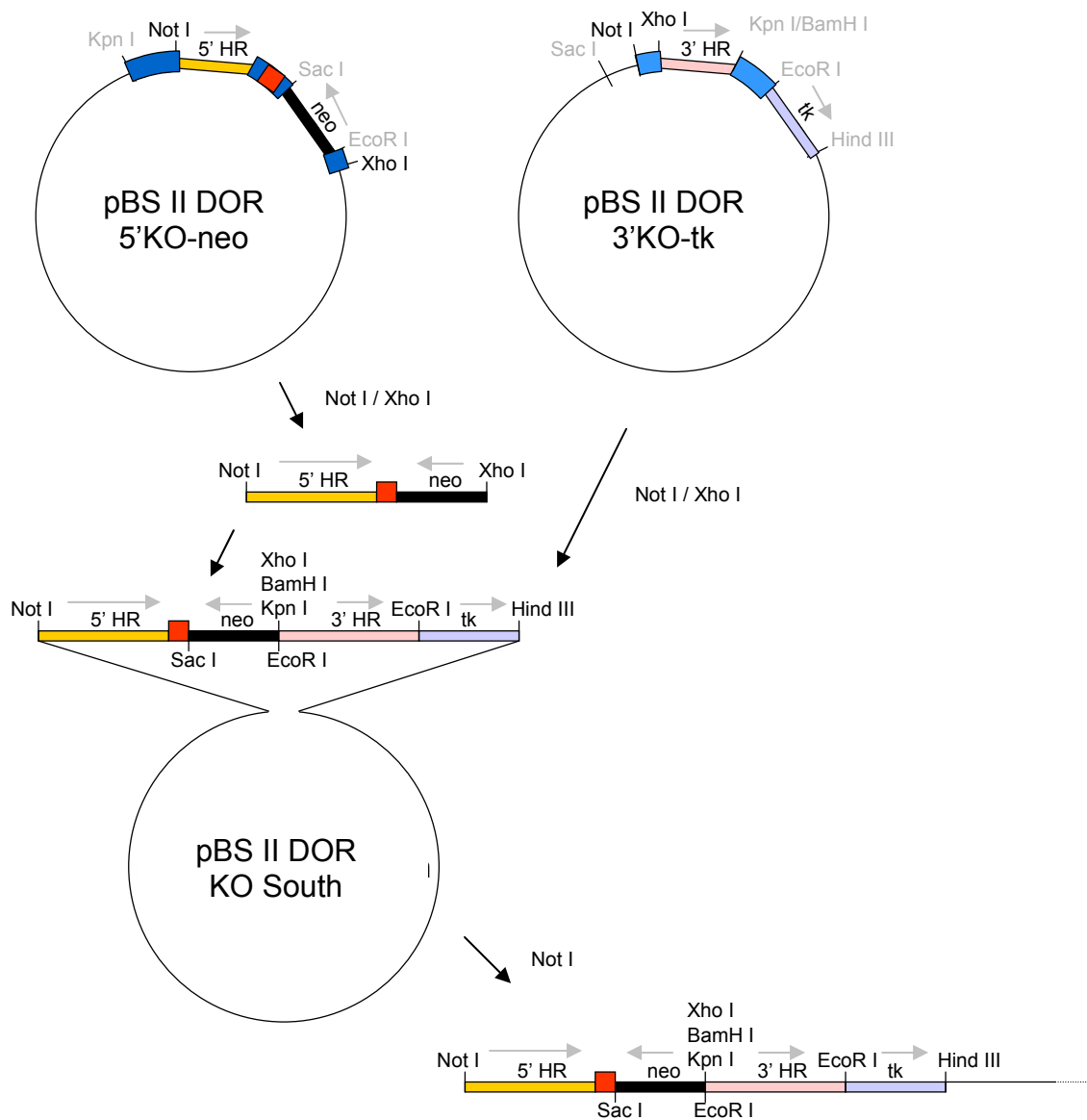


Figura 35. Esquema de la preparació del vector pBS II DOR KO South. El vector es linealitza amb Not I.

Per a l'amplificació de la regió 3' es van usar els primers 3'HR (Xho I)_f i 3'HR (BamH I)_r2 que donen lloc a un producte de 1.7 kb, amb TaqExpand HF i afegint un 6.6% de DMSO. L'amplificació es va fer en les següents condicions:

3'	96°C	x35
30"	96°C	
30"	58°C	
5'	68°C	

Els productes amplificats van ser carregats en gels d'agarosa per a la seva comprovació i posterior purificació. Un cop finalitzada la seva obtenció es van lligar en un vector p-GEM-T (pGEM-T 5'HRExt i pGEM-T 3'HR2).

b) Generació del vector pBS DOR 3'KO2-tk.

Per a la generació del vector del vector pBS DOR 3'KO2-tk es va clonar l'insert 3'HR2 alliberat del vector pGEM-T 3'HR2 amb Xho I i BamH I al vector pBS 3'KO-tk obert per les mateixes dianes de restricció (Figura 36 a).

c) Generació del vector pBS DOR 5'KOpre2-neo.

La generació del vector pBS DOR 5'KOpre2-neo es va fer clonant el fragment de 1.8 kb obtingut al digerir el producte de PCR 5'HR Ext_f(Sal)/r amb Not I i EcoR V en el vector pBS DOR 5'KO-neo obert amb les mateixes dianes (i que provoca l'alliberament d'un insert d'aproximadament el mateix pes) (Figura 36 b).

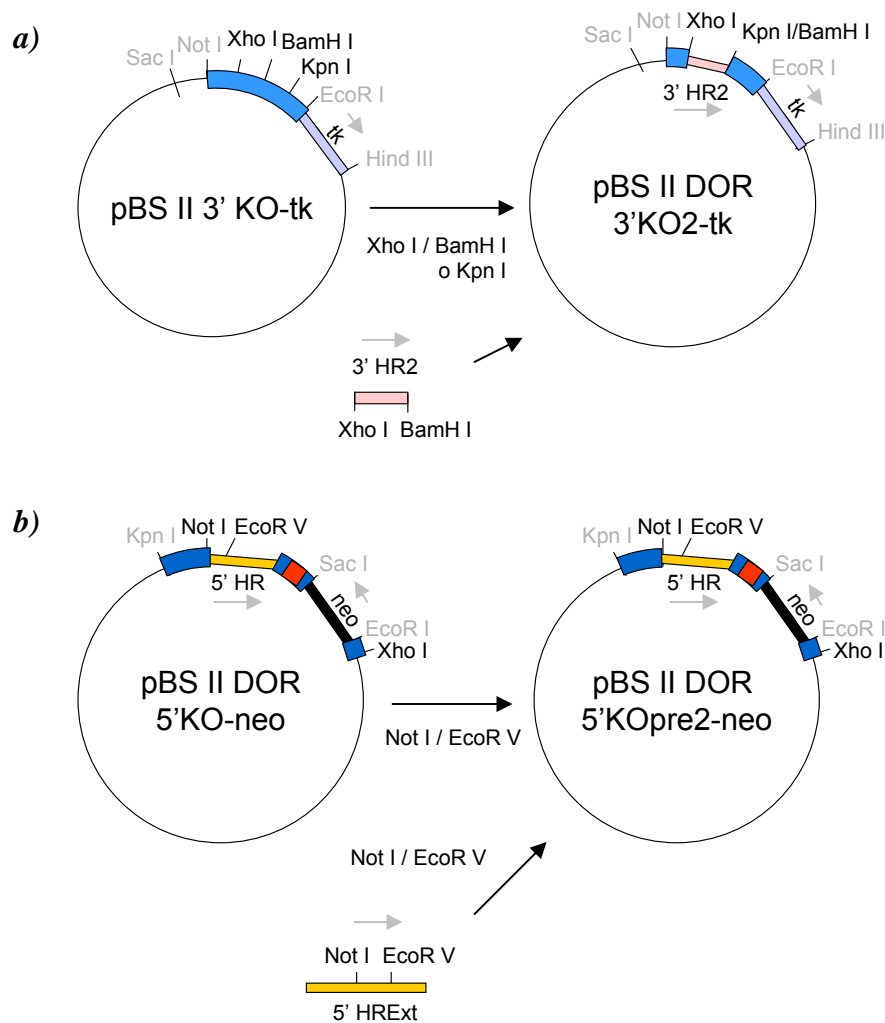


Figura 36. Esquema de l'obtenció dels vectors pBS II DOR 3'KO2-tk (a) i pBS II DOR 5'KOpre2-neo (b).

d) Generació del vector pBS preDOR KO PCR.

A continuació es van digerir els vectors pBS DOR 5'KOpre2-neo i pBS DOR 3'KO2-tk amb Not I i Xho I. Això provoca l'alliberament dels cassets insertats en el pBS DOR 5'KOpre2-neo en un únic insert (aprox. 5.1 kb) i l'obertura del pBS DOR 3'KO2-tk.

L'insert alliberat en el primer vector es clona en el segon (idem que per el vector pBS DOR KO South - Figura 35).

e) Generació del vector pBS DOR KO PCR.

Finalment es va digerir el vector pGEM-T 5'HR Ext amb Not I i Pvu I i s'allibera un insert de 2.7 kb (Not I - Not I) que conté l'extensió del braç 5' d'homologia. Aquest es va clonar al vector pBS preDOR KO PCR previament obert per Not I. Es va comprovar l'orientació de l'insert i es van escollir aquells clons amb la orientació correcte (Figura 37).

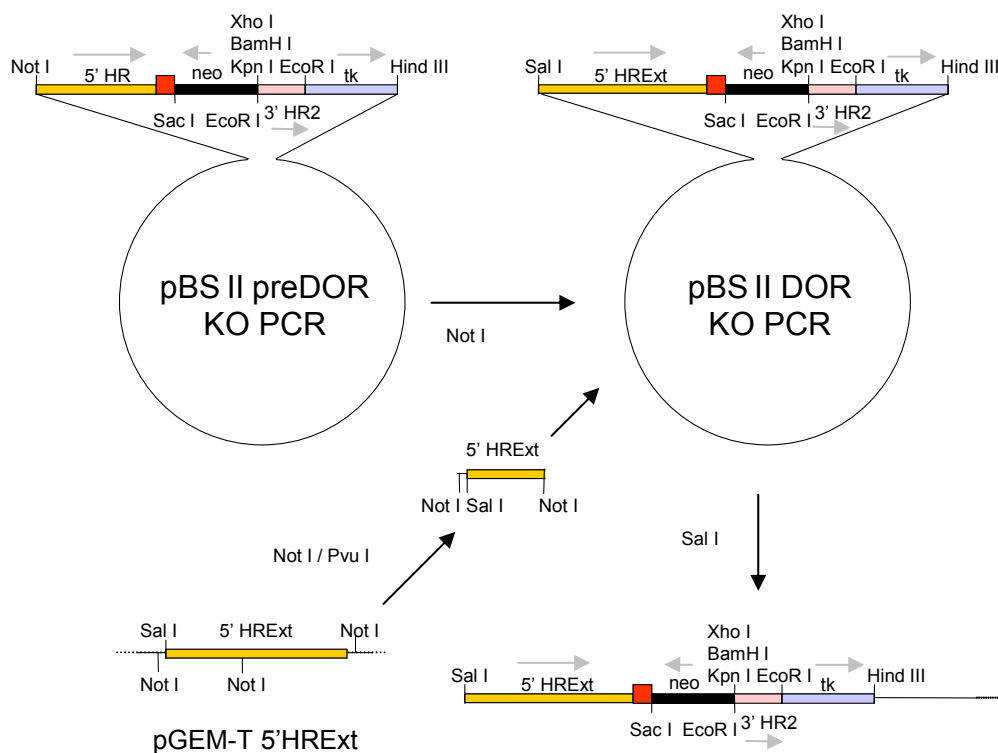


Figura 37. Esquema de l'obtenció del vector pBS II DOR KO PCR. Es mostra la linearització del vector amb Sal I.

IV.1.3. Comprovacions per seqüenciació del vector generat

La comprovació per seqüenciació del vector de reemplaçament es va fer amb els següents oligonucleòtids:

M13 reverse	GGAAACAGCTATGACCATG
M13-20 universal	GTAAAACGACGGCCAGT
LM5_Ext	CCCGCCGCGCTCCATCTGTAAGTCC
South_f	GACTCTGATCCCCCTGCCTCTACCTT
neo_r	AGGAATCGGGTGGGCTAAG

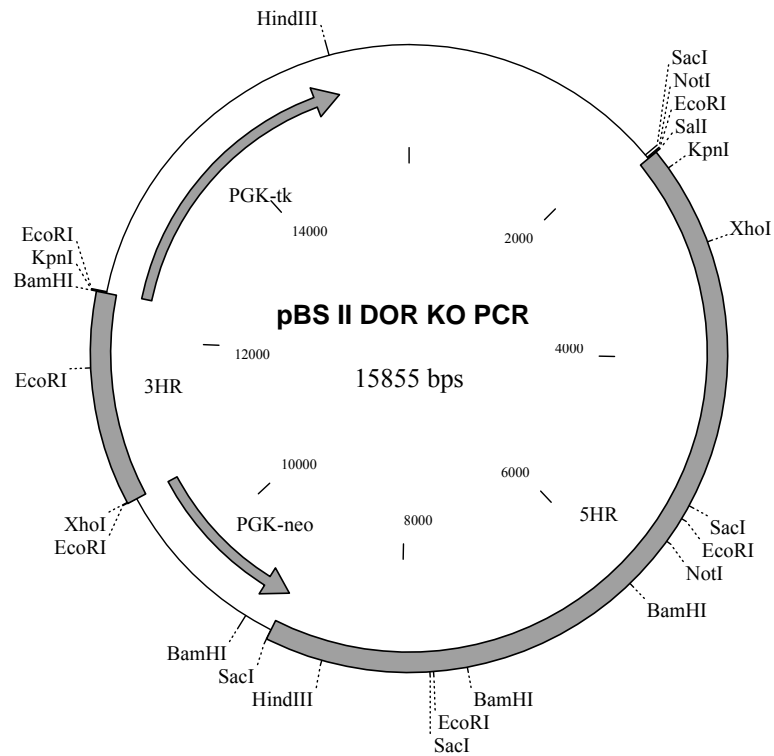


Figura 38. Mapa del vector de reemplaçament del gen DOR pBS DOR KO PCR. Es mostren les regions d'homologia amb el gen DOR: 5'HR i 3'HR, així com els cassets de resistència a G418 (PGK-neo), i de sensibilitat a ganciclovir (PGK-tk).

IV.1.4. Cribratge per PCR dels recombinants homòlegs

Oligonucleòtids:

KO-Screen_f GTTGGCGCTACCGGTGGATGTGG
 KO-Screen_r GCCAAATGCCCTATCAAGCTTCCTACAG

L'amplificació es fa amb TaqExpand HF amb els primers KO-Screen_f i KO_Screen_r, que donen lloc en els recombinants positius a un producte d'aproximadament 1.9 kb. El primer dels encebadors hibrida en el casset de neomicina del vector de reemplaçament i el segon d'ells en el gen DOR, en la regió flanquejant de la regió 3' d'homologia.

Condicions de l'amplificació:

3'	96°C	x35
30"	96°C	
45"	64°C	
2'	72°C	

En la Figura 49 es mostren els resultats d'amplificar DNA genòmic de SvJ/129 amb els encebadors dissenyats per al cribratge de recombinants homòlegs. En el carril indicat com a 'WT' es va amplificar usant únicament DNA genòmic com a motlle. En el carril

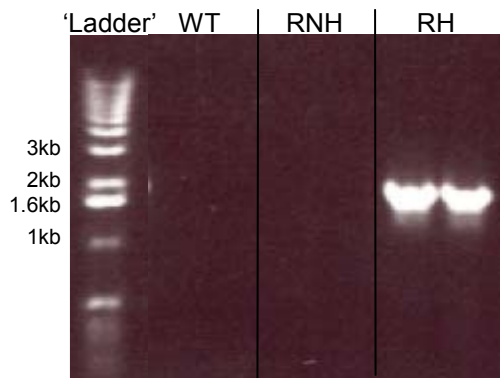


Figura 39. Imatge d'un gel d'agarosa en el que s'han carregat els productes de PCR en amplificacions amb DNA de *SvJ/129* salvatge (WT); amb DNA de *SvJ/129* amb DNA del plasmidi pBS DOR KO PCR (RNH); i amb DNA de *SvJ129* amb DNA del plasmidi pBS DOR KO South (RH).

marcat com a 'RNH' es va amplificar a partir de DNA genòmic mesclat amb la quantitat de vector pBS DOR KO PCR equivalent al número de còpies del gen DOR en 25 ng de DNA genòmic. D'aquesta manera s'emulava un escenari de recombinació no homòloga en una regió del genoma diferent al gen DOR. Per últim, en el càrril marcat amb 'RH' es va amplificar a partir de DNA genòmic mesclat amb la quantitat de vector pBS DOR KO South equivalent al número de còpies del gen DOR en 25 ng de DNA genòmic. D'aquesta manera s'emulava un escenari de recombinació homòloga en el gen DOR.

