

CARACTERITZACIÓ DEL GEN GAS6 i
ASSOCIACIÓ AMB MALALTIES
HUMANES

Xavier Muñoz i Miralles

Caracterització del gen *GAS6* i associació amb malalties humanes

Memòria presentada per
Xavier Muñoz i Miralles

per optar al grau de **Doctor en Biologia**
per la Universitat de Barcelona

Aquest treball s'ha realitzat sota la direcció de la Dra. **Núria Sala i Serra**, al Centre de Genètica Mèdica i Molecular (CGMM) de l'Institut de Recerca Oncològica (IRO) - IDIBELL i del Dr. **Pablo García de Frutos** del departament de Recerca Neurològica i Vascular de l'Institut per la recerca Biomèdica de Barcelona, IIBB-CSIC-IDIBAPS.

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona. Programa de Genètica (bienni 1998-2000)

Tutora: Dra. **Lluïsa Vilageliu i Arqués**

Dra. Núria Sala i Serra

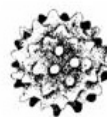
Dr. Pablo García de Frutos

Dra. Lluïsa Vilageliu i Arqués

Xavier Muñoz i Miralles



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INSTITUT DE RECERCA ONCOLÒGICA - IRO



CENTRE DE
GENÈTICA
MÈDICA I
MOLECULAR

Com ja sabeu tots el que em coneixeu bé, sóc de poques paraules... però faré un esforç!

Haig d'agrair a moltíssima gent que m'ha acompanyat al llarg d'aquests anys per poder escriure finalment aquesta tesi:

Moltes gràcies, Núria, perquè em vas donar l'oportunitat de formar part del teu grup de recerca i guiar-me en tots els èxits i semièxits d'aquests darrers anys i sobretot per involucrar-me de ple a l'ambient investigador.

Gràcies Pablo per orientar el meu treball i poder realitzar aquesta tesi doctoral també sota la teva eficaç direcció.

Gràcies a tots els companys de grup que han aguantat estoicament la meva companyia. I no puc oblidar la resta de companys de l'IRO amb qui he passat molt bones estones de feina i lleure ...

Gràcies també a l'Eva per la seva amstat i per la seva implacable correcció de la tesi.

I, sobretot, gràcies a la tota meva família per suportar-me tant en els moments de desesperació com en els d'alegria.

A l'Olga

*"S'ouen ja els tabals i les gralles
Ja s'obiren els Xiquets!
Plam, ra-ta-pataplam plam!
Nan nan narat narat na!
Fan castells pujats per sota
i torrots de cinc pilars;
alcen torres de set pisos
i movibles espadats
Quina gatzara, quina delícia
al poble causen els braus Xiquets,
quan fan alarde de llur perícia,
força, equilibri, valor i seny!"*

Josep Anselm Clavé

"Els petits canvis són poderosos!"

El Capità Enciam

ÍNDEX

ÍNDEX.....	1
ABREVIATURES i SÍMBOLS.....	5
PRESENTACIÓ	7
1. INTRODUCCIÓ.....	11
1.1. Proteïnes dependents de la vitamina K.....	15
1.1.1. Síntesi de les proteïnes dependents de la vitamina K.....	16
1.1.2. La Vitamina K.....	17
1.1.3. El Factor VII	19
1.1.4. El Factor X	19
1.1.5. La Proteïna Z.....	20
1.1.6. La Proteïna S.....	21
1.2. <i>GAS6 (growth arrested specific gene 6)</i>	23
1.2.1. Identificació de la proteïna Gas6.....	23
1.2.2. Estructura de Gas6.....	23
1.2.3. Identificació del gen <i>GAS6</i>	25
1.2.4. Expressió de Gas6.....	26
1.2.5. Gas6 com a lligand de receptors tirosina quinasa	26
1.2.5.1. Estructura dels receptors TK TAM.....	27
1.2.5.2. Senyalització cel·lular per la unió de la Gas6 als receptors TAM.....	29
1.2.5.3. Altres funcions cel·lulars de Gas6.....	30
1.2.6. Gas6/AXL a l'endoteli vascular	32
1.3. Models animals de <i>GAS6</i>	33
1.3.1. Model d'aterotrombosi.	33
1.3.2. Model de nefropatia.....	33
1.3.3. Model animal deficient pels receptors TAM	34
1.4. LA PATOLOGIA VASCULAR COM MALALTIA COMPLEXA	37
1.4.1. MALALTIES COMPLEXES.....	37
1.4.2. L'HEMOSTÀSIA i la TROMBOSI	39
1.4.2.1. L'hemostàsia primària	39
1.4.2.2. La coagulació	41
1.4.2.3. La inhibició natural de la coagulació.....	43
1.4.2.4. La fibrinòlisi	44
1.4.3. L'ATEROSCLEROSI	45

1.4.4. LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA.....	47
1.4.5. LA MALALTIA CEREBROVASCULAR	49
2. OBJECTIUS	53
3. MATERIALS I MÈTODES	57
3.1. EINES BIOINFORMÀTIQUES.....	59
3.1.1. Bases de dades	59
3.1.2. Anàlisi de seqüències	61
3.1.3. Anàlisis filogenètiques	63
3.2. Pacients i controls	65
3.3. Mètodes d'extracció d'àcids nucleics	69
3.3.1. Extracció de DNA genòmic	69
3.3.2. Extracció de DNA i RNA de teixit d'artèria coronària.....	70
3.3.3. Quantificació i determinació de la quantitat dels àcids nucleics extrets (DNA i RNA)	71
3.4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	73
3.5. Seqüenciació del DNA.....	77
3.6. Electroforesi	79
3.6.1. Electroforesi en gels d'agarosa	79
3.6.2. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa	80
3.6.3. Electroforesi en gels de poliacrilamida	80
3.7. Anàlisi de SSCP	83
3.8. Anàlisi dels polimorfismes	85
3.8.1. Anàlisi de polimorfismes a <i>GAS6</i>	85
3.8.1.1. Digestió amb enzims de restricció	85
3.8.1.2. Anàlisi de polimorfismes amb QF-PCR (LightCycler®). 87	
3.8.1.3. Anàlisi del polimorfisme c.600+304-377del de l'intró 5 del <i>GAS6</i>	91
3.8.2. Anàlisi d'altres polimorfismes	91
3.8.2.1. Anàlisi del polimorfisme de <i>PROZ</i>	91
3.8.2.2. Anàlisi del microsatèl·lit D13S285 lligat a <i>F10</i> i <i>F7</i>	92
3.9. Anàlisi d'expressió del mRNA de <i>GAS6</i>	93
3.9.1. Transcripció inversa	93
3.9.2. RT-PCR a temps real.....	95
3.10. Anàlisis estadístiques	101
3.10.1. Estudis d'associació.....	101
3.10.2. Anàlisi de desequilibri de lligament.....	102

3.10.3. Anàlisi dels possibles haplotips determinats pels SNP de <i>GAS6</i>	103
4. RESULTATS	105
4.1. Caracterització de <i>GAS6</i>	107
4.1.1. Determinació de l'estructura gènica	107
4.1.2. Anàlisi de predicció de seqüències promotores.....	113
4.2. Relació entre <i>GAS6</i> i altres gens humans de proteïnes dependents de la vitamina K.....	117
4.3. Identificació del <i>gas6</i> d'altres espècies.....	119
4.4. Variabilitat al gen <i>GAS6</i>	123
4.4.1. Detecció i caracterització de variants	123
4.4.2. Anàlisi dels SSCP per identificar variants	123
4.5. Associació entre polimorfismes del <i>GAS6</i> i la malaltia aterotrombòtica: estudis en diferents poblacions	131
4.5.1. Estudi en malaltia aterotrombòtica	131
4.5.2. Estudi en malaltia cerebrovascular.....	135
4.5.2.1. Anàlisi dels polimorfismes del gen <i>GAS6</i>	135
4.5.2.2. Anàlisi d'altres polimorfismes en gens candidats de la regió 13q34	143
4.5.2.3. Anàlisi del LD entre polimorfismes de <i>GAS6</i> , <i>PROZ</i> i <i>F10/F7</i>	147
4.5.2.4. Anàlisi d'haplotips del gen <i>GAS6</i>	151
4.5.3. Estudi en altres poblacions	153
4.6. SNP i haplotips al projecte HapMap	157
4.7. Estudis funcionals	159
4.7.1. Prediccions <i>online</i>	159
4.7.2. Anàlisi de variants de <i>splicing</i>	161
4.7.3. Estudis del mRNA.....	161
5. DISCUSSIÓ	169
6. CONCLUSIONS	185
7. BIBLIOGRAFIA.....	189
Índex de Figures.....	201
Índex de Taules.....	205
APÈNDIX	211