IV.2. Generació de vectors

lentivirals 1: Obtenció dels plasmidis

Els vectors lentivirals permeten introduir de manera eficient, integrar, i expressar de forma estable transgens en cèl·lules quiescents o proliferants, tant in vitro com en nombrosos òrgans in vivo. Les aplicacions dels vectors lentivirals van des de la recerca bàsica al futur tractament genètic d'algunes malalties humanes.

Les partícules lentivirals es generen per coexpressió dels elements d'empaquetament del virió i del genoma víric recombinant en cèl·lules hoste que actuen com a productores (generalment en 293 i 293T). En el cas de vectors basats en el HIV-1 els components centrals i enzimàtics del virió (elements d'empaquetament) provenen del HIV-1, mentre que l'envolta deriva d'un virus heteròleg, sovint del virus de l'estomatitis vesicular (VSV), per la seva elevada estabilitat i ampli tropisme de la seva proteïna G.

Existeixen tres generacions d'elements d'empaquetament derivats del HIV-1 per a la producció de vectors lentivirals en els que s'han fet successives delecions dels gens del HIV-1 per tal d'eliminar-li la capacitat de replicació. En aquesta tesi s'han usat els de 2a. generació (el més usat), en els que s'ha deleccionat els gens de l'envolta i tots els gens auxiliars del HIV-1 (vpr, vif, vpu i nef).

El genoma víric recombinant és l'únic material genètic que es transfereix a les cèl·lules diana. Aquest usualment conté el cassat amb el transgen flanquejat pel elements que actuen en cis necessaris per a l'encapsidació, per a la transcripció reversa i per a la integració. A més els vectors estàndard contenen l'element regulador post-transcripcional del *woodchuck hepatitis virus* (WPRE) insertat per incrementar l'expressió del transgen, així com el central polypurine tract (cPPT), un element que actua en cis que millora l'eficiència de transferència del transgen en moltes dianes.

Tots els vectors utilitzats han estat facilitats pel laboratori del Dr. Didier Trono (Universitat de Genève; www.tronolab.com).

En el punt VII.6. Generació de vectors lentivirals 2: Obtenció de les partícules virals (pàgina 147) es descriu el protocol d'obtenció de les partícules lentivirals.

IV.2.1. pLVTHM siRNA

El vehicle d'entrada dels siRNAs que es va escollir en aquesta tesi és el sistema lentiviral. Amb aquesta finalitat es va utilitzar el vector pLVTHM. Breument, aquest vector conté a més dels elements ja descrits un promotor H1 que permet l'expressió del siRNA. A més, l'expressió de GFP dirigida per el promotor del factor d'elongació 1 alfa, d'elevada activitat en nombrosos tipus cel·lulars, permet valorar l'eficiència de la infecció, així com separar per *sorting* les cèl·lules que han estat infectades de les que no ho han estat.

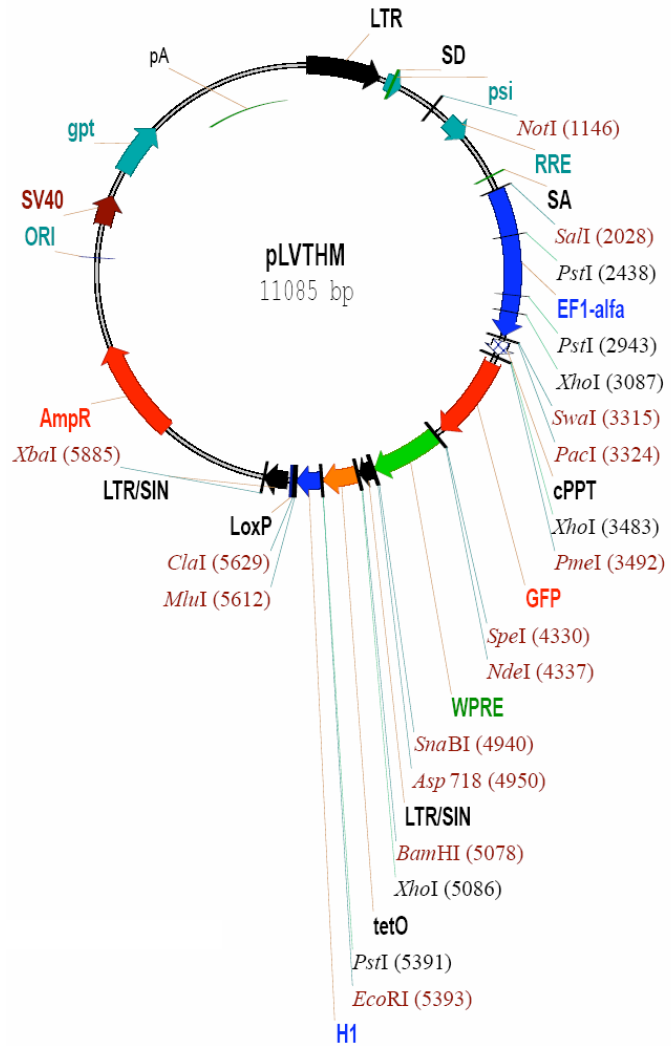


Figura 40. Mapa de restricció del vector pLVTHM. Es mostren els principals elements del vector (descriu en el text). Obtingut de www.tronolab.com

Plasmidis:

pLVTHM (Figura 50)

Oligonucleòtids:

5478_up	CGCGTCCCCCAGCTCTACTAAAGATATATTCAAGAGATATATCTTTA GTAGAGCTGTTTTTGGAAAT
5478_down	CGATTTCCAAAAACAGCTCTACTAAAGATATATCTCTTGAATATATC TTTAGTAGAGCTGGGGGA
1733_up	CGCGTCCCCGCACAGAACCCTTCAGAAATTTCAAGAGAATTTCTGAAG GTTCTGTGCTTTTTTGGAAAT
1733_down	CGATTTCCAAAAAGCACAGAACCCTTCAGAAATTTCTCTTGAATTTCT GAAGTTCTGTGCGGGGA

```
1_up      CGCGTCCCCCATACAAACCTTTCCTCAAATTCAAGAGATTTGAGGAAA
          GTTTGTATGTTTTTTGGAAAT
1_down    CGATTTCCAAAAACATACAAACCTTTCCTCAAATCTCTTGAATTTGAG
          GAAAGTTTGTATGGGGGA
4_up      CGCGTCCCCACACATACCTCAGAACATATTCAAGAGATATGTTCTGA
          GGTATGTGTTTTTTGGAAAT
4_down    CGATTTCCAAAAACACATACCTCAGAACATATCTCTTGAATATGTT
          CTGAGGTATGTGTGGGGA
```

Material, solucions i reactius:

T4 DNA lligassa

Enzims de restricció: Mlu I, Cla I

Procediment:

a) Disseny dels siRNAs.

El primer pas va ser el disseny dels siRNAs tal com s'ha descrit anteriorment (veure II.4). Així s'obté una seqüència de 19 nucleòtids. Com que el que es vol obtenir és un dúplex de DNA que es pugui clonar en el vector pLVTHM per les dianes Mlu I i Cla I, a aquesta seqüència se li afegeixen els nucleòtids necessaris per a la clonació i nucleòtids que permeten la formació d'un loop i una senyal de STOP per a la RNA polimerasa III.

```
Up   5' -CGCGT|CCCC|NNNN...NNNN|TTCAAGAGA|NNNN...NNNN|TTTTT|GGAA|AT-3'
Down 3' -A|GGGG|NNNN...NNNN|AAGTTCTCT|NNNN...NNNN|AAAAA|CCTT|TAGC-5'
      Mlu I      sense siRNA      loop      as siRNA      STOP      Cla I
```

b) Els oligonucleòtids dissenyats van ser demanats a una casa comercial, i un cop obtinguts es van hibridar els complementaris corresponents a cadascun dels siRNAs (1, 4, 1733 i 5478). La hibridació es va fer preparant una solució 10 μ M de la mescla dels dos oligonucleòtids que es va escalfar en un bany d'aigua bullint i es va deixar refredar lentament en aquest mateix bany.

c) El dúplex obtingut va ser clonat directament en el vector pLVTHM digerit amb els enzims Mlu I i Cla I.

V. TÈCNiques GENERALS D'AMPLIFICACIÓ I DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

A l'igual que amb les tècniques d'obtenció i manipulació d'àcids nucleics, les tècniques d'amplificació i detecció d'àcids nucleics que s'han utilitzat també són d'ús més o menys habitual en els laboratoris de Biologia Molecular i es poden trobar detallades en manuals de protocols (els citats anteriorment en el cas d'aquesta tesi) o integrades en equips comercials.

V.1. Amplificació de DNA per PCR

Una de les tècniques més utilitzades en un laboratori de biologia molecular és l'amplificació específica de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (*Polimerase chain reaction*- PCR). En aquesta reacció s'utilitzen DNA polimerases aïllades de procarïotes que catalitzen la síntesis de DNA a partir d'un motlle, encebadors, desoxinucleòtids i magnesi, entre d'altres.

Per tal d'aconseguir una amplificació eficient cal tenir en compte diferents factors crítics com la DNA polimerasa utilitzada, la concentració d'ió magnesi, etc. Es pot trobar una explicació detallada d'aquests factors en diversos manuals de laboratori, protocols d'equips comercials, etc. Un manual que resulta força útil és el '*PCR Applications Manual*' de la casa comercial 'Roche' (Steffen <Editor>, 1999), que es pot demanar gratuïtament o consultar a través d'internet.

A continuació és detalla el procediment estàndard que s'ha seguit en aquesta tesi per tal de posar a punt les diferents PCRs.

V.1.1. Disseny d'encebadors

Per tal de tenir un resultat satisfactori a l'amplificar un determinat DNA per PCR resulta extremadament important fer un bon disseny d'encebadors, si bé és cert que la gran quantitat de factors que determinen l'èxit del procés fan impossible garantir l'amplificació del producte desitjat amb uns determinats encebadors. En tot cas hi ha una sèrie de factors importants a l'hora de seleccionar els encebadors que permeten incrementar notablement la probabilitat d'èxit. En general es recomana que compleixin el següent:

- Longitud entre 18 i 30 nucleòtids.
- Sense estructures secundàries internes (hairpins).
- Contingut de G/C entre un 40 i un 60%.
- Que no formin dimers amb si mateix o amb l'encebador de la cadena complementaria.
- Temperatura de melting que permeti la hibridació entre 55 i 65°C.
- Que no continguin repeticions de nucleòtids.

A més es consideren altres factors com la facilitat de deshibridació de l'extrem 3', especificitat d'unió, etc. La major part d'aquests paràmetres es tenen en compte en els

programes de disseny d'encebadors, de manera que el més aconsellable és fer el disseny amb aquests programes. En aquesta tesi s'ha utilitzat el programa PrimerSelect del paquet de programes 'Lasergene' (veure II.3).

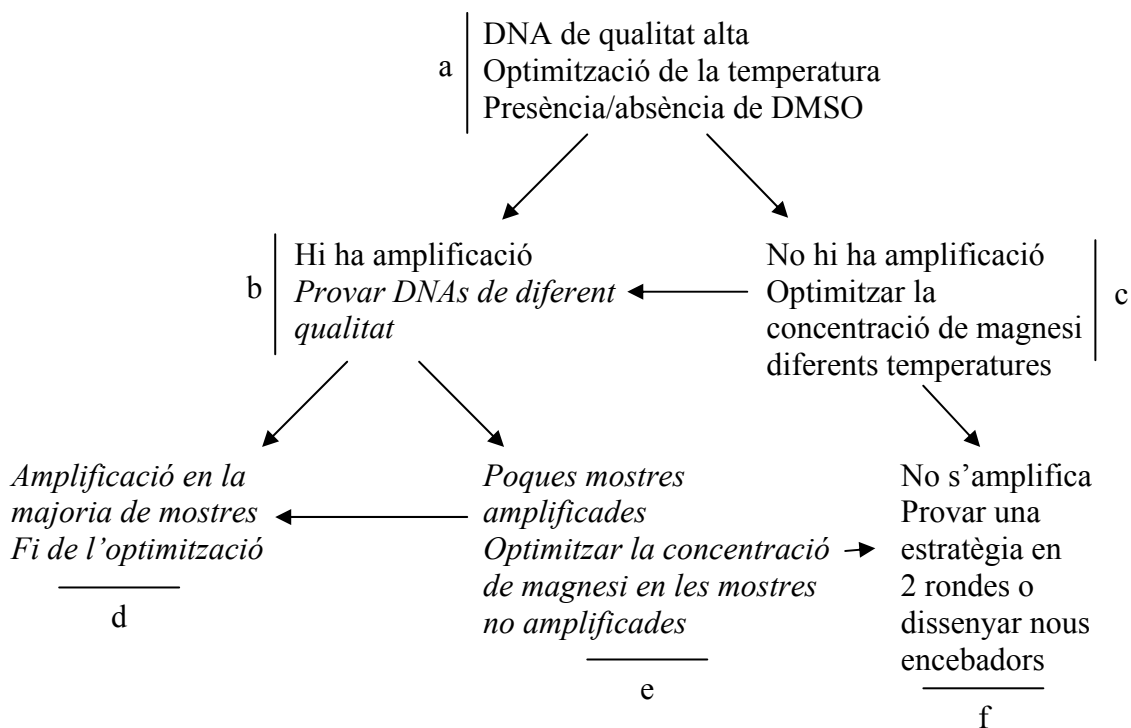
Un cop dissenyats els encebadors se n'ha comprovat l'especificitat mitjançant el blast. Com que la majoria de vegades es troben seqüències homòlogues en altres regions del genoma, s'escullen aquells parells d'encebadors que s'uneixen menys vegades; aquells en que l'encebador superior i l'inferior no s'uneixen en la mateixa regió, i que per tant no poden donar amplificació d'un producte inespecífic; o aquells en que no hi ha homologia en la regió 3' de l'encebador (a partir de la qual s'elonga el DNA).

V.1.2. Selecció de la DNA polimerasa

Existeixen diferents polimerases amb propietats particulars. L'elecció de la polimerasa s'ha fet bàsicament tenint en compte l'aplicació del producte de PCR. Així doncs per a la genotipació s'ha utilitzat Taq polimerasa (Biotools), pel seu baix cost, facilitat d'ús i elevat rendiment, i per a la clonació de fragments de DNA en vectors d'expressió la Pfu polimerasa, que tot i que té un cost més elevat que la Taq polimerasa, té activitat 3'-5' exonucleasa que proporciona una major fidelitat en la copia del DNA o la TaqExpand HF (Roche).

V.1.3. Optimització de les condicions de la reacció

Un bon disseny d'encebadors no és garantia suficient per a obtenir un producte amplificat. És per això que cal trobar les condicions més apropiades per a cada PCR. Per tal d'obtenir-les en el menor temps possible, el procediment que s'ha seguit en aquesta tesi és el que es detalla a continuació:



1- Es proven diferents temperatures d'anellament dels encebadors, usualment 4 o 5 temperatures amb increments de 2°C i usant com a temperatura central la d'anellament dels encebadors calculada pel programa de disseny d'encebadors ($T_a - 4^\circ\text{C}$, $T_a - 2^\circ\text{C}$, T_a , $T_a + 2^\circ\text{C}$, $T_a + 4^\circ\text{C}$).