ABREVIATURES I SÍMBOLS

A:	Adenina
AIT:	Accident isquèmic transitori (en anglès TIA)
Ala:	Alanina (A)
Arg:	Arginina (R)
APC:	Proteïna C activada
Asn:	Asparragina (N)
Asp:	Àcid aspàrtic (D)
ATER:	Ictus isquèmic d'origen ateroscleròtic
B2M:	β 2-microglobulina
C:	Citosina
CAI:	Cardiopatia isquèmica
CEMB:	Ictus isquèmic d'origen cardioembòlic
CML:	Cèl·lules musculars llises
DNA:	Àcid desoxirribonucleic
EGF:	(de l'anglès <i>Epidermal Growth Factor</i>) Factor de creixement epidèrmic
G:	Guanina
GAPDH:	Gliceraldèhid 3-fosfat deshidrogenasa.
GAS6:	(de l'anglès <i>growth arrest specific gene 6</i>) Gen específic d'aturada del creixement 6
Gla:	Àcid γ -carboxiglutàmic
Gln:	Glutamina (Q)
Glu:	Àcid glutàmic (E)
H ₂ Od:	Aigua destil·lada
ICTUS:	(del llatí, ' <i>atac greu</i> ') Accident cerebrovascular
IH:	Ictus hemorràgic
Ile:	Isoleucina (I)
IAM:	Infart agut de miocardi
IVS:	(de l'anglès <i>Intervening Sequence</i>) Seqüència entre els exons
Kb, pb:	Kilobase, parells de bases
LLAC:	Ictus isquèmic llacunar
Leu:	Leucina (L)
LD:	(de l'anglès <i>Linkage Disequilibrium</i>) Desequilibri de lligament
LDL:	(de l'anglès <i>Low Density Lipoproteins</i>) Lipoproteïnes de baixa densitat
Lys:	Lisina (K)
Met:	Metionina (M)
mRNA:	RNA missatger
OR:	(de l'anglès <i>Odds ratio</i>) Raons de probabilitat
P:	(de l'anglès <i>p-value</i>) Valor de probabilitat d'error α

PC:	Proteïna C
PCR:	(de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reacció en cadena de la polimerasa
Phe:	Fenilalanina (F)
PIP ₂ :	Fosfatidil inositol-4,5-bifosfat
PIP ₃ :	Fosfatidil inositol-1,4,5-trifosfat
PLC:	Fosfolipasa C
PROS1:	Gen de la PS
PROZ:	Gen de la PZ
PS:	Proteïna S
PZ:	Proteïna Z
RNA:	Àcid ribonucleic
RTK:	Receptor Tirosina Quinasa
Ser:	Serina (S)
SHBG:	(de l'anglès <i>Steroid Hormone Binding Globulin</i>) Regió globulina d'unió a hormones esteroidees
SNP:	(de l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>) Polimorfisme d'un sol nucleòtid
<i>Splicing</i> :	Paraula anglesa comunment utilitzada per descriure l'efecte d'entollar.
SSCP:	(de l'anglès <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>) Polimorfisme de conformació de la cadena senzilla
T:	Timina
TAM:	Receptors TYRO3, AXL i MERTK
TF:	(de l'anglès <i>tissue factor</i>) Factor tissular
Thr:	Treonina (T)
Tm:	(de l'anglès <i>melting temperature</i>) Temperatura de fusió
TSR:	(de l'anglès <i>Trombin sensitive region</i>) Regió sensible a la trombina
UTR:	(de l'anglès <i>Untranslated region</i>) Regió no traduïda però transcrita
VKOR:	Vitamina K epòxid reductasa
VSMC:	(de l'anglès <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>) Cèl·lules musculars llises de la vasculatura
X:	Codó de finalització de la traducció (STOP)
χ^2 :	Prova estadística Chi quadrat

PRESENTACIÓ

El treball que es presenta a continuació és una contribució als estudis de diversitat del genoma humà mitjançant la caracterització del gen *GAS6* i l'anàlisi de la seva variació al·lèlica i l'associació a diferents malalties humanes i, més específicament, a la malaltia aterotrombòtica i l'accident cerebrovascular que són de les malalties més freqüents a la societat occidental.

L'estudi també presenta una aproximació filogenètica del gen *GAS6* en diferents espècies, així com una aproximació amb altres proteïnes dependents de la vitamina K que presenten una alta homologia de seqüència.

1. INTRODUCCIÓ

El grup de Trombosi del CGMM de l'IRO-IDIBELL tradicionalment ha estat treballant en l'estudi dels factors genètics de risc trombòtic entre els quals són de destacar els dèficits hereditaris de les proteïnes anticoagulants, proteïna C i proteïna S.

D'aquesta manera, tenint en compte que la proteïna Gas6 era estructuralment semblant a la proteïna S i que podia tenir alguna funció en mecanismes que determinen trombosi com són l'hemostàsia i la inflamació, es va decidir estudiar els aspectes genètics del gen que codifica el Gas6.

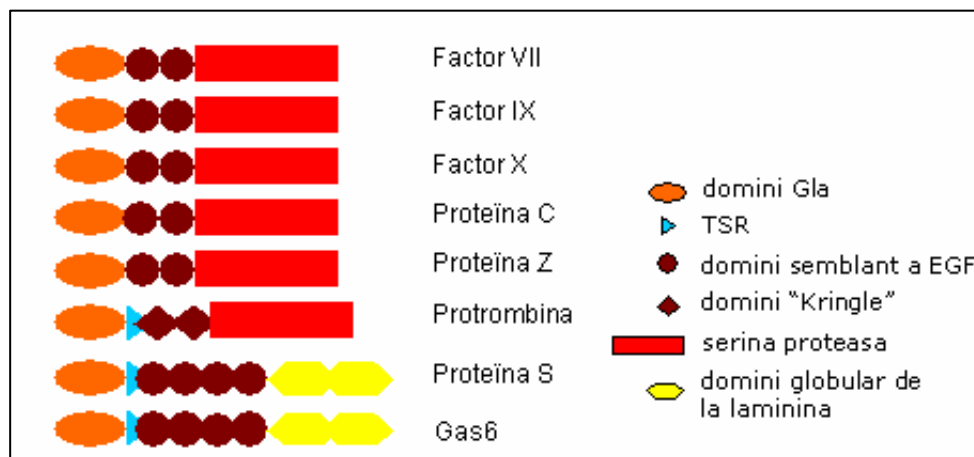
La introducció que es presenta a continuació té la finalitat d'ubicar el gen *GAS6* i la proteïna que se'n deriva dins del context de la família de proteïnes dependents de la vitamina K, així com en l'àmbit de les malalties on s'hi ha descrit una implicació, concretament en les malalties complexes on s'observa un augment en la proliferació cel·lular: aterotrombosi, nefritis crònica, artritis reumatoide, càncer, ...

1.1. Proteïnes dependents de la vitamina K

Les proteïnes dependents de la vitamina K (**FIGURA 1**) són proteïnes caracteritzades per la presència d'un domini Gla (àcid γ -carboxiglutàmic) a la regió N-terminal. Necessiten la vitamina K per catalitzar la transformació dels residus d'àcid glutàmic (Glu) a residus Gla (**FIGURA 2**). Els residus Gla d'aquestes proteïnes tenen una gran afinitat per ions Ca^{2+} i resulten essencials per la interacció d'aquestes proteïnes amb les membranes fosfolipídiques de les cèl·lules activades que estaran carregades negativament als llocs on hi ha hagut una lesió vascular (Bouchard et al. 1999).