Com a motlle s'utilitza un DNA de qualitat alta (a en la figura). Per a cada temperatura es proven tres condicions diferents: la primera sense additiu; la segona amb un 3.3% de dimetilsulfòxid (DMSO); i la tercera amb un 6.6% de DMSO. L'efecte del DMSO és diferent en cada PCR: En algunes PCRs perjudica l'amplificació del producte, mentre que en d'altres resulta imprescindible per a obtenir un producte amplificat, o bé per a disminuir l'amplificació de productes inespecífics.

2- Si l'amplificació és satisfactòria s'escull la condició òptima, procurant que aquesta no sigui extrema. Per exemple, si s'observa una bona amplificació a tres temperatures diferents s'escull la intermitja, per evitar que petites oscil·lacions de les condicions es tradueixin en un sortida de les condicions òptimes. Si el resultat és negatiu s'optimitza la concentració de magnesi a diferents temperatures i en aquella que dona un millor resultat es prova l'efecte del DMSO (c en la figura).

En el cas de les genotipacions, en què es treballa amb gran varietat de mostres de diferent qualitat, si el resultat és positiu es torna a fer amplificació amb diferents mostres de DNA en les condicions òptimes (b en la figura).

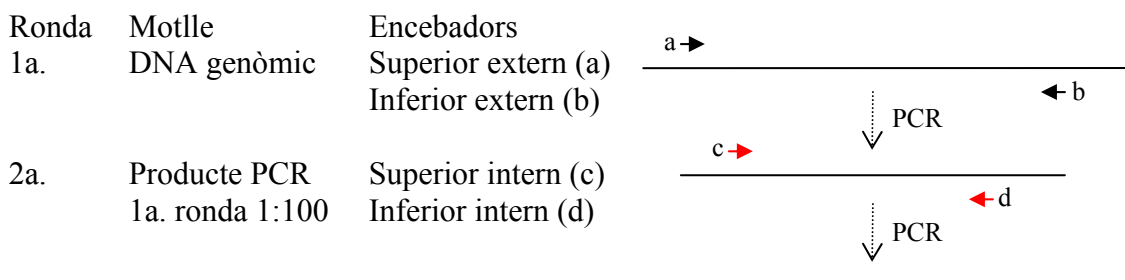
3- Si l'anterior amplificació és bona en la majoria de les mostres es dona per finalitzada l'optimització (d en la figura). En cas negatiu (e en la figura) s'optimitza la concentració de magnesi de la reacció (en el cas que no s'hagi fet anteriorment).

4- Si cap de les optimitzacions anteriors dona un resultat positiu es pot provar de fer una estratègia en dues rondes d'amplificació (f en la figura), o bé dissenyar encebadors nous.

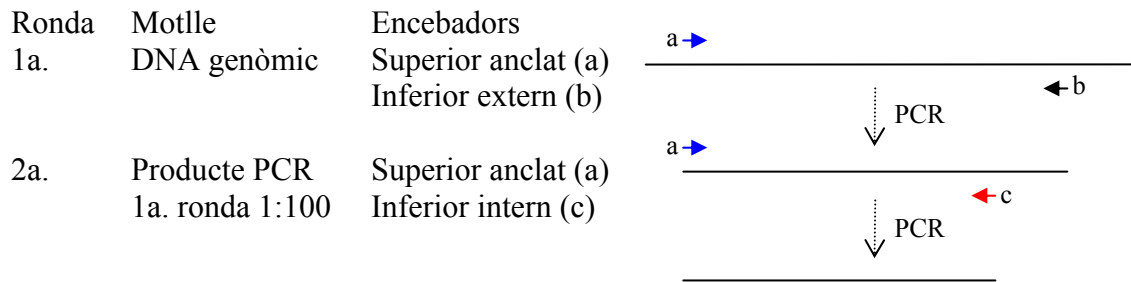
V.1.4. Estratègies en dues rondes

Les estratègies en dues rondes consisteixen bàsicament en combinar dues rondes d'amplificació de la regió d'interès. En la primera ronda s'amplifica un producte que inclou la seqüència que s'amplificarà en la segona ronda i que s'utilitzarà com a motlle de la 2a. ronda. Es pot procedir fent 'Nested-PCR' o 'Anchored-PCR'.

Nested PCR



Anchored PCR



En la primera s’usen quatre encebadors. Dos dels encebadors (encebadors externs) amplifiquen un producte que inclou el lloc d’anellament dels altres dos encebadors (encebadors interns). Primer es fa l’amplificació amb els encebadors externs i seguidament el producte diluït d’aquesta amplificació s’utilitza com a motlle per a l’amplificació amb els encebadors interns. En la segona estratègia s’usen tres encebadors. Com el seu nom indica un dels encebadors actua d’anclatge: en la primera ronda l’encebador d’anclatge es combina amb un encebador extern i en la segona ronda amb un d’intern mantenint-se el punt d’anclatge.

Per tal de posar a punt una estratègia en dues rondes s’optimitzen per separat les dues rondes. Si el resultat és positiu per a les dues s’escullen les condicions òptimes de cada PCR. En el cas que el resultat d’alguna sigui subòptim s’escull la millor condició o una condició poc astringent i es prova l’estratègia en dues rondes directament.

V.1.5. Paràmetres que afecten les condicions de la PCR

A més dels paràmetres crítics que resulten obvis, com la concentració de magnesi, la temperatura d’anellament, la presència/absència d’additius, la DNA polimerasa utilitzada, etc. existeixen altres paràmetres que també afecten el rendiment d’una PCR. Alguns d’aquests no sempre resulten obvis, però poden tenir un efecte superior a molts dels paràmetres abans mencionats. D’entre aquests destaquem:

- La mostra de DNA.

Sovint s’observen diferències en les condicions òptimes de la PCR depenent de la mostra amb que s’avaluïn. No només la qualitat del DNA resulta important, ja que també s’observen diferències notables depenent del grup de mostres que s’hagi tractat d’amplificar, tot i ser de qualitat alta. Així en algunes mostres utilitzades en les genotipacions d’aquesta tesi s’han hagut d’utilitzar encebadors alternatius perquè els que funcionaven per a les mostres ja amplificades no donaven un bon resultat, o bé s’ha hagut de modificar la temperatura d’hibridació, o bé afegir additius. Una possible explicació a aquest fenomen es pot trobar en el fet que s’han utilitzat diferents procediments d’extracció per a obtenir el DNA segons la procedència de les mostres. La presència d’alguns contaminants, encara que sigui en concentracions traça, es pot traduir en una lleugera modificació de les condicions de la PCR si aquests actuen com a inhibidors o potenciadors de l’amplificació, o bé si modifiquen la composició d’ions de la reacció (p.e. segrestant-los), etc.

- El termociclador.

Tot i que no tan obvi com l'anterior, s'ha observat que també el termociclador és important a l'hora de fixar les condicions òptimes per a la PCR. Un cop optimitzades les condicions d'amplificació en un determinat termociclador es poden observar canvis en el rendiment quan es proven les mateixes condicions d'amplificació en un altre instrument. L'explicació a aquest fenomen es pot trobar en les diferents velocitats d'escalfament/refredament del bloc tèrmic (*ramping*), especialment notables quan s'utilitzen termocicladors amb una antiguitat molt diferent. Així per exemple en aquesta tesi s'han usat tres models diferents de termociclador i efectivament s'han observat diferències notables de rendiment a l'usar un o altre, sent necessari modificar lleugerament les condicions segons el termociclador emprat.

V.2. LM-PCR: '*Ligation Mediated-PCR*'

Aquesta aplicació concreta de la PCR permet l'amplificació específica de regions de DNA genòmic, plasmidis o cDNA, quan únicament es coneix la seqüència d'un extrem de la regió d'interès. Breument la tècnica consisteix en digerir el DNA amb l'enzim apropiat; lligar el producte de la digestió a un casset amb la diana de l'enzim que s'ha usat; fer PCR amb un encebador específic del casset i un d'específic per a la regió coneguda; i fer una segona ronda d'amplificació (nested-PCR) usant encebadors interns tant per al casset com per a la regió coneguda.

En concret en aquesta tesi s'ha seguit el següent procediment:

Material, solucions i reactius:

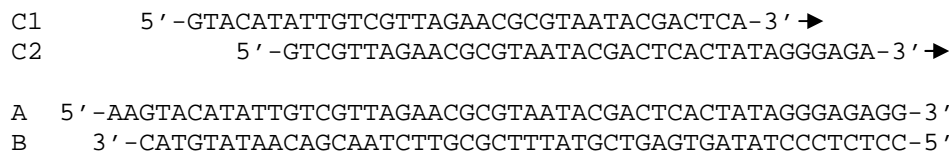
TaqExpand HF (Roche)
Lligassa NEB
Solució de clorur d'hexamina cobalt 10mM
Reactius per a la precipitació de DNA
Equip de purificació de DNA en gel d'agarosa
Equip 'pGEM-T Easy'
Encebador específic intern
Encebador específic extern
Casset A·B
Encebador C1
Encebador C2

Seqüències del casset i els encebadors C1 i C2:

A: AAGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGG
B: CCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGTTCTAACGACAATATGTAC
C1: GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA
C2: GTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA

A i B són els oligonucleòtids sintètics que un cop anellat formen el casset que s'ha utilitzat. El resultat és un casset amb un extrem rom i un extrem amb dues As 5'

protuberants. C1 i C2 són els encebadors específics del casset, sent C1 el de 1a. ronda i C2 el de 2a:



Procediment:

1- Digestió del DNA amb enzims de restricció que donen lloc a extrems roms. De forma estàndard s'han digerit 3 µg de DNA amb 15 U d'enzim durant 16 hores (*overnight*).

2- Precipitació del DNA amb etanol/acetat sòdic (procediment estàndard).

3- Resuspensió del DNA amb 10 µl de mescla de lligació:

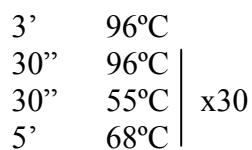
- 1µl de buffer de lligació 10X
- 1µl de lligassa (NEB)
- 1µl de casset A·B hibridat 100µM (100 pmol)
- 1µl de clorur d'hexamina cobalt 10mM
- 6µl d'aigua

4- Lligació *overnight* a 16°C.

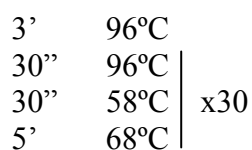
5- Precipitació del DNA amb etanol/acetat sòdic.

6- Resuspensió en 5µl d'aigua.

7- 1a. ronda d'amplificació amb TaqExpand HF, amb l'encebador C1 i l'encebador específic extern, usant com a motlle 1µl del producte de la lligació resuspès. Condicions de la PCR:



8- 2a. ronda d'amplificació amb TaqExpand HF, amb l'encebador C2 i l'encebador específic intern, usant com a motlle 1µl del producte de la 1a. ronda dil·luint 1:100. Condicions de la PCR:



9- Carregar els productes de la PCR en un gel d'agarosa 1% i retallar les bandes amplificades.

10- Purificar el DNA del gel d'agarosa.

11- Clonar el producte purificat en un vector pGEM-T Easy.

V.3. Seqüenciació de DNA

Existeixen diferents sistemes comercials de seqüenciació basats en el mètode de Sanger. Els que s'han usat en aquesta tesi són els de 'Applied Biosystems', tant a nivell de reactius com d'instruments. Inicialment s'utilitzava l'equip 'dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit', però a mida que han anat apareixent reactius nous s'ha anat canviant a aquests. Les últimes seqüenciacions s'han fet amb el 'BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit' en un analitzador 'ABI3730'. En aquestes condicions es poden obtenir seqüències d'elevada qualitat de fins a 800 nucleòtids.

Procediment segons les instruccions del producte.

V.4. Selecció de polimorfismes per a la genotipació

Quan es cerquen polimorfismes que confereixin susceptibilitat a una determinada enfermetat obviament el primer pas és la selecció dels polimorfismes. Aquest és un pas crucial ja que determinarà en gran part el resultat de la genotipació. Es poden seguir diferents criteris per tal de fer aquesta selecció, des de criteris genètics a criteris pràctics. En el cas d'aquesta tesi s'han seguit els següents criteris:

1- Es seleccionen RFLPs (restriction fragment length polymorphism), SNPs analitzables amb un enzim de restricció, és a dir, SNPs en els que el polimorfisme suposa l'aparició/desaparició d'un lloc de tall d'un enzim de restricció. La raó per la que aquest va ser un dels criteris a seguir era la facilitat d'anàlisi d'aquest tipus de SNPs.

2- Es seleccionen polimorfismes amb una freqüència de l'al·lel menor superior al 5%. Ja que els polimorfismes que confereixen susceptibilitat acostumen a ser variants comunes, és a dir, amb variants amb freqüències elevades entre la població (McCarthy, 2002). A més a més, el treball amb polimorfismes amb freqüències tan baixes en l'al·lel menor requereix tamanyos mostrals més elevats per a poder detectar una associació.

3- Es treballa amb polimorfismes localitzats en zones d'alt interès funcionals, siguin o no RFLPs: Sempre que sigui possible es seleccionen polimorfismes localitzats en la pauta oberta de lectura (especialment si suposaven un canvi d'aminoàcid), en la regió promotora o en UTRs.

4- Es té en compte la facilitat de l'anàlisi: A poder ser es seleccionen polimorfismes analitzables fàcilment en un gel d'agarosa.

5- També es tenen en compte els costos. Es tracta de seleccionar SNPs analitzables amb els enzims més econòmics.

6- Es preferible treballar amb htSNPs: Els SNPs que es seleccionen són el màxim de representatius del conjunt de polimorfismes analitzats, ja que permeten definir la majoria dels haplotips detectats en la regió. Per tal de decidir quins són els htSNPs s'han seguit els criteris descrits a Johnson et al., 2001.

L'estratègia que es va seguir, i que integra els criteris anteriors és la següent:

- 1- Es cerquen polimorfismes en les bases de dades.
- 2- Es seleccionen aquells que són analitzables amb un enzim de restricció i tots aquells que localitzen en regions d'alt interès funcional.
- 3- Dels anteriors es seleccionen blocs de polimorfismes que poden ser amplificats alhora en un mateix producte de PCR.
- 4- Aquests s'analitzen per digestió o per seqüenciació segons el cas en un total de 30 individus. Es descarten aquells polimorfismes que resulten no ser polimòrfics (errors de seqüenciació, polimòrfic en altres poblacions...) o bé tenen una freqüència de l'al·lel menor inferior al 5%.
- 5- S'elaboren taules amb tots els genotips mostra a mostra, s'estimen els haplotips, i es seleccionen els htSNPs, tenint en compte si localitzen en zones d'alt interès funcional, la facilitat de genotipació, d'anàlisi i el cost de l'enzim. Aquests htSNPs són els que es genotipen.

V.5. Amplificació i detecció de DNA per PCR a temps real

Existeixen diferents mètodes per a la quantificació d'un determinat RNA missatger. El que s'ha emprat en aquesta tesi és el de la PCR a temps real. Breument consisteix en amplificar una seqüència específica del RNA que es vol valorar i fer un seguiment a temps real de l'amplificació. Això s'aconsegueix passant el RNA a DNA per retrotranscripció previ a la PCR, i durant aquesta, fent el seguiment de la reacció mesurant la fluorescència emesa, ja que en la mescla de reacció s'incorporen reactius que emeten fluorescència al unir-se específicament a la seqüència amplificada (sondes) o bé quan s'intercal·len en DNA doble cadena (*SYBR-Green*).

La quantificació pot ser absoluta o relativa. En la primera es determina el n° de còpies del RNA valorat, usant com a recta patró un DNA que conté el fragment de DNA amplificat a diferents concentracions. En la segona es determina l'expressió del RNA valorat en relació a un gen constitutiu l'expressió del qual no varia amb les condicions experimentals (es fa necessari consultar bibliografia existent).

En aquesta tesi les quantificacions que s'han fet són relatives, i s'han dut a terme utilitzant el sistema del '*SYBR-Green PCR Master Mix*' de 'Applied Biosystems', treballant en plaques de 96 pous i de 384 segons les necessitats, en un aparell '*ABI7700*' o '*ABI7900HT*' respectivament.

El procediment que s'ha seguit és bàsicament l'indicat pel fabricant del producte, tot i que convé remarcar certs aspectes d'aquest que són extremadament importants.