FIGURA 1

Família de proteïnes dependents de la vitamina K a l'hemostàsia.



En els vertebrats, poden ser dividides en dos grups: un primer grup de proteïnes està caracteritzat per la presència de 3 o 5 residus Gla a la zona N-terminal i inclou la proteïna de teixit ossi (osteocalcina) i la proteïna de la matriu amb domini Gla (MGP). Aquestes proteïnes són requerides per la regulació del creixement ossi i la calcificació extraòssia (Furie et al. 1999). Les proteïnes de l'altre grup estan implicades en la cascada de la coagulació (**FIGURA 10, PÀGINA 42**) i també tenen un domini Gla amino terminal, que és un mòdul proteic d'aproximadament 45 aminoàcids amb uns 9 a 12 residus Gla.

En aquest treball ens centrarem principalment en les proteïnes del segon grup.

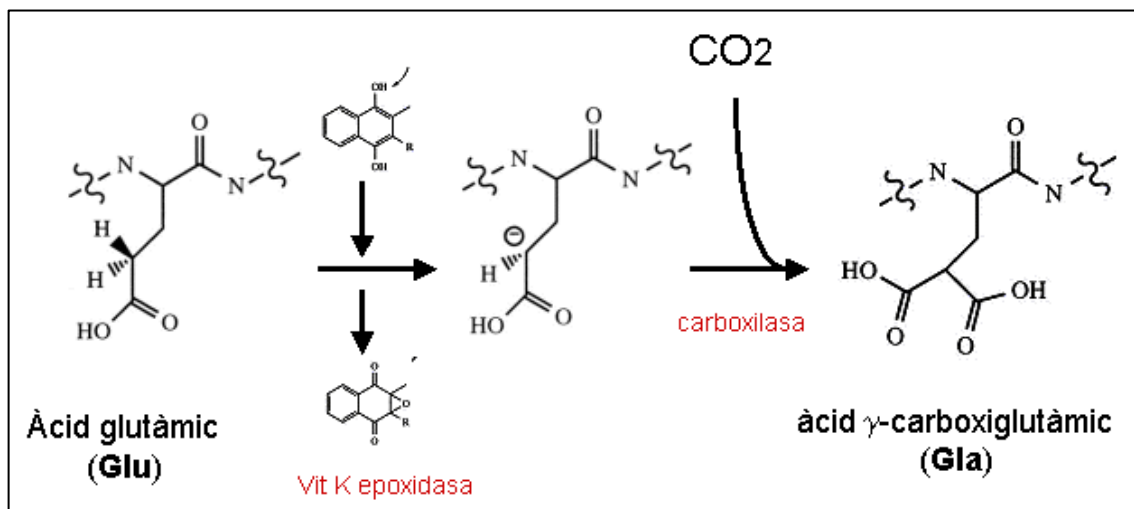
1.1.1. Síntesi de les proteïnes dependents de la vitamina K

Les proteïnes dependents de la vitamina K són sintetitzades amb un pèptid senyal a la zona N-terminal, seguit d'un domini propèptid. El pèptid senyal dirigeix la proteïna cap al reticle endoplasmàtic on aquest pèptid és alliberat. El propèptid conté un lloc de reconeixement per la iniciació de la reacció de γ -glutamylcarboxilació (**FIGURA 2**). Aquesta reacció es porta a terme a l'aparell de Golgi on el propèptid és processat per donar la proteïna madura que conté el domini Gla en la porció N-terminal de la proteïna secretada. Les proteïnes dependents de la vitamina K pateixen una sèrie de modificacions posttraduccionals comuns en totes elles: la γ -carboxilació de residus d'àcid glutàmic i la β -hidroxilació de residus Asn i Asp necessaris per desenvolupar les funcions que correspon a aquestes proteïnes (Hansson et. al. 2005).

La capacitat d'unió dels dominis Gla amb les membranes cel·lulars és important tant per accelerar les reaccions químiques que condueixen a la coagulació i formació del tap hemostàtic com per facilitar-ne la regulació mitjançant la seva localització a les zones de lesió tissular (McDonald et al. 1997).

FIGURA 2

γ -carboxilació de l'àcid glutàmic, (en **vermell** els enzims que actuen en aquesta reacció).



Membres d'aquesta classe de proteïnes Gla inclouen alguns dels factors (zimògens de serina proteasa) responsables de la coagulació de la sang: protrombina (o factor II), factor VII, factor IX i factor X de la coagulació; i els seus inhibidors i reguladors: Proteïna Z (PZ), Proteïna C (PC) i Proteïna S (PS) (**FIGURA 1**).

La darrera addició a aquesta família de proteïnes és GAS6, un lligand per receptors tirosina quinasa i que és la proteïna codificada pel gen que hem estudiat en aquest treball.

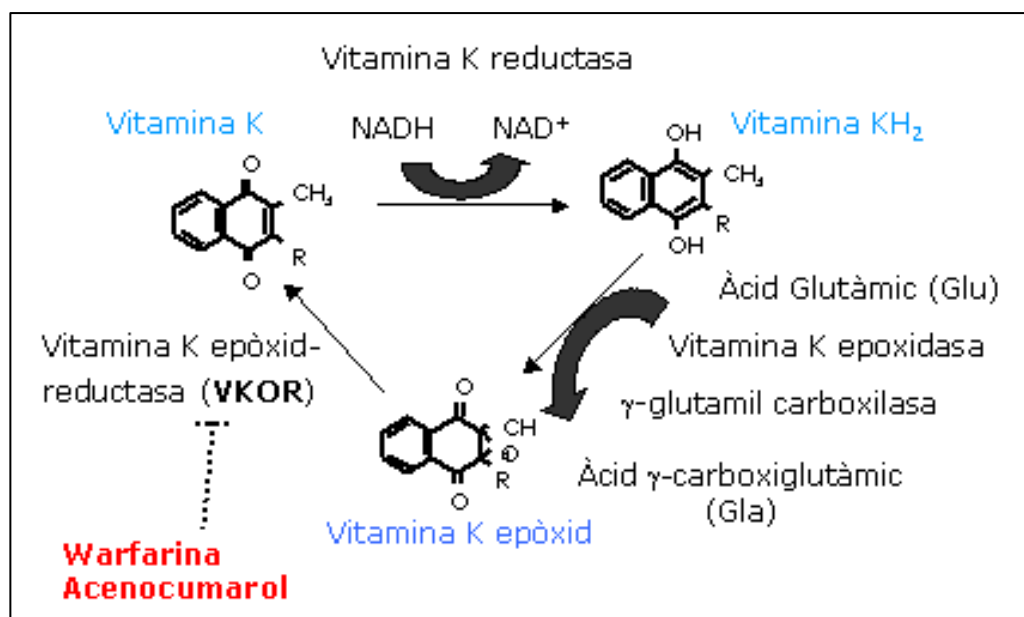
1.1.2. La Vitamina K

La vitamina K, anomenada així per *koagulation* (del danès), és un cofactor essencial en la conversió posttraduccional dels residus d'àcid glutàmic a residus Gla durant la biosíntesi de proteïnes dependents de la vitamina K. Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim γ -glutamil carboxilasa i té lloc a la llum del reticle endoplasmàtic.

La majoria de les mutacions relacionades amb la trombosi venosa produeixen deficiències en aquestes proteïnes dependents de vitamina K (PS, PC, protrombina) o en els seus substrats (resistència a PC activada). El tractament d'aquestes malalties trombòtiques està ben establert: consisteix en usar fàrmacs que imiten la vitamina K però que no tenen la seva activitat cofactora (fàrmacs cumarínics, com la warfarina i l'acenocumarol (SINTROM[®] és el nom comercial a l'estat espanyol)). Aquests fàrmacs inhibeixen la formació de l'àcid γ -carboxiglutàmic mitjançant l'acció sobre l'enzim vitamina K epòxid reductasa (VKOR) (Li et al. 2004) i redueixen l'activitat de totes les proteïnes dependents de la vitamina K (**FIGURA 3**). Tot i que això afecta tant a proteïnes procoagulants com anticoagulants, si la dosi s'ajusta correctament, l'efecte global és una menor capacitat de coagular la sang, el que evita la formació de nous trombes.