V.5.1. Criteris de disseny dels encebadors

La consecució d'una PCR a temps real mitjançant 'SYBR Green' requereix partir d'un bon disseny dels encebadors per els gens que es volen valorar. Amb aquest objectiu, es van seguir les recomenacions del fabricant dels equips i es van anar adaptant a l'experiència obtinguda amb els resultats. Així, en aquesta tesi, per al disseny dels encebadors s'ha utilitzat el programa 'PrimerSelect' del paquet 'DNASTAR'^{*}, seguint els següents criteris:

1- El producte amplificat ha de tenir una longitud entre 50 i 150 parells de base. Si bé aquesta es pot incrementar a 200 pb en el cas que s'incompleixin els altres criteris amb encebadors que donin un producte d'inferior longitud, o disminuir fins a la longitud que sigui possible sense que els encebadors de la cadena superior i inferior es solapin.

2- L'anellament dels encebadors amb el cDNA ha de ser el més proper possible a l'extrem 3' del cDNA, ja que si s'ha utilitzat oligodT, la reacció de retrotranscripció s'ha fet a partir de la cua poliA (a l'extrem 3'). Això és especialment important en transcrits llargs, ja que poden haver-hi alguns transcrits parcialment retrotranscrits als quals els manqui part de l'extrem 5'. Segons el transcrit que es vulgui valorar, també cal tenir en compte possibles formes de *splicing* del RNA.

3- La temperatura d'anellament dels encebadors es situarà al voltant de 60°C, que és a la temperatura a la qual la polimerasa de l'equip de 'SYBR Green' de 'Applied Biosystems' estén els encebadors. La raó d'aquesta elecció no és arbitrària: Suposa un estalvi de temps, al no haver-hi necessitat d'introduir un pas d'anellament, i el que és més important, permet analitzar més d'un transcrit per placa, ja que tots els encebadors han estat dissenyats per a anellar-se a la mateixa temperatura.

A efectes pràctics, això s'aconsegueix requerint-li al programa encebadors amb una temperatura de fusió situada entre els 54°C i els 58°C, que és la temperatura que s'ha comprovat que es correspon a un anellament de 60°C calculat amb el programa de disseny d'encebadors de 'Applied Biosystems'. Experimentalment s'ha demostrat que quasi en tots els casos aquest criteri permet una correcta amplificació amb una temperatura d'anellament a 60°C.

4- Donat que amb l'us de 'SYBR Green', el que es valora és DNA de doble cadena, resulta **importantíssim** evitar la formació de dímers o *hairpins* d'encebadors, ja que aquests, al formar una doble cadena, interfereixen en l'anàlisi. En el cas de tenir dímers, els resultats obtinguts no són vàlids, pel que és essencial evitar la formació d'aquests.

En el programa que s'ha utilitzat es pot veure un llistat dels dímers que es poden formar i el valor de ΔG de la reacció de formació d'aquests. El mateix es dona per als *hairpins*. Els encebadors que s'han seleccionat tenien una ΔG major de -3 kcal/mol (menor de 3 en valors absoluts), i en casos en que per qüestions de disseny no era possible complir aquest criteri s'ha relaxat permetent que el valor de ΔG fos superior a -3.5 kcal/mol.

^{*} Tot i que 'Applied Biosystems' disposava d'un programa que permetia el disseny d'encebadors, aquest tenia moltes mancances, pel que es va preferir utilitzar el programa 'PrimerSelect'.

5- Si és possible, s'intenta que les 5 bases de l'extrem 3' no tinguin més de 2 Cs o Gs.

6- Un altre criteri que s'utilitza en el disseny d'encebadors és situar els encebadors en exons diferents, separats per un o més introns, amb la finalitat d'evitar amplifcacions de DNA genòmic que pugui contaminar la preparació de RNA. En aquesta tesi **no** s'ha seguit aquest criteri per dues raons: Aquest criteri limita enormement les possibilitats en el disseny dels encebadors, el que es pot traduir en un dèficit de qualitat en els altres criteris, bastant més importants (per exemple en el d'evitar la formació de dímers), però a més, i encara més important, aquest criteri no sempre evita els problemes derivats de la presència de contaminació de DNA genòmic, ja que molts gens, i especialment els gens constitutius, tenen pseudogens processats, és a dir transcrits retrotranscrits i integrats al genoma. En el cas d'estar quantificant un transcrit en relació al transcrit d'un gen constitutiu que té pseudogens processats (la β actina en té més d'un) la presència de DNA invalidaria el resultat. Així doncs, es va considerar més pràctic evitar la contaminació de DNA de les preparacions de RNA (fent tractament amb dnases, si convenia), i valorar la presència de DNA, incloent controls negatius de retrotranscripció (es fa igual i en paral·lel a la RT-PCR, afegint RNA substrat i els tampons apropiats, però sense afegir l'enzim). Això permet que la preparació pugui ser utilitzada per a valorar qualsevol transcrit, independentment d'on es situin els encebadors, sense que el DNA suposi un problema.

7- Un cop dissenyats els encebadors es comprova l'especificitat dels mateixos per 'BLAST', seleccionant la base de dades corresponent als transcrits de l'especie per la que s'han dissenyat.

8- Per últim no s'han utilitzat directament encebadors que apareixen en articles o altres fonts. En alguns casos el disseny d'aquests deixava bastant que desitjar, pel que abans de treballar amb ells, es comprovava que seguissin tots els criteris anteriors.

V.5.2. Optimització de les condicions d'amplificació

Abans d'utilitzar els encebadors per a quantificar un transcrit, és necessari valorar-ne les concentracions òptimes i el rendiment de l'amplificació. Això s'aconsegueix provant d'amplificar 10 ng d'equivalents de RNA a diferents concentracions dels encebadors, per exemple: 900nM, 600nM, 300 nM i 150 nM. Es valora per PCR a temps real l'amplificació, i es selecciona la menor concentració amb la que s'obté la menor Ct. També es controla la inexistència de dímers mitjançant les corbes de fusió. Un cop determinada la concentració òptima, i si no s'observen dímers, es valora el rendiment de la PCR amb un banc de dil·lucions seriades: 10 ng eq, 5ng eq, 2.5 ng eq, 1.25 eq i 0.625 ng eq i es determina el pendent de la relació entre les Cts resultants i el logaritme de la concentració. Així, el rendiment en % de la PCR seria

$$\text{rendiment (\%)} = 100(10^{-1/m}-1)$$

on m és el valor de la pendent. Una pendent de -3.322 representa una amplifcació amb el màxim rendiment.

VI. TÈCNiques ESPECÍFIQUES D'AMPLIFICACIÓ I DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

VI.1. Seqüenciació del gen DOR en ratolí

Per tal de seqüenciar el gen DOR de ratolí es va seguir una estratègia de clonacions i subclonacions de diferents fragments del gen. Per tal d'amplificar aquests fragments es van utilitzar encebadors obtinguts de la seqüència de diverses ESTs i a més es va obtenir seqüència flanquejant mitjançant LM-PCR (Ligation mediated-PCR). L'objectiu era disposar de suficient informació de seqüència per a poder preparar un vector de reemplaçament del gen i així poder generar ratolins KO.

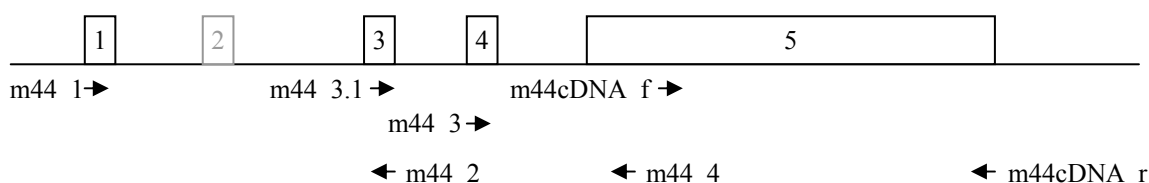
VI.1.1. Amplificació de regions del gen DOR

A partir de la seqüència disponible de DOR en ratolí (per ESTs o per amplificació amb encebadors específics de cDNA humà) es van amplificar 5 productes de PCR: m44_1/2; m44_3.1/4; m44_1/4; i m44cDNA_f/r.

Encebadors que es van utilitzar:

Nom	Seqüència	Exó on anella*
m44_1	CGGTATGCGGCTCCAGTTGTGA	1
m44_2	CAGGAGGCGCAGGGGTGTTGA	3
m44_3.1	CAACACCCCTGCGCCTCCTGAAGACTC	3
m44_3	GCTCTCCACCCGCGCCCTCCTTGATG	4
m44_4	GTTGAAGTGGCGCTGGCACGGCTGGTAA	5
m44cDNA_f	ACCCACTCTCCCATGYTTCTTTTATAGG	5
m44cDNA_r	GGTGGTTGTGTCCTTGAGTCTGTCG	5

Posicions aproximades d'hibridació* dels encebadors:



Condicions de l'amplificació:

Totes les PCRs es van fer utilitzant TaqExpand HF de 'Roche' en condicions estàndard d'amplificació i a les següents temperatures d'hibridació:

m44_1/2	56°C
m44_1/4	62°C

* en l'estructura equivalent del gen en humans

m44_3.1/4	62°C
m44_3/4	62°C
m44cDNA_f/r	60°C

Tots els productes d'amplificació van ser carregats en gels d'agarosa. La banda que contenia el producte es va retallar i se'n va extreure el DNA mitjançant l'equip 'QIAex' II de 'Qiagen'. Part del producte purificat es va clonar en un vector pGEM-T Easy (Promega) segons el procediment indicat en el producte.

Un cop obtinguts els vectors amb el producte clonat es va procedir a la seqüenciació dels extrems del producte amb els encebadors T7 i SP6, que anellen en el vector, per tal de confirmar l'especificitat de l'insert i començar a obtenir informació de seqüència. Paral·lelament es va fer un mapa de restricció dels clons amb diferents enzims. Un cop fet el mapa es van seleccionar diferents fragments que en conjunt continguessin tot el clon i es van clonar en el vector pGEM-4Z (Promega) directament (si el vector contenia diana per a l'enzim amb que s'havia tallat) o fent extrems roms al producte i lligant-lo al vector obert amb Hind II (rom). Els extrems del producte clonat es van seqüenciar amb els encebadors T7 i SP6. També es van seleccionar fragments que provocaven l'alliberament d'un fragment localitzat entre el lloc de clonació del vector i una diana interna del fragment. Aquests es van relligar i seqüenciar amb encebadors SP6 i T7.

Encebador T7:	GTAATACGACTCACTAT
Encebador SP6:	GATTTAGGTGACACTATAG

VI.1.2. LM-PCR del gen DOR

Per tal d'obtenir informació de seqüència de les regions flanquejants del gen DOR es va fer LM-PCR a partir de la regió promotora coneguda (uns 500 parells de bases) i a partir de l'exó 4 (l'equivalent a l'exó 5 humà, veure resultats).

Es va seguir el protocol descrit en anteriorment (V.2 LM-PCR: '*Ligation Mediated-PCR*', pàgina 125) amb els següents encebadors específics:

a) LM-PCR a partir de l'exó 4:

m44LM_Ext	GTGCAACAAGGACCCTACCAGAGC
m44LM_Int	GACAAACCACAGCCTGCTTCTAATACCTTC

b) LM-PCR a partir de l'exó 4 (seqüència resultant de la primera LM-PCR):

LM2_Int	AAGCATTGCGTGGGAGGAAGC
LM2_Ext	TCGATGATGGAGCAGCACAAG
LM2_Ext2	GGTATGCCAAGGCCCAAGAGC

Per a la segona LM-PCR es van fer en paral·lel dues primeres rondes alternatives (amb els encebadors ext i ext2).

VI.2. Genotipació de polimorfismes dels gens DOR i AIB3

VI.2.1. Encebadors i condicions de l'amplificació

Oligonucleòtids:

a) Cerca de htSNPs

Regió1_f	GTCACGGGCCTCATTGTTTGTA
Regió1_r	CACTTGCCTCTTCTTGAATCTTATGCT
Regió2_f	TGTTACCCTGCCAGAAATAGTGTGAA
Regió2_r	AGACCAGCAGAGGGCCATAGTTTG
Regió4_f	ACCCAGCAATAACCTCAGTCAGTC
Regió4_r	TCCGCAGCAGCTTGTATCCTTTTA
Regió5_f	CTTGAGGGCAGCGATTTA
Regió5_r	CCTAGCCTGGTCTGGAACCT
Regió6_f	TTCACAATAGCCAAAACTCAAAT
Regió6_r	CATCATCTCCCTGCCCTCTC
Regió6_rInt	CTGACTGACAAAGACTGCTGCTCCCTACT
Regió8_f	CTGGCCAGCTAATTTTCTATCAC
Regió8_r(2)	GTCTCCCAGGTTCAAGTGATTCTCT
Regió8_fInt	AGCCCAACTCTCACCATTCTG

b) Genotipació de polimorfismes localitzats en el gen AIB3

AIB1_f	GAGCCATCATGCCCAACCA
AIB1_r	TTTTTAGCACCCAGATACTCG
AIB1_fInt	AGGCAAAGCTTCCAAATACCA
AIB7_fExt	GTGGCTGTTGCTGCTGATGTTGCTGTG
AIB7_rExt	AGTGTGCCTTGGCCTGCGTAGTCCTG
AIB7_rInt	CACTTCGCTCTTAATGTCCACTACTG
AIB6_fExt	GTACCCACAAAGCCTGAAAACCCATCCA
AIB6_rExt	ATTCCATTTCCCTGCCCAACCCTACTCT
AIB6_fInt3	ACCGCGCCTGGCCTAGTTTGCTCTTTTA

c) Genotipació de polimorfismes localitzats en el gen DOR

DOR5_f	CTCTGGCCTCTCACCTCTTTGTTCTCCTAC
DOR5_r2	CATGCCTGTCTAATTTTTGTTGCTGTTGTT
Cons1_fInt	GATACTCCACTACCTTTTTTCCTCATAACC
DOR5_rInt	GCCACGTTCTTAAGCCCTTTGTAGCA
hExon1f	AGGAGCCGGTAGGAGGGAGTGGAG
hExon1r	CGCCGGCGGAGACAGACAAAG
hExon1r_Int	CATCGCCGGGACTCGCG
hExon1_2f	GGGGGAGGGAGAGCAGGAATAAGGGCAGTG
hExon1_2r	GTGGGCAGAGGTGACGAGGGAGCAGCAAACA
SNP4r	GACACCCCGAGGCAGCCAATGACT
SNP9_flong	GTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAA

SNP9_rxExt GAAGGAAGGCTGTGCAGACTAAATAAGCTC
 SNP9_fExt GTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATAC
 SNP9_rInt GCAGGGGCTCAAAGGATG
 SNP5_fExt TTACAGGCACATAGAAAAACAATCAA
 SNP5_fInt GATCTCGGCTCACTACAACCTCTGC
 SNP5_rInt GAACCCTGTCCCTCACTCATCTAATCTC

Condicions generals d'amplificació:

La DNA polimerasa utilitzada en totes les amplificacions de polimorfismes és la Taq Polimerasa de Biotools. Les amplificacions s'han fet en un volum final de 20 µl amb 1 unitat de Taq, suplementat amb 2 µl del tampó de la polimerasa, dNTPs a una concentració final de 165 µM, i els encebadors a una concentració final de 165 nM. La quantitat de DNA per reacció ha oscil·lat entre 5 i 50 ng segons la disponibilitat del mateix. La majoria de les amplificacions s'ha dut a terme en plaques de 96 pous. Al finalitzar la PCR s'han comprovat 5 mostres positives i els negatius (generalment 5 per placa). Només s'han digerit les plaques en que cap dels negatius s'havia amplificat.

a) Polimorfismes localitzats en el gen AIB3 corresponents a l'estudi de cerca de htSNPs:

PCRs en 1 ronda

Encebadors:	regió1_f regió1_r	regió2_f regió2_r	regió4_f regió4_r	regió5_f regió5_r
Longitud (pb):	780	553	1581	845
T _a (°C):	60	60	58	60
t _{ext} :	45''	45''	1'30''	45''
Cicles:	35	35	35	35
DMSO (µl):	0	0	0	0

Nested-PCRs

(per a amplificar en 1 ronda s'usen els encebadors i condicions de la 2a. ronda)

1a. ronda	Encebadors:	regió6_f regió6_r	regió8_f regió8_r2
	Longitud (pb):	1711	1780
T _a (°C):	58	58	
t _{ext} :	1'30''	1'30''	
Cicles:	30	30	
DMSO (µl):	0	1.33	

2a. ronda	Encebadors:	regió6_f regió6_rInt	regió8_fInt regió8_r2
	Longitud (pb):	1256	1098
T _a (°C):	54	58	
t _{ext.} :	1'30"	1'30"	
Cicles:	35	35	
DMSO (µl):	0	0	

b) Polimorfismes localitzats en el gen AIB3 corresponents a l'estudi de genotipació:

Nested-PCRs

(per a amplificar en 1 ronda s'usen els encebadors i condicions de la 2a. ronda)

1a. ronda	Encebadors:	AIB6_fExt AIB6_rExt	AIB1_f AIB1_r	AIB7_fExt AIB7_rExt
	Longitud (pb):	1279	409	739
T _a (°C):	58	60	62	
t _{ext.} :	1'30"	45"	1'20"	
Cicles:	30	30	30	
DMSO (µl):	0	0	0	

2a. ronda	Encebadors:	AIB6_fInt3 AIB6_rExt	AIB1_fInt AIB1_r	AIB7_fExt AIB7_rInt
	Longitud (pb):	268	281	471
T _a (°C):	60	58	58	
t _{ext.} :	45"	45"	45"	
Cicles:	35	35	35	
DMSO (µl):	0	0	0	

c) Polimorfismes localitzats en el gen DOR o regions flanquejants, corresponents a l'estudi de genotipació:

Nested-PCRs

(per a amplificar en 1 ronda s'usen els encebadors i condicions de la 2a. ronda)

1a. ronda	Encebadors:	DOR5_f DOR5_r2	hExon1_2f hExon1_2r	hExon1_f hExon1_r	SNP9_flong SNP9_rxExt	SNP5_fExt SNP5_rInt
	Longitud (pb):	844	1575	563	415	438
T _a (°C):	62	68	61	60	55	
t _{ext.} :	1'	2'	45"	45"	45"	
Cicles:	30	30	30	30	30	
DMSO (µl):	0	1.33	1.33	1.33	0	

2a. ronda	Encebadors:	Cons1_fInt DOR5_rInt	hExon1f SNP4r	hExon1_f hExon1_rInt	SNP9_fExt SNP9_rInt	SNP5_fInt SNP5_rInt
	Longitud (pb):	291	1460	385	348	297
T _a (°C):	60	65	56	60	62	
t _{ext} :	30''	2'	45''	30	30''	
Cicles:	35	35	35	35	35	
DMSO (µl):	0	1.33	1.33	0	0	

VI.2.2. Condicions i anàlisi de les digestions

Totes les digestions, si no s'indica el contrari, s'han realitzat afegint 5 unitats d'enzim per digestió en les condicions indicades en les especificacions de l'enzim. L'anàlisi de la digestió s'ha fet majoritàriament en gels d'agarosa de diferents percentatges (tal com s'indica a continuació). Després de carregar les digestions en gels i resoldre les diferents bandes, els genotips s'obtenien mirant el gel en un transiluminador, acceptant únicament genotips clarament identificables, és a dir, amb la intensitat de bandes esperada, en mostres suficientment amplificades, sense 'smear', etc. Igualment, un cop genotipada un placa, s'han genotipat novament 5 mostres escollides a l'atzar i s'ha comprovat que tots els genotips coincidissin. En cas negatiu s'ha repetit la genotipació.

a) Polimorfismes localitzats en el gen AIB3 de l'estudi de cerca de htSNPs:

Polimorfisme:	CV1207894	CV1207891	CV1207869	CV1207872	CV1207864
PCR:	regió1_f/r	regió2_f/r	regió4_f/r	regió4_f/r	regió5_f/r
Enzim:	EcoR I	EcoR I	Aci I	ApaL I	Sty I
V producte (µl):	5	5	5	5	5
Temp. incub. (°C):	37	37	37	37	37
Temps (h):	2	2	2	2	2
Agarosa:	2%	2%	1.5%	1.5%	2%
Productes de digestió* segons el genotip (en pb):	aa 701, 79	aa 245, 188, 120	aa 957, 259, 220, 136	tt 1212, 203, 166	cc 492, 238, 115
	gg 433, 268, 79	gg 365, 188	gg 679, 278, 259, 220, 136	gg 1378, 203	aa 607, 238

Polimorfisme:	CV11189436	CV1207855	CV2988250	CV2988252
PCR:	regió6_f/rInt	regió6_f/rInt	regió8_fInt/r2	regió8_fInt/r2
Enzim:	Hha I	Hae III	Hha I/Ase I	BsmA I
V producte (µl):	5	5	5	5
Temp. incub. (°C):	37	37	37	55
Temps (h):	2	2	2	2
Agarosa:	1.5%	1.5%	2%	1.5%
Productes de digestió* segons el genotip (en pb):	aa 1711	cc 599, 474, 205, 91	aa 402, 246, 207, 201	cc 667, 205, 129, 91
	gg 1198, 513	tt 690, 474, 205	gg 402, 207, 201, 163, 83	gg 361, 306, 205, 129, 91

* productes amb una longitud superior a 50 pb

b) Polimorfismes localitzats en el gen AIB3 corresponents a l'estudi de genotipació:

Polimorfisme:	AIB6	AIB1	AIB7
PCR:	AIB6_fInt3 AIB6_rExt	AIB1_fInt AIB1_r	AIB7_fExt AIB7_rInt
Enzim:	Hind III	Taq I	BsaA I
V producte (µl):	5	5	5
Temp. incub. (°C):	37	65	37
Temps (h):	2	2	2
Agarosa:	2%	2%	2%
Productes de digestió* segons el genotip (en pb):	gg 169, 99	cc 200, 81	cc 472
	cc 268	tt 281	tt 395, 77

c) Polimorfismes localitzats en el gen DOR o regions flanquejants, corresponents a l'estudi de genotipació:

Polimorfisme:	SNP4	SNP2
PCR:	hExon1_2_f SNP4r	hExon1_2_f SNP4r
Enzim:	Rsa I	Bfa I
V producte (µl):	5	5
Temp. incub. (°C):	37	37
Temps (h):	2	2
Agarosa:	2%	2%
Productes de digestió* segons el genotip (en pb):	tt 666, 275, 266, 166, 87	tt 785, 238, 175, 100, 87, 75
	cc 666, 541, 166, 87	cc 785, 413, 100, 87, 75

En el cas de SNP2, calia purificar el producte de PCR abans de digerir-lo, pel que s'ha usat l'equip 'Qiaquick PCR purification kit' (Qiagen) segons les instruccions de l'equip.

Polimorfisme:	DOR5	DOR1	SNP9	SNP5
PCR:	Cons1_fInt DOR5_rInt	hExon1_f hExon1_rInt	SNP9_fExt SNP9_rInt	SNP5_fInt SNP5_rInt
Enzim:	Stu I	Dde I	MspA1 I	Hae III
V producte (µl):	5	5	5	5
Temp. incub. (°C):	37	37	37	37
Temps (h):	2	2	2	2
Agarosa:	2%	2%	2%	Acrilamida
Productes de digestió* segons el genotip (en pb):	gg 230, 61	gg 330, 55	aa 295, 52	gg 153, 143
	cc 291	cc 281, 55	gg 183, 112, 52	cc 143, 130

* productes amb una longitud superior a 50 pb

VI.2.3. Interpretació dels resultats

Un cop digerides les mostres s'han carregat en gels d'agarosa a diferents percentatges (en algun cas en gels d'acrilamida) i després dels temps necessari per a resoldre correctament les diferents bandes s'ha procedit a la interpretació dels resultats. Aquesta ha consistit en comprovar directament en un transiluminador els patrons de digestió, i anotar-ne el genotip corresponent. En els casos en que la senyal era dèbil, el patró no era inequívoc, o bé la intensitat de les diferents bandes no era l'esperada, s'ha desestimat el resultat i s'ha optat per repetir la genotipació de la mostra.

VI.3. Quantificació relativa de mRNA per PCR a temps real

VI.3.1. Quantificació relativa dels transcrits del gen DOR i AIB3 per PCR a temps real

En diferents ocasions s'ha quantificat el transcrit del gen AIB3 i el del gen DOR. Depenent de l'experiment s'han utilitzat diferents gens constitutius: ciclofilina A (CYPA), β -actina, gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (GAPDH) o proteïna àcida ribosomal (ARP). El disseny dels encebadors necessaris es va fer seguint les indicacions de Applied Biosystems per a la PCR a temps real amb SYBR-Green. Tots els encebadors s'han utilitzat a una concentració de 300nM, la qual s'ha determinat experimentalment com l'òptima.

gen	espècie	encebadors	longitud	rendiment
AIB3	hs	GAACACCTCAGCAGATCAGAACACT GACTATTGGTCAAAAGGGGAGAAAC	77 pb	92%
	rn	CGAAGCCCAGTCTCATCCAGT GGGCCTTCAGTTTCTCCATCTG	143 pb	100%
	mm	CACAGCGCCAACCACAAAA GATCCCACCTTCTCCTCCACTA	84 pb	88%
DOR	hs	CCTCCCCTTCTCCTCCAGTAAA AGCCCAAATTCAGTCTCACCA	114 pb	92%
	mm	AACCACAGCCTGCTTCTAATACCTT TCAGCCAGTCTCAACACAAAACAC	105 pb	92%
CYPA	hs	CAAATGCTGGACCCAACACAA CCTCCACAATATTCATGCCTTCTT	120 pb	94%
	rn	GCAAATGCTGGACCAAACACA CCACAATGCTCATGCCTTCTT	118 pb	100%
ARP	rn	GAGCCAGCGAAGCCACACT GATCAGCCCGAAGGAGAAGG	62 pb	100%
GAPDH	mm	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA GCGGCACGTCAGATCCA	55 pb	98%
β actina	rn	GGGAAATCGTGCCTGACATT GCGGCAGTGGCCATCTC	76 pb	98%

Taula 30. Seqüències dels encebadors usats en les PCRs a temps real dels transcrits dels gens DOR, AIB3 i de gens constitutius. S'indica l'espècie a que corresponen, la longitud del producte i el rendiment en la PCR. hs: homo sapiens; rn: rattus norvegicus; mm: mus musculus.

Condicions de l'amplificació:

Els encebadors utilitzats tenen eficiències d'amplificació diferents, pel que s'han utilitzat rectes estàndard per a valorar aquesta eficiència i poder corregir l'efecte d'aquesta en cadascuna de les mostres. Les amplificacions s'han fet sense addició de N-uracil glicosidasa en un volum final de 16 µl. Tots els encebadors s'han afegit a una concentració de 300 nM (determinada experimentalment com la òptima) i la amb una quantitat de cDNA de 10 ng d'equivalents de RNA per tub. Els cicles s'han fet en les següents condicions:

10'	95°C	x40
15"	95°C	
1'	60°C	

Un cop finalitzada l'amplificació s'han fet les corbes de melting de cada pou per a descartar amplificacions inespecífiques o formació de dímers d'encebadors.

VII. TÈCNIQUES GENERALS DE CULTIUS CEL·LULARS

VII.1. Tripsinització

El creixement de les cèl·lules es duu a terme en diferents sistemes de cultiu. Aquests a grans trets es poden distingir en sistemes de creixement en suspensió o bé sobre una superfície. En el segon cas (el que ens interessa en aquesta tesis) les cèl·lules creixen fins a arribar a confluïr, moment en que es fa necessari diluir-les i passar-les a una nova superfície on puguin seguir creixent. Per tal de desenganxar les cèl·lules s'utilitza la tripsina, proteasa que hidrolitza les proteïnes de la membrana cel·lular, permetent la ruptura de la unió de les cèl·lules a la placa (que es fa a través de proteïnes). Donat que es tracta d'un procediment en que es veuen afectades nombroses proteïnes de membrana, cal no excedir-se en els temps de reacció per a evitar un dany excessiu a les cèl·lules.

Material, solucions i reactius:

Tripsina/EDTA
PBS

Procediment:

Es retira per aspiració el medi de cultiu i es fan 2 rentats amb PBS. A continuació s'afegeix tripsina/EDTA a la placa (1 ml per a flascons de 75 cm²) i es deixa actuar durant el temps necessari, entre 5 i 10 minuts generalment, a 37°C . Passat aquest temps s'afegeixen 4 ml de medi (això atura la reacció de tripsinització) i es resuspenen les cèl·lules. La suspensió es centrifuga a 200g durant 3' i el pellet es resuspen amb el volum de medi apropiat.

VII.2. Congelació de cèl·lules

La conservació de les cèl·lules es fa en tancs amb nitrogen líquid. Per tal de congelar-les s'usa dimetilsulfòxid (DMSO) com a crio preservant i un sistema comercial de congelació que en conjunt assegurin una elevada viabilitat de les cèl·lules.

Material, solucions i reactius:

DMSO
FBS
StrataCooler Cryo Lite Preservation Module (Stratagene)

Procediment:

Es tripsinitzen les cèl·lules i es resuspenen a la densitat desitjada en FBS suplementat amb un 10% de DMSO, prèviament atemperat a 4°C. A continuació es fan al·lòtotes en criotubs i es disposen en el 'StrataCooler' prèviament atemperat a 4°C. Es guarda el

‘StrataCooler’ amb les cèl·lules al·liqüotades en un congelador a -80°C tota la nit i a l’endemà es guarden els tubs amb les cèl·lules en el tanc de nitrogen.

VII.3. Descongelació de cèl·lules

Procediment:

Es descongela el criotub que conté les cèl·lules mitjançant un bany a 37°C , i es transfereix la suspensió cel·lular a un tub de 15 ml que contingui medi de cultiu (uns 4 ml). Es centrifuga a 200g durant 3’ i es descarta el sobrenedant. Les cèl·lules del pellet es resuspenen amb medi de cultiu i es sembren en un flascó o placa (escollir la superfície de sembra en funció del nº de cèl·lules).

VII.4. Introducció de DNA exògen en cèl·lules

En alguns estudis es necessari introduir DNAs exògens en les cèl·lules cultivades. Amb tal propòsit es poden utilitzar diferents procediments, que permeten introduir el DNA de forma transitòria o estable. En aquesta tesi se n’han utilitzat bàsicament quatre: transfecció per precipitació amb fosfat càlcic; transfecció amb ‘Lipofectamina 2000’ (Invitrogen); per electroporació; i per infecció vírica amb vectors lentivirals.

VII.4.1. Transfecció de cèl·lules pèl mètode del fosfat càlcic

Aquest mètode es basa en la introducció d’un coprecipitat de fosfat càlcic i DNA exògen dins la cèl·lula (Sambrook *et al.*, 1998). El precipitat s’adhereix inicialment a la superfície de la cèl·lula i posteriorment és endocitat. El precipitat es forma en barrejar dues solucions, una solució salina que conté clorur càlcic i una altra que conté el fosfat; el DNA present en la barreja queda incorporat en el precipitat que es forma. Es desconeix el mecanisme exacte d’aquest procés.

Un dels paràmetres més importants en aquest mètode és el pH de la solució que conté el fosfat. Petites variacions del pH determinen el tamany del precipitat i la seva entrada a la cèl·lula. Es recomana provar l’eficiència de transfecció amb solucions de fosfat de diferent pH dins d’un rang òptim teòric de 6.5-7.5. Aquest rang pot variar considerablament entre les diferents línies cel·lulars i la qualitat del DNA que s’utilitzi.

Un altre paràmetre que pot ser important en la formació del precipitat és la quantitat de DNA. En aquest treball s’ha utilitzat 20 µg de DNA per una placa de 10 cm de diàmetre. Finalment, s’ha de tenir en compte la densitat del cultiu cel·lular en el moment de la transfecció, aquest paràmetre depèn del tipus cel·lular. Les transfeccions en cèl·lules 293T, per exemple, es realitzen sobre cultius que es troben entre un 50% i un 60% de confluència.

Material, solucions i reactius:

Solució de clorur càlcic:

CaCl ₂	500 mM
BES (Fluka)	100 mM

S'ajusta el pH a 6,95, es filtra i es conserva a temperatura ambient. Les alíquotes que no utilitzem normalment poden guardar-se a -20°C.

Solució de fosfat:

NaCl	50 mM
Na ₂ HPO ₄	0,75 mM
NaH ₂ PO ₄	0,75 mM
BES	50 mM

Es preparen diferents solucions amb diferències de pH de 0.02 punts, ajustant amb NaOH. Les alíquotes, es filtren i es guarden a temperatura ambient. Finalment es valora l'eficiència de transfecció amb cada solució.