FIGURA 3

Cicle de la vitamina K i enzims que hi intervenen, (en vermell els fàrmacs inhibidors de la reacció).



La identificació i la caracterització funcional de Gas6 ofereix la possibilitat que la vitamina K jugui un paper fisiològic important, fins ara desconegut, en altres vies metabòliques.

A continuació s'exposen les principals característiques de les proteïnes dependents de la vitamina K més rellevants per aquesta tesi i els identificadors de les quals es poden veure a la **TAULA 1**.

TAULA 1

Identificadors de les proteïnes dependents de la vitamina K.

Proteïna	OMIM	ID Proteïna	ID Gen	Ref Seq	ID Entrez	ID mRNA
Proteïna S	#176880	NP_000304	<i>PROS1</i>	AY308744	2621	NM_000313
Proteïna Z	#176895	NP_003882	<i>PROZ</i>	AF440358	8858	NM_003891
Factor VII	#227500		<i>F7</i>	AF466933	2155	
Isoforma a		NP_000122				NM_000131
Isoforma b		NP_062562				NM_019616
Factor X	#227600	NP_000495	<i>F10</i>	AF503510	2159	NM_000504
GAS6	#600441	NP_000811	<i>GAS6</i>	BK001240	2621	NM_000820

1.1.3. El Factor VII

El factor VII, és una proteïna dependent de la vitamina K codificada pel gen *F7* (localitzat a la regió 13q34, **FIGURA 5, PÀGINA 25**). Presenta dues cadenes, una de pesada i una de lleugera que seran proteolitzades a la forma activa (FVIIa). El FVIIa està implicat en l'activació de la coagulació a través de la via extrínseca (vegeu l'**APARTAT 1.4.2.2., FIGURA 10**) on hi juga un paper fonamental en la iniciació del procés atès que és una serina proteasa constitutivament activa.

Els principals estudis realitzats per tal d'establir els factors de risc per la malaltia arterial coronària ofereixen resultats controvertits respecte al paper que juguen els nivells plasmàtics de factor VII, en l'origen de diferents malalties cardiovasculars (Grant 2003).

Uns nivells plasmàtics augmentats de factor VII provocarien un estat d'hipercoagulació com a conseqüència d'una excessiva activació de la via extrínseca. Aquest fet faria que quan hi hagués un estímul procoagulant a causa de l'exposició de factor tissular al torrent sanguini com a conseqüència de la ruptura d'una placa d'ateroma, es generés una reacció procoagulant descontrolada en aquesta zona. D'aquesta manera es podria generar un trombe de gran mida que obturés l'artèria i produís isquèmia (vegeu l'**APARTAT 1.4.3.**) (Grant 2003).

Pel que fa als factors genètics, fins al moment s'ha identificat un bon nombre de polimorfismes al llarg del gen *F7* alguns al·lels dels quals estan associats amb variacions dels nivells d'activitat del FVIIa en plasma (Endler et al. 2003; Millar et al. 2000; Sabater-Lleal et al. 2006). Les associacions d'aquests polimorfismes amb els nivells plasmàtics de factor VII serien la base per explicar les associacions dels seus al·lels amb el risc de diferents malalties cardiovasculars, tot i que aquestes darreres estan menys demostrades (Soria et al. 2005).

1.1.4. El Factor X

El factor X és també una proteïna dependent de la vitamina K que està codificada pel gen *F10* localitzat a la mateixa regió cromosòmica que els gens *GAS6* i *PROZ* i molt pròxim (a 2,8 Kb) al *F7* (13q34)(**FIGURA 5, PÀGINA 25**). Presenta dues cadenes (una de pesada i una de lleugera) i s'activa a serina proteasa (FXa) mitjançant l'escissió d'un petit pèptid de la cadena pesada. La seva funció biològica és l'activació de la protrombina a trombina en el complex protrombinasa de la cascada de la coagulació (vegeu l'**APARTAT**

1.4.2.2., PÀGINA 41). El FXa hidrolitza a receptors PAR i provoca la seva activació en diferents vies de senyalització que produeixen un augment del calci intracel·lular amb l'alliberament del factor tissular, de PAI-1, d'IL-6, d'IL-8 i d'òxid nítric; expressió d'E-selectina, de l'ICAM-1, del VCAM-1 i proliferació cel·lular (Plescia et al. 1996).