Aigua injectable de Braun (*Aqua B. Braun* de B. Braun Medical SA) o bé aigua bidestil·lada i estèril.

Preparacions dels DNAs plasmídics d'interès: Es recomana l'ús de preparacions concentrades de DNA, superiors a 1 µg/µl, obtingudes per maxiPrep o per centrifugació en gradient de clorur de cesi.

Procediment:

Totes les operacions s'han dut a terme en la campana de flux laminar ja que impliquen la manipulació de cèl·lules en cultiu. El procediment és l'adequat per una transfecció en placa de 10 cm. Per transfectar una placa de 15 cm es doblen els volums de totes les solucions, i per transfectar un pou d'una placa de 6 s'usa una cinquena part dels volums.

1- Es sembren les cèl·lules el dia abans o el mateix dia al matí, de tal manera que en el moment de la transfecció es trobin a un 20%-40% de confluència, tot i que aquest percentatge és variable i es pot optimitzar segons el tipus cel·lular utilitzat. El format de la placa que s'esculli dependrà de les finalitats per les quals es transfecten les cèl·lules. Per exemple, si només es vol fer una prova de tampons, es poden sembrar pous de plaques de 6 mentre que si interessa obtenir un elevat nombre de cèl·lules transfectades és recomanable sembrar-les en plaques de 10 o 15 cm de diàmetre.

2- Es canvia el medi de cultiu de les plaques per medi fresc just abans de començar la transfecció, i es tornen a posar dins l'incubador.

3- Es prepara la barreja de DNAs que es vol transfectar en tubs estèrils de 15 ml: 18 µg del DNA d'interès + 2 µg de GFP + aigua fins a 250 µl. Si es tracta d'una transfecció doble, es barrejaran 9 µg de cada tipus de DNA.

- 4- S'afegeixen gota a gota 250 µl de la solució de calci i s'agita vigorosament donant cops a la base del tub perquè es barregin bé el DNA i el calci.
- 5- S'afegeixen gota a gota 500 µl de la solució de fosfat, mentre es barreja la mescla bombollejant a través d'una pipeta de 2 ml de cultius i el pipetejador automàtic.
- 6- Es deixa reposar 15 minuts a temperatura ambient per afavorir la formació de precipitats, és important que la temperatura de la campana no sigui elevada.
- 7- Transcorregut aquest temps, es torna a barrejar fent bombolles amb el pipetejador per tal d'homogeneïtzar la solució i s'afegeix a les cèl·lules gota a gota i lentament mentre s'agiten suaument les plaques en dues direccions (vertical-horitzontal), evitant que el precipitat quedi únicament en el centre de la placa.
- 8- Es deixen les plaques a l'incubador entre 12 i 20 hores per tal que incorporin el precipitat.
- 9- Passat aquest temps s'aspira el medi que conté el precipitat (que es pot observar al microscopi), es renten les plaques dues vegades amb PBS i s'hi afegeix medi de cultiu fresc.
- 10- Al cap de 24 o 48 hores més, es pot realitzar l'experiment i la monitorització del nombre de cèl·lules transfectades en el citòmetre de flux.

VII.4.2. Transfecció de cèl·lules amb Lipofectamina 2000

Per tal de permetre l'entrada de DNA a la cèl·lula existeixen gran varietat de lípids capaços d'acomplexar el DNA i al fusionar-se amb la membrana citoplasmàtica, facilitar-ne l'entrada al citoplasma. D'entre aquestes compostos s'ha treballat amb Lipofectamina 2000, lípid catiònic comercialitzat per Invitrogen.

Procediment segons les instruccions del producte.

VII.4.3. Transfecció de cèl·lules per electroporació

La electroporació consisteix en exposar les cèl·lules a polsos de camps elèctrics d'alta intensitat. En determinades condicions aquest tractament produeix la desestabilització temporal de regions de la membrana cel·lular, moment en el qual la cèl·lula esdevé altament permeable a molècules exògenes presents en el medi. El procediment a seguir depèn del tipus cel·lular que s'electropora. El procediment per a les línies pancreàtiques utilitzades en aquesta tesi es troba en el punt **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.**

VII.4.4. Transfecció de cèl·lules per infecció amb vectors lentivirals

Els mètodes de transfecció de cèl·lules més eficients són aquells que utilitzen la capacitat infectiva dels virus per fer arribar el transgen a la cèl·lula. Existeixen diferents

virus recombinants que poden satisfer aquest propòsit, però entre ells hi ha diferències notables respecte a la capacitat infectiva o el tipus d'infecció. Així, en aquesta tesi s'han usat lentivirus, els quals tenen un elevat tropisme i permeten fer transfeccions estables, ja que el transgen s'integra en el genoma de la cèl·lula.

Material, solucions i reactius:

Polibrè 8 mg/ml (1000x)

Procediment:

1- (dia 0) El dia abans de la infecció es sembren entre 5 i $10 \cdot 10^4$ cèl·lules per pou en plaques de 12.

2- (dia 1) A l'endemà s'afegeix al medi polibrè fins a una concentració final de $8 \mu\text{g/ml}$ i seguidament s'afegeixen els virus en la quantitat apropiada per a assegurar-se la infecció de totes les cèl·lules. Es deixen les cèl·lules en un incubador a 32°C , ja que això augmenta l'estabilitat dels virus.

3- (dia 1) Opcionalment es centrifuguen les plaques amb les cèl·lules a 2500 rpm durant 90' a 30°C (s'incrementa l'eficiència d'infecció).

4- (dia 2) A l'endemà es canvia el medi per medi fresc (es pot canviar el medi als 2 o 3 dies sense que això afecti la viabilitat de les cèl·lules).

(L'obtenció de lentivirus i el seu titolat es descriu en el punt VII.6 i el punt VII.7)

VII.4.5. Determinació de l'eficiència de transfecció per citometria de flux (FACS)

Per tal de determinar l'eficiència de transfecció, un dels mètodes que més s'ha emprat en aquesta tesi és la quantificació mitjançant la cotransfecció d'un vector amb la *green fluorescent protein* (GFP). Breument el mètode consisteix en cotransfectar les cèl·lules amb el vector que conté GFP. Aquesta proteïna emet fluorescència quan es excita a una determinada longitud d'ona, pel que pot ser detectada per mètodes fluorimètrics. Així doncs les cèl·lules transfectades amb GFP emeten fluorescència i gràcies a aquesta propietat poden ser distingides d'aquelles que no ho han estat.

Procediment:

Es tripsinitzen les cèl·lules, i després d'aturar la reacció de tripsinització per addició de medi es passa la suspensió cel·lular pel citòmetre de flux amb un protocol que permeti classificar les cèl·lules segons el grau de fluorescència de GFP.

En aquesta tesi aquestes determinacions s'han fet al 'Servei de Citometria de Flux' dels 'Serveis Científico-tècnics' de la Universitat de Barcelona, seguint els protocols recomenats pel personal del servei.

VII.5. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux

Per tal de determinar el percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular un dels mètodes emprats és el de la tinció del DNA amb iodur de propidi. Aquest marcatge permet determinar per citometria de flux la quantitat de DNA per cèl·lula i així assignar-li la fase del cicle cel·lular en la que es troba.

El protocol que aquí es descriu és el que s'ha utilitzat en aquesta tesi i prové del “*Current protocols in cytometry*” (Robinson <Editor>, 2002).

Material, solucions i reactius:

Etanol 70%

PBS

Solució iodur de propidi (IP)/tritó/rnasa

Procediment:

a) Preparació de la solució de IP, tritó i rnasa.

Es prepara una solució de tritó X-100 al 0.1% (v/v) en PBS. A 10 ml d'aquesta solució se li afegeixen 2 mg de rnasa A (lliure de dnases) i 200 µl de solució de iodur de propidi 1mg/ml.

b) Fixació de les cèl·lules amb etanol.

1- Preparar tubs de 12 ml (tants tubs com mostres a analitzar) amb 4.5 ml d'etanol al 70% i posar-los en fred (gel).

2- Recollir entre 10^6 i 10^7 cèl·lules en un tub amb 5 ml de PBS.

3- Centrifugar la suspensió cel·lular durant 5' a 200g.

4- Resuspendre el sediment amb 0.5ml de PBS, mitjançant una pipeta Pasteur. Cal evitar que quedin agregats.

5- Barrejar la suspensió anterior amb els 4.5 ml d'etanol al 70%. Mantenir la suspensió en contacte amb el fixador un mínim de 2 hores. Si convé es pot conservar les cèl·lules fixades a una T^a entre 0 i -40°C.

c) Marcatge amb iodur de propidi.

6- Centrifugar la suspensió de cèl·lules fixades durant 5' a 200g. Descartar el sobrenedant.

7- Resuspendre les cèl·lules en 5 ml de PBS, esperar 1' i centrifugar 5' a 200g.

8- Resuspendre el sediment en 1 ml de solució IP/tritó/mnasa 15' a 37°C o 30' a temperatura ambient. En el cas d'alguns tipus cel·lulars es requereix un marcatge de diversos dies a 4°C.

VII.6. Generació de vectors lentivirals 2: Obtenció de les partícules virals

Un cop s'han obtingut els plasmidis amb els inserts desitjats (veure IV.2) el següent pas en la generació dels vectors lentivirals és la producció de les partícules virals que actuaran de vehicle del DNA d'interès. La producció d'aquestes partícules es realitza en cèl·lules 293T a les que es transfecten els vectors que contenen els gens virals necessaris per a la síntesi de l'envolta (pMD2G) i les proteïnes d'empaquetament (pCMVdeltaR8.74), així com el genoma víric modificat que inclou el DNA d'interès (vector de transferència: pWPXL o pLVTHM).

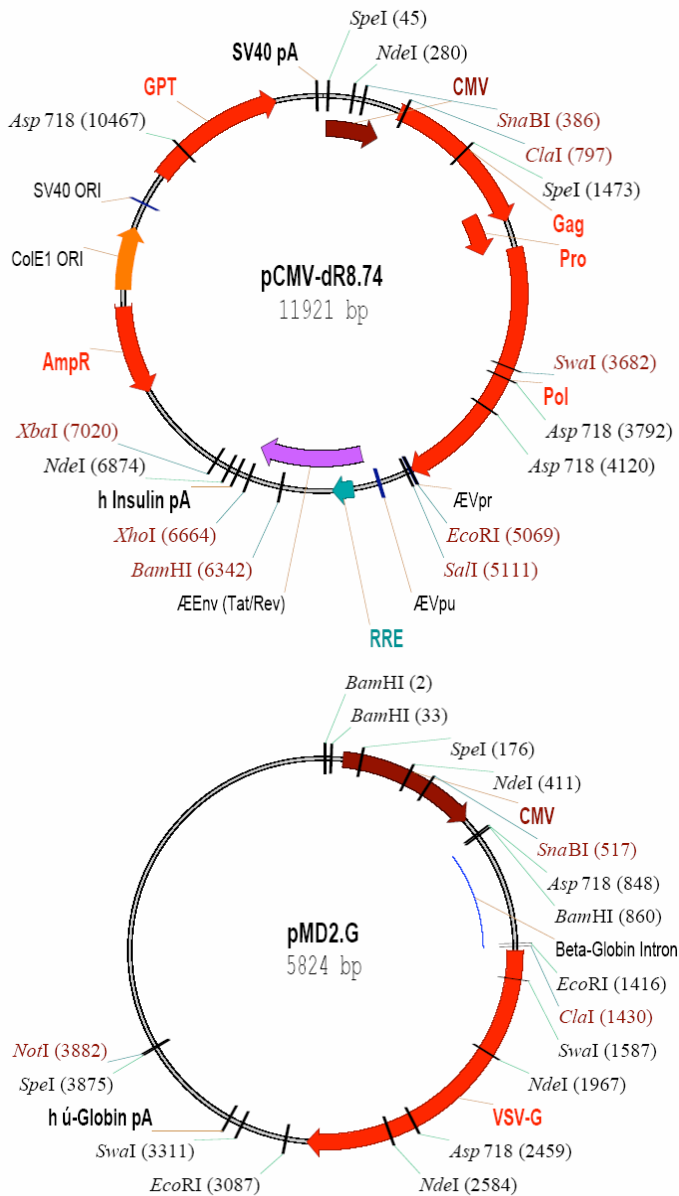


Figura 41. Mapes dels vectors pCMVdeltaR8.74 i pMD2.G. Es mostren els principals elements dels vectors (descrits en el text). Obtingut de www.tronolab.com

Breument el procediment consisteix en transfectar de les cèl·lules 293T pel mètode del fosfat càlcic (veure 'VII.4.1 Transfecció de cèl·lules pel mètode del fosfat càlcic', pàgina 142). Al segon dia el medi de la placa transfectada ja conté partícules virals. D'aquest medi i el del tercer dia se'n fan alíquotes que es congelen a -80°C o bé es concentren per ultracentrifugació. A continuació es descriu el procediment detallat:

1- (dia 0) Es sembren 6 plaques de 10 cm de diàmetre amb cèl·lules 293T a partir d'1 flascó de 75 cm^2 amb cèl·lules 293T confluents.

2- (dia 1) A l'endemà, amb les cèl·lules en una confluència del 80-90%, es fa la transfecció de les cèl·lules pel mètode del fosfat càlcic. La mescla de DNA que es transfecta conté les següents quantitats de plasmidis per a cada placa: 3 μg de pMD2G; 7 μg de pCMVdeltaR8.74; i 10 μg del vector de transferència.

3- (dia 2) A l'endemà es canvia el medi a primera hora del matí i es passen les cèl·lules a un incubador a 32°C .

4- (dia 3) Passades 24 hores es recull el medi i s'afegeix medi fresc. El medi recollit es centrifuga 3 minuts a 1200 rpm a 4°C , es filtra a través d'un filtre de $0.45\ \mu\text{m}$ i es guarda a 4°C .

5- (dia 4) Passades unes altres 24 hores es recull el medi, es centrifuga 3 minuts a 1200 rpm a 4°C , es filtra a través d'un filtre de $0.45\ \mu\text{m}$ i s'ajunta amb al medi recollit el dia 3.

6- (dia 4) El medi recollit conté aproximadament 10^6 unitats transductores (TU) per ml (titolat en 293T). Aquest medi es pot alíquotar en volums de 1 ml i guardar a -80°C , o alternativament, si es desitja tenir preparacions més concentrades, es pot concentrar els virus.

Notes de bioseguretat:

El treball amb vectors lentivirals es fa en condicions estàndard de bioseguretat de nivell 2 segons normes de la 4^a edició del '*CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*' (U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, 1999). Tots els residus generats són eliminats segons els procediments estàndard corresponents al nivell 2 de bioseguretat. Tot i així es recomana seguir algunes mesures de nivell 3 per tal de minimitzar al màxim el risc d'una infecció fortuïta amb els vectors produïts.

En el cas d'aquesta tesi s'ha treballat en un espai especialment habilitat per al treball amb vectors virals (la Sala de Cultius dels Serveis Científics Comuns del Parc Científic de Barcelona) i tots els residus generats s'han tractat amb lleixiu dil·luït al 20% previament a la seva eliminació.

VII.6.1. Purificació i concentració de lentivirus

Material, solucions i reactius:

Tubs cònics Beckman (ref 358126)
Solució estèril de sacarosa 20% en aigua
Rotor basculant SW28 (ultracentrifuga)

Procediment:

- 1- Es posen els 20 ml de medi recollit i filtrat en els tubs de centrifuga i se'ls afegeix a la base 4 ml de solució de sacarosa 20%. Al final s'han de tenir dues fases clarament diferenciades. Cal tractar els tubs amb cura per tal d'evitar desfer el gradient.
- 2- Es centrifuguen a 26000 rpm durant 90 minuts i a 4°C.
- 3- Es recull i es descarta per aspiració el sobrenedant de la capa superior i part de la inferior, amb cura de no mesclar les fases.
- 4- Quan ja només queda la fase amb la solució de sacarosa s'elimina aquesta per decantació.
- 5- Es deixa assecar breument el precipitat (conté les partícules virals i sovint no és visible) i es resuspen en el volum desitjat en medi complet o en medi lliure de sèrum.
- 6- El virus així obtingut es congela a -80°C.

VII.7. Titolat de vectors lentivirals

El titolat de les preparacions lentivirals es pot fer en diferents tipus cel·lulars, tot i que usualment, per la facilitat de manipulació que tenen, es sol fer en cèl·lules HeLa o 293T. El procediment consisteix en determinar el n° de cèl·lules infectades per ml de preparació de virus. En el cas d'aquesta tesi els vectors lentivirals que s'han usat contenen GFP, pel que aquesta detrmnació es va fer per citometria de fluxe.

Material, solucions i reactius:

Paraformaldehid al 3%

Procediment:

- 1- (dia 0) Es sembren $1 \cdot 10^5$ cèl·lules 293T per pou en una placa mw de 6 pous.
- 2- (dia 1) A l'endemà s'afegeixen diferents volums de preparació del virus per pou, dil·luït o concentrat.
- 3- (dia 2) Passades 24h es canvia el medi per medi fresc

4- (dia 4 o 5) Als 3 o 4 dies de la infecció es renten les cèl·lules amb PBS i es tripsinitzen amb 250 µl de tripsina /EDTA 2' a 37°C. Passat aquest temps s'afegeixen 250 µl de paraformaldehid 3% (actúa com a fixador i inactiva les partícules virals que poguessin quedar), es resuspenen, i s'analitza l'expressió de GFP al FACS.

El títol es calcula amb la següent fórmula:

$$293T \text{ TU/ml} = n^{\circ} \text{cèl·lules} \cdot \frac{\% \text{cèl·lules GFP} / 100}{\text{ml solució virus}}$$

Per al càlcul únicament s'utilitzen dil·lucions amb un percentatge de cèl·lules positives per a GFP situat entre un 4% i un 20% ja que en percentatges superiors al 20% s'incrementa notablement la probabilitat de tenir cèl·lules infectades per dos partícules virals, i per sota de 4% la mesura del FACS no es prou acurada.

VIII. TÈCNIQUES ESPECÍFIQUES DE CULTIUS CEL·LULARS

VIII.1. Cultiu de línies cel·lulars

VIII.1.1. Cultiu de cèl·lules de la línia cel·lular HeLa

Les cèl·lules HeLa procedeixen d'adenocarcinoma de cèrvix humà. Presenten un fenotip epitelial i tenen incorporades seqüències del papilomavirus humà 18 (HPV-18). Aquestes cèl·lules són àmpliament utilitzades per l'estudi de diferents proteïnes expressades de manera transitòria.

Medi de cultiu:

DMEM amb un 10% de FBS:

500 ml de DMEM

5.5 ml de penicil·lina/estreptomicina (100x)

55 ml de FBS

Condicions de cultiu:

El cultiu es fa en plaques o flascons de cultiu, mantenint les cèl·lules en un incubador a 37°C, amb un 5% de CO₂ i un 95% d'humitat. El creixement de les cèl·lules és força ràpid pel que es passen cada 2 o 3 dies i se'ls canvia el medi cada 2. Regularment es fan proves per a comprovar l'absència de micoplasma.

Per a passar-les es tripsinitzen durant 3' a 37°C i es sembren diluint-les en una relació 1:4 o 1:5.

VIII.1.2. Cultiu de cèl·lules de la línia cel·lular 293T

La línia cel·lular 293 es deriva de cèl·lules d'epiteli renal humà transformades amb el gen E1A d'adenovirus (Graham et al., 1977). La línia 293T és un derivat de la 293 que a més expressa l'antigen T llarg del SV40, el que permet la replicació episomal de plasmidis que continguin un origen i regió promotora primerenca de SV40 (Alwine, 1985).

Medi de cultiu:

DMEM amb un 10% de FBS:

500 ml de DMEM

5.5 ml de penicil·lina/estreptomicina (100x)

55 ml de FBS

Condicions de cultiu:

El cultiu es fa en plaques o flascons de cultiu, mantenint les cèl·lules en un incubador a 37°C, amb un 5% de CO₂ i un 95% d'humitat. El creixement de les cèl·lules és força ràpid pel que es passen cada 2 o 3 dies i se'ls canvia el medi cada 2. Regularment es fan proves per a comprovar l'absència de micoplasma.

Per a tripsinitzar-les s'afegeix la tripsina, la qual es reparteix per tota la placa o flascó, i immediatament, abans que es desprengui la monocapa, s'aspira. La tripsina que queda és suficient per alliberar les cèl·lules. Es deixen amb la tripsina durant 2' en la campana, aturant-se la reacció amb el medi amb el que es sembraran (no es necessari eliminar la tripsina que podia quedar) i es sembren diluint-les en una relació 1:4 o 1:5.

Resultats suplementaris

Continguts

Resultats suplementaris dels estudis de genotipació

Taula 31. Resultats dels estudis d'associació genètica amb diabetis de tipus 2: Freqüències dels polimorfismes DOR i AIB en no diabètics i diabètics ordenats segons l'ÍMC: pàgina 157

Taula 53. Resultats dels estudis d'associació genètica amb diabetis de tipus 2: Anàlisi estadístic de les freqüències dels polimorfismes DOR i AIB en no diabètics i diabètics ordenats segons l'ÍMC: pàgina **Error! No s'ha definit l'adreça d'interès.**

a)

	DOR5				DOR1				AIB6				AIB1				AIB7				
	GG	GC	CC	total	GG	GC	CC	total	GG	GC	CC	total	CC	CT	TT	total	CC	CT	TT	total	
No diabètics	IMC≤25	0.23	0.51	0.26		0.31	0.53	0.16		0.24	0.52	0.24		0.82	0.16	0.02		0.17	0.46	0.36	
	25<IMC<30	44	55	40	139	52	53	29	134	47	52	34	133	115	35	2	152	30	52	63	145
	30≤IMC<40	0.32	0.40	0.29		0.39	0.40	0.22		0.35	0.39	0.26		0.76	0.23	0.01		0.21	0.36	0.43	
	IMC≥40	44	75	36	155	66	84	31	181	44	89	28	161	126	44	3	173	24	74	49	147
	Tots*	0.28	0.48	0.23		0.36	0.46	0.17		0.27	0.55	0.17		0.73	0.25	0.02		0.16	0.50	0.33	
Diabètics	IMC≤25	36	83	35	154	53	86	22	161	46	81	36	163	122	34	0	156	26	75	54	155
	25<IMC<30	0.23	0.54	0.23		0.33	0.53	0.14		0.28	0.50	0.22		0.78	0.22	0.00		0.17	0.48	0.35	
	30≤IMC<40	121	203	113	437	172	231	88	491	131	226	102	459	388	108	8	504	83	205	174	462
	IMC≥40	0.28	0.46	0.26		0.35	0.47	0.18		0.29	0.49	0.22		0.77	0.21	0.02		0.18	0.44	0.38	
	Tots*	22	38	38	98	20	24	11	55	36	41	20	97	89	20	2	111	17	37	34	88
Diabètics	IMC≤25	0.22	0.39	0.39		0.36	0.44	0.20		0.37	0.42	0.21		0.80	0.18	0.02		0.19	0.42	0.39	
	25<IMC<30	45	92	47	184	58	62	23	143	61	90	41	192	160	55	4	219	24	84	72	180
	30≤IMC<40	0.24	0.50	0.26		0.41	0.43	0.16		0.32	0.47	0.21		0.73	0.25	0.02		0.13	0.47	0.40	
	IMC≥40	52	100	57	209	55	65	34	154	62	67	40	169	197	57	6	260	37	93	90	220
	Tots*	0.25	0.48	0.27		0.36	0.42	0.22		0.37	0.40	0.24		0.76	0.22	0.02		0.17	0.42	0.41	
Diabètics	IMC≤25	9	20	16	45	11	23	5	39	9	23	4	36	27	8	1	36	4	15	13	32
	25<IMC<30	0.20	0.44	0.36		0.28	0.59	0.13		0.25	0.64	0.11		0.75	0.22	0.03		0.13	0.47	0.41	
	30≤IMC<40	127	242	147	516	137	158	71	366	113	155	79	347	465	141	12	618	81	231	203	515
	IMC≥40	0.25	0.47	0.28		0.37	0.43	0.19		0.33	0.45	0.23		0.75	0.23	0.02		0.16	0.45	0.39	
	Tots*	0.25	0.47	0.28		0.37	0.43	0.19		0.33	0.45	0.23		0.75	0.23	0.02		0.16	0.45	0.39	

b)

	DOR5			DOR1			AIB6			AIB1			AIB7			
	G	C	total	G	C	total	G	C	total	C	T	total	C	T	total	
No diabètics	IMC≤25	139	147	286	202	150	352	165	165	330	323	35	358	137	203	340
	25<IMC<30	0.49	0.51		0.57	0.43		0.50	0.50		0.90	0.10		0.40	0.60	
	30≤IMC<40	143	135	278	157	111	268	146	120	266	265	39	304	112	178	290
	IMC≥40	0.51	0.49		0.59	0.41		0.55	0.45		0.87	0.13		0.39	0.61	
	Tots*	163	147	310	216	146	362	177	145	322	296	50	346	122	172	294
Diabètics	IMC≤25	0.53	0.47		0.60	0.40		0.55	0.45		0.86	0.14		0.41	0.59	
	25<IMC<30	155	153	308	192	130	322	173	153	326	278	34	312	127	183	310
	30≤IMC<40	0.50	0.50		0.60	0.40		0.53	0.47		0.89	0.11		0.41	0.59	
	IMC≥40	445	429	874	575	407	982	488	430	918	884	124	1008	371	553	924
	Tots*	0.51	0.49		0.59	0.41		0.53	0.47		0.88	0.12		0.40	0.60	
Diabètics	IMC≤25	82	114	196	64	46	110	113	81	194	198	24	222	71	105	176
	25<IMC<30	0.42	0.58		0.58	0.42		0.58	0.42		0.89	0.11		0.40	0.60	
	30≤IMC<40	182	186	368	178	108	286	212	172	384	375	63	438	132	228	360
	IMC≥40	0.49	0.51		0.62	0.38		0.55	0.45		0.86	0.14		0.37	0.63	
	Tots*	204	214	418	175	133	308	191	147	338	451	69	520	167	273	440
Diabètics	IMC≤25	0.49	0.51		0.57	0.43		0.57	0.43		0.87	0.13		0.38	0.62	
	25<IMC<30	38	52	90	45	33	78	41	31	72	62	10	72	23	41	64
	30≤IMC<40	0.42	0.58		0.58	0.42		0.57	0.43		0.86	0.14		0.36	0.64	
	IMC≥40	496	536	1032	432	300	732	381	313	694	1071	165	1236	393	637	1030
	Tots*	0.48	0.52		0.59	0.41		0.55	0.45		0.87	0.13		0.38	0.62	

Taula 31. a) Freqüències de genotips dels polimorfismes DOR i AIB en no diabètics i diabètics separats segons l'ÍMC. b) Freqüències al·leliques. n: número d'individus de cada grup; f: freqüència. * no s'inclouen els mòrbids.

Polimorfisme	Genotip	No diabètic			Diabètic			No diabètic IMC>25			Diabètic IMC>25			No diabètic IMC≤25			No diabètic IMC>25														
		OR	CI	p	OR	CI	p	OR	CI	p	OR	CI	p	OR	CI	p	OR	CI	p												
a)	DOR5	GG	127	0.85	0.63-1.15	0.281	88	0.77	0.54-1.09	0.125	33	0.96	0.50-1.86	0.909	33	0.88	1.42	0.88-2.32	0.133	88	1.42	0.88-2.32	0.133								
		GC	203	242	1.02	0.78-1.33	0.891	130	192	1.21	0.88-1.65	0.228	73	38	0.61	0.35-1.06	0.060	73	130	0.76	0.50-1.16	0.179	130	0.76	0.50-1.16	0.179					
	DOR1	CC	113	147	1.14	0.85-1.54	0.364	0.479	76	104	1.03	0.72-1.48	0.857	0.284	37	38	1.81	1.01-3.27	0.034	0.081	37	76	1.00	0.62-1.62	0.996	0.273	37	76	1.00	0.62-1.62	0.996
		GG	172	137	1.11	0.83-1.49	0.451	118	113	1.03	0.73-1.44	0.881	54	20	1.29	0.65-2.55	0.431	54	118	1.29	0.85-1.94	0.206	54	118	1.29	0.85-1.94	0.206				
	AIB6	GC	231	158	0.85	0.65-1.13	0.259	137	127	0.97	0.70-1.35	0.855	94	24	0.68	0.35-1.30	0.206	94	137	0.67	0.46-0.99	0.035	94	137	0.67	0.46-0.99	0.035				
		CC	88	71	1.10	0.77-1.58	0.582	0.528	60	57	1.01	0.66-1.54	0.964	0.812	28	11	1.32	0.57-3.04	0.480	0.445	28	60	1.24	0.74-2.10	0.385	0.107	28	60	1.24	0.74-2.10	0.385
	AIB1	GG	131	165	1.32	0.99-1.76	0.049	91	123	1.15	0.82-1.62	0.397	40	36	1.84	1.03-3.30	0.027	40	91	1.40	0.89-2.21	0.127	40	91	1.40	0.89-2.21	0.127				
		GC	226	207	0.79	0.60-1.03	0.068	141	157	0.84	0.61-1.15	0.253	85	41	0.69	0.40-1.18	0.148	85	141	0.87	0.58-1.29	0.465	85	141	0.87	0.58-1.29	0.465				
	AIB7	CC	102	106	1.00	0.72-1.37	0.986	0.109	62	81	1.08	0.73-1.60	0.678	0.515	40	20	0.81	0.42-1.55	0.500	0.085	40	62	0.84	0.52-1.35	0.435	0.299	40	62	0.84	0.52-1.35	0.435
		CT	388	465	0.91	0.68-1.21	0.497	241	357	1.02	0.73-1.43	0.904	147	89	0.88	0.48-1.68	0.680	147	241	0.62	0.39-1.01	0.042	147	241	0.62	0.39-1.01	0.042				
	DOR5	TT	108	141	1.08	0.81-1.45	0.578	79	112	0.95	0.67-1.34	0.762	0.824	29	20	1.14	0.58-2.22	0.688	0.918	29	79	1.66	1.01-2.74	0.034	29	79	1.66	1.01-2.74	0.034		
		CC	83	81	0.85	0.60-1.21	0.350	54	61	0.79	0.52-1.21	0.258	29	17	1.16	0.57-2.37	0.653	29	54	1.10	0.65-1.87	0.689	29	54	1.10	0.65-1.87	0.689				
	DOR1	CT	205	231	1.02	0.79-1.32	0.880	126	177	1.05	0.76-1.43	0.773	0.519	79	37	0.84	0.48-1.45	0.498	0.782	79	126	0.87	0.59-1.30	0.489	79	126	0.87	0.59-1.30	0.489		
		TT	174	203	1.08	0.82-1.41	0.574	0.627	112	162	1.09	0.79-1.51	0.569	0.519	62	34	1.10	0.62-1.93	0.733	0.782	62	112	1.08	0.72-1.63	0.687	62	112	1.08	0.72-1.63	0.687	
AIB6	G	445	496	0.89	0.74-1.07	0.214	306	386	0.89	0.71-1.11	0.282	139	82	0.76	0.52-1.12	0.143	139	306	1.15	0.85-1.54	0.340	139	306	1.15	0.85-1.54	0.340					
	C	429	536	1.12	0.93-1.35	0.214	282	400	1.12	0.90-1.40	0.282	147	114	1.31	0.90-1.93	0.143	147	282	0.87	0.65-1.17	0.340	147	282	0.87	0.65-1.17	0.340					
AIB1	G	575	432	1.02	0.84-1.24	0.848	373	353	1.01	0.80-1.28	0.937	202	64	1.03	0.65-1.63	0.882	202	373	1.08	0.82-1.42	0.579	202	373	1.08	0.82-1.42	0.579					
	C	407	300	0.98	0.80-1.20	0.848	257	241	0.99	0.78-1.25	0.937	150	46	0.97	0.61-1.53	0.882	150	257	0.93	0.71-1.22	0.579	150	257	0.93	0.71-1.22	0.579					
AIB7	G	488	537	1.13	0.94-1.36	0.190	323	403	1.04	0.83-1.30	0.749	165	113	1.40	0.96-2.03	0.068	165	323	1.22	0.92-1.61	0.151	165	323	1.22	0.92-1.61	0.151					
	C	430	419	0.89	0.74-1.07	0.190	265	319	0.96	0.77-1.21	0.749	165	81	0.72	0.49-1.04	0.068	165	265	0.82	0.62-1.08	0.151	165	265	0.82	0.62-1.08	0.151					
AIB7	T	124	165	1.10	0.85-1.42	0.461	89	132	1.01	0.75-1.36	0.961	323	198	0.89	0.50-1.60	0.689	323	561	0.68	0.44-1.05	0.070	323	561	0.68	0.44-1.05	0.070					
	C	371	393	0.92	0.76-1.11	0.461	234	299	0.89	0.71-1.12	0.961	137	71	1.00	0.68-1.48	0.689	137	234	0.99	0.75-1.31	0.070	137	234	0.99	0.75-1.31	0.070					
AIB7	T	553	637	1.09	0.90-1.31	0.367	350	501	1.12	0.89-1.40	0.309	203	105	1.00	0.68-1.47	0.992	203	350	1.01	0.76-1.34	0.946	203	350	1.01	0.76-1.34	0.946					

Taula 32. Anàlisi estadística de la distribució de genotips i al·lels dels polimorfismes DOR i AIB entre diferents grups. a) Genotips b) Al·lels. Es mostren els valors del odds ratio de les comparacions (OR), els intervals de confiança dels OR (CI), i la p corresponent a un test Xi-quadrat. Els obesos mòrbids no s'inclouen en l'anàlisi.

Referències

Referències

1. Albagha, O. M., McGuigan, F. E., Reid, D. M., and Ralston, S. H. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J Bone Miner. Res.* 16, 128-134 (2001)
2. Alwine, J. C. Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins. *Mol Cell Biol.* 5, 1034-1042 (1985)
3. Antonson, P., Al Beidh, F., Matthews, J., and Gustafsson, J. A. The human RAP250 gene: genomic structure and promoter analysis. *Gene.* 327, 233-238 (2004)
4. Antonson, P., Schuster, G. U., Wang, L., Rozell, B., Holter, E., Flodby, P., Treuter, E., Holmgren, L., and Gustafsson, J. A. Inactivation of the nuclear receptor coactivator RAP250 in mice results in placental vascular dysfunction. *Mol Cell Biol.* 23, 1260-1268 (2003)
5. Ausubel <Editor>, Frederick M. Current Protocols in Molecular Biology. *John/Wiley & Sons, Inc.* (2001)
6. Bach, Daniel. Tesi Doctoral: Identificació d'un nou gen d'obesitat i d'altres gens amb expressió alterada en situacions de resistència a la insulina. *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.Facultat de Biologia.Universitat de Barcelona* (2001)
7. Becker, N., Nieters, A., and Rittgen, W. Single nucleotide polymorphism--disease relationships: statistical issues for the performance of association studies. *Mutat.Res.* 525, 11-18 (2003)
8. Caira, F., Antonson, P., Pelto-Huikko, M., Treuter, E., and Gustafsson, J. A. Cloning and characterization of RAP250, a novel nuclear receptor coactivator. *J Biol.Chem.* 275, 5308-5317 (2000)
9. Cardon, L. R. and Bell, J. I. Association study designs for complex diseases. *Nat.Rev.Genet.* 2, 91-99 (2001)
10. Chang, Ching yi, Norris, John D., Gron, Hanne, Paige, Lisa A., Hamilton, Paul T., Kenan, Daniel J., Fowlkes, Dana, and McDonnell, Donald P. Dissection of the LXXLL Nuclear Receptor-Coactivator Interaction Motif Using Combinatorial Peptide Libraries: Discovery of Peptide Antagonists of Estrogen Receptors alpha and beta. *Molecular and Cellular Biology.* 19, 8226-8239 (1999)
11. Dean, L and McEntyre, J. R. The genetic landscape of Diabetes. *National Library of Medicine (US) NCBI.Disponible a Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>* (2004)
12. Dempster, A. P., Laird, N. M., and Rubin, D. B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J Roy Statist Soc.* 39, 1-38 (1977)
13. Ek, J., Andersen, G., Urhammer, S. A., Gaede, P. H., Drivsholm, T., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., and Pedersen, O. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated

- receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 44, 2220-2226 (2001)
14. Glazier, Anne M., Nadeau, Joseph H., and Aitman, Timothy J. Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Science*. 298, 2345-2349 (2002)
15. Goldstein, D. B. Islands of linkage disequilibrium. *Nat Genet*. 29, 109-111 (2001)
16. Goo, Y. H., Na, S. Y., Zhang, H., Xu, J., Hong, S., Cheong, J., Lee, S. K., and Lee, J. W. Interactions between activating signal cointegrator-2 and the tumor suppressor retinoblastoma in androgen receptor transactivation. *J Biol.Chem*. 279, 7131-7135 (2004)
17. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen.Virol*. 36, 59-74 (1977)
18. Grant, S. F., Reid, D. M., Blake, G., Herd, R., Fogelman, I., and Ralston, S. H. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat.Genet*. 14, 203-205 (1996)
19. Guan, X. Y., Xu, J., Anzick, S. L., Zhang, H., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. Hybrid selection of transcribed sequences from microdissected DNA: isolation of genes within amplified region at 20q11-q13.2 in breast cancer. *Cancer Res*. 56, 3446-3450 (1996)
20. Gueguen, R., Jouanny, P., Guillemin, F., Kuntz, C., Pourel, J., and Siest, G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner.Res*. 10, 2017-2022 (1995)
21. Hohaus, S., Petrovick, M. S., Voso, M. T., Sun, Z., Zhang, D. E., and Tenen, D. G. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*. 15, 5830-5845 (1995)
22. Hong, S., Choi, H. M., Park, M. J., Kim, Y. H., Choi, Y. H., Kim, H. H., Choi, Y. H., and Cheong, J. Activation and interaction of ATF2 with the coactivator ASC-2 are responsive for granulocytic differentiation by retinoic acid. *J Biol.Chem*. 279, 16996-17003 (2004a)
23. Hong, S., Kim, S. H., Heo, M. A., Choi, Y. H., Park, M. J., Yoo, M. A., Kim, H. D., Kang, H. S., and Cheong, J. Coactivator ASC-2 mediates heat shock factor 1-mediated transactivation dependent on heat shock. *FEBS Lett*. 559, 165-170 (2004b)
24. Hong, S., Lee, M. Y., and Cheong, J. Functional interaction of transcriptional coactivator ASC-2 and C/EBPalpha in granulocyte differentiation of HL-60 promyelocytic cell. *Biochem.Biophys.Res Commun*. 282, 1257-1262 (2001)
25. Ioannidis, J. P., Ntzani, E. E., Trikalinos, T. A., and Contopoulos-Ioannidis, D. G. Replication validity of genetic association studies. *Nat.Genet*. 29, 306-309 (2001)

26. Johnson, G. C., Esposito, L., Barratt, B. J., Smith, A. N., Heward, J., Di Genova, G., Ueda, H., Cordell, H. J., Eaves, I. A., Dudbridge, F., Twells, R. C., Payne, F., Hughes, W., Nutland, S., Stevens, H., Carr, P., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Gough, S. C., Clayton, D. G., and Todd, J. A. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat.Genet.* 29, 233-237 (2001)
27. Kim, S. W., Cheong, C., Sohn, Y. C., Goo, Y. H., Oh, W. J., Park, J. H., Joe, S. Y., Kang, H. S., Kim, D. K., Kee, C., Lee, J. W., and Lee, H. W. Multiple developmental defects derived from impaired recruitment of ASC-2 to nuclear receptors in mice: implication for posterior lenticonus with cataract. *Mol Cell Biol.* 22, 8409-8414 (2002)
28. Kim, S. W., Park, K., Kwak, E., Choi, E., Lee, S., Ham, J., Kang, H., Kim, J. M., Hwang, S. Y., Kong, Y. Y., Lee, K., and Lee, J. W. Activating signal cointegrator 2 required for liver lipid metabolism mediated by liver X receptors in mice. *Mol Cell Biol.* 23, 3583-3592 (2003)
29. Ko, L., Cardona, G. R., and Chin, W. W. Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97, 6212-6217 (2000)
30. Ko, L. and Chin, W. W. Nuclear receptor coactivator thyroid hormone receptor-binding protein (TRBP) interacts with and stimulates its associated DNA-dependent protein kinase. *J Biol.Chem.* 278, 11471-11479 (2003)
31. Kong, H. J., Yu, H. J., Hong, S., Park, M. J., Choi, Y. H., An, W. G., Lee, J. W., and Cheong, J. Interaction and functional cooperation of the cancer-amplified transcriptional coactivator activating signal cointegrator-2 and E2F-1 in cell proliferation. *Mol Cancer Res.* 1, 948-958 (2003)
32. Krall, E. A. and Dawson-Hughes, B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner.Res.* 8, 1-9 (1993)
33. Kruglyak, L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat.Genet.* 22, 139-144 (1999)
34. Kuang, S. Q., Liao, L., Zhang, H., Pereira, F. A., Yuan, Y., DeMayo, F. J., Ko, L., and Xu, J. Deletion of the cancer-amplified coactivator AIB3 results in defective placentation and embryonic lethality. *J Biol.Chem.* 277, 45356-45360 (2002)
35. Lee, S. K., Anzick, S. L., Choi, J. E., Bubendorf, L., Guan, X. Y., Jung, Y. K., Kallioniemi, O. P., Kononen, J., Trent, J. M., Azorsa, D., Jhun, B. H., Cheong, J. H., Lee, Y. C., Meltzer, P. S., and Lee, J. W. A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo. *J Biol.Chem.* 274, 34283-34293 (1999)
36. Lee, S. K., Jung, S. Y., Kim, Y. S., Na, S. Y., Lee, Y. C., and Lee, J. W. Two distinct nuclear receptor-interaction domains and CREB-binding protein-dependent transactivation function of activating signal cointegrator-2. *Molecular Endocrinology.* 15, 241-254 (2001)

37. Lee, S. K., Na, S. Y., Jung, S. Y., Choi, J. E., Jhun, B. H., Cheong, J., Meltzer, P. S., Lee, Y. C., and Lee, J. W. Activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor as novel target molecules of the cancer-amplified transcription coactivator ASC-2. *Molecular Endocrinology*. 14, 915-925 (2000)
38. Lewontin, R. C. The interaction of selection and linkage. I General considerations: heterotic models. *Genetics*. 49, 49-67 (1964)
39. Liu, Y. Z., Liu, Y. J., Recker, R. R., and Deng, H. W. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J.Endocrinol*. 177, 147-196 (2003)
40. Mahajan, M. A., Das, S., Zhu, H., Tomic-Canic, M., and Samuels, H. H. The nuclear hormone receptor coactivator NRC is a pleiotropic modulator affecting growth, development, apoptosis, reproduction, and wound repair. *Mol Cell Biol*. 24, 4994-5004 (2004)
41. Mahajan, M. A., Murray, A., and Samuels, H. H. NRC-interacting factor 1 is a novel cotransducer that interacts with and regulates the activity of the nuclear hormone receptor coactivator NRC. *Mol Cell Biol*. 22, 6883-6894 (2002)
42. Mahajan, M. A. and Samuels, H. H. A new family of nuclear receptor coregulators that integrate nuclear receptor signaling through CREB-binding protein. *Mol Cell Biol*. 20, 5048-5063 (2000)
43. Mann, V, Hobson, EE, Li, B, Stewart, TL, Grant, SF, Robins, SP, Aspden, RM, and Ralston, SH. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest*. 107, 899-907 (2001)
44. McCarthy, M. I. Susceptibility gene discovery for common metabolic and endocrine traits. *J.Mol Endocrinol*. 28, 1-17 (2002)
45. McCarthy, M. I. Progress in defining the molecular basis of type 2 diabetes mellitus through susceptibility-gene identification. *Hum.Mol Genet*. 13 Spec No 1, R33-R41 (2004)
46. Peltonen, Leena and McKusick, Victor A. GENOMICS AND MEDICINE: Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era. *Science*. 291, 1224-1229 (2001)
47. Qi, C., Kashireddy, P., Zhu, Y. T., Rao, S. M., and Zhu, Y. J. Null mutation of peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein in mammary glands causes defective mammapoiesis. *J Biol.Chem*. 279, 33696-33701 (2004)
48. Qi, C., Surapureddi, S., Zhu, Y. J., Yu, S., Kashireddy, P., Rao, M. S., and Reddy, J. K. Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma)-interacting protein, is required for PPARGgamma-mediated adipogenesis. *J Biol.Chem*. 278, 25281-25284 (2003)
49. Rewers, Marian and Hamman, Richard F. Diabetes in America, 2nd Edition. *National Diabetes Data Group (NIDDKD-NIH) Disponible a Internet: <http://diabetes-in-america.s-3.com/Default.htm>*. Chapter 9, 179-220 (1995)

50. Reynolds, Angela, Leake, Devin, Boese, Queta, Scaringe, Stephen, Marshall, William S., and Khvorova, Anastasia. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotech.* 22, 326-330 (2004)
51. Risch, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 405, 847-856 (2000)
52. Robinson <Editor>, J. Paul. Current protocols in cytometry. *John/Wiley & Sons, Inc.* (2002)
53. Saltiel, Alan R. New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell.* 104, 517-529 (2001)
54. Sambrook, Joseph and Russell, David W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. (1998)
55. Shuman, J. D., Cheong, J., and Coligan, J. E. ATF-2 and C/EBPalpha can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation. *J Biol.Chem.* 272, 12793-12800 (1997)
56. Sohn, Y. C., Kwak, E., Na, Y., Lee, J. W., and Lee, S. K. Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77. *J Biol.Chem.* 276, 43734-43739 (2001)
57. Steffen <Editor>, Cornelia. PCR Applications Manual. 2nd Edition. *Roche Molecular Biochemicals* (1999)
58. Strachan, T and Read, A. Human Molecular Genetics, 2nd edition. Chapter 11, 271 (1999)
59. Stumvoll, M. and Haring, H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes.* 51, 2341-2347 (2002)
60. Tabor, H. K., Risch, N. J., and Myers, R. M. Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat.Rev.Genet.* 3, 391-397 (2002)
61. Toresson, G., Schuster, G. U., Steffensen, K. R., Bengtsson, M., Ljunggren, J., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J. A. Purification of functional full-length liver X receptor beta produced in Escherichia coli. *Protein Expr.Purif.* 35, 190-198 (2004)
62. U.S.Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 4th Edition. *US Government Printing Office - Disponible a Internet: <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm>* (1999)
63. Watanabe, R. M., Valle, T., Hauser, E. R., Ghosh, S., Eriksson, J., Kohtamaki, K., Ehnholm, C., Tuomilehto, J., Collins, F. S., Bergman, R. N., and Boehnke, M. Familiality of quantitative metabolic traits in Finnish families with non-insulin-

dependent diabetes mellitus. Finland-United States Investigation of NIDDM Genetics (FUSION) Study investigators. *Hum.Hered.* 49, 159-168 (1999)

64. Weel, A. E., Uitterlinden, A. G., Westendorp, I. C., Burger, H., Schuit, S. C., Hofman, A., Helmerhorst, T. J., van Leeuwen, J. P., and Pols, H. A. Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 3146-3150 (1999)

65. Zhang, D. E., Zhang, P., Wang, N. D., Hetherington, C. J., Darlington, G. J., and Tenen, D. G. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 569-574 (1997)

66. Zhang, H., Liao, L., Kuang, S. Q., and Xu, J. Spatial distribution of the messenger ribonucleic acid and protein of the nuclear receptor coactivator, amplified in breast cancer-3, in mice. *Endocrinology.* 144, 1435-1443 (2003)

67. Zhu, Y., Kan, L., Qi, C., Kanwar, Y. S., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., and Reddy, J. K. Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR. *J Biol.Chem.* 275, 13510-13516 (2000)

68. Zhu, Y. J., Crawford, S. E., Stellmach, V., Dwivedi, R. S., Rao, M. S., Gonzalez, F. J., Qi, C., and Reddy, J. K. Coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein, is a modulator of placental, cardiac, hepatic, and embryonic development. *J Biol.Chem.* 278, 1986-1990 (2003)