Donades les diferents implicacions d'aquest factor en diferents vies s'ha estudiat bé el gen i el cDNA dels quals s'han descrit moltes variants i defectes moleculars associats amb els dèficits del factor X, els quals provoquen problemes hemorràgics per una deficiència en la coagulació (Millar et al. 2000).

1.1.5. La Proteïna Z

La Proteïna Z (PZ, OMIM#176895) és una proteïna dependent de la vitamina K que participa en el mecanisme de la coagulació i que està codificada pel gen *PROZ*, també localitzat a la regió cromosòmica 13q34 (**FIGURA 5, PÀGINA 25**). La PZ té 396 aminoàcids (360 aminoàcids a la proteïna madura secretada). Presenta una estructura molt similar als factors VII, IX i X, però al domini serina proteasa hi ha dues modificacions d'aminoàcids que inactiven el centre catalític.

La PZ regula negativament la coagulació potenciant la unió d'un determinat inhibidor, anomenat inhibidor dependent de la PZ (ZPI), al factor X activat que és inhibit (Broze 2001). Així, teòricament, tenir els nivells alts de la PZ predisposaria a sagnar, mentre que la deficiència en la PZ predisposaria a la trombosi. De fet, la deficiència en la PZ sembla tenir un paper important en la regulació de la coagulació atès que en ratolins amb fenotip protrombòtic (factor V Leiden) n'augmenta dràsticament l'efecte protrombòtic (Yin et al. 2000). No obstant, també s'ha descrit un efecte procoagulant de la PZ (Kemkes-Matthes et al. 2002) i hi ha diferents estudis clínics que mostren resultats contradictoris en l'associació entre els nivells de PZ a la sang, fenotips trombòtics i tendència a sagnar (Kemkes-Matthes et al. 1995; Martinelli et al. 2005; McQuillan et al. 2003; Vasse et al. 2001). La presència de PZ a les lesions ateroscleròtiques suggereix també un paper en el desenvolupament de la patologia ateroscleròtica (Greten et al. 1998).

Darrerament s'han realitzat una sèrie d'estudis cas-control en pacients amb isquèmia cerebral, en els que s'ha associat el polimorfisme de l'intró 6 (c.573+79 G>A) amb els nivells de la PZ al plasma (Lichy et al. 2004; Staton et al. 2005).

1.1.6. La Proteïna S

A causa de l'elevada similitud estructural que la Proteïna S (PS) té amb la proteïna GAS6 (**FIGURA 1**), és interessant introduir algunes característiques d'aquesta proteïna. Igual que GAS6 i a diferència de les altres proteïnes dependents de la vitamina K de l'hemostàsia, a la regió C-terminal la PS no hi té un domini amb activitat serina proteasa i per tant, no realitza una funció catalítica.

La PS és una glicoproteïna plasmàtica de cadena senzilla amb un pes molecular de 70 kDa i 679 aminoàcids (635 aminoàcids, la PS madura). Al plasma humà un 60-70% de la PS es troba unida a C4BP (proteïna d'unió al regulador del complement C4b). La forma lliure té activitat cofactora de la proteïna C activada (APC) en la inactivació dels factors procoagulants FVa i FVIIa (Rezende et al. 2004) (vegeu l'**APARTAT 1.4.2.3., PÀGINA 43**). La PS lliure també pot tenir una funció anticoagulant per ella mateixa, independent de l'activitat de l'APC, a través de la unió directa als factors FXa i FVa i la seva inhibició directa sobre el FXa (Heeb et al. 1994). També s'uneix al factor IXa i al factor VIIIa.

Quant a l'estructura, després del pèptid senyal a la zona N-terminal, la PS presenta un domini Gla amb 11 residus Gla, seguit d'una regió de 36 aminoàcids que presenten dos llocs amb seqüències reconegudes com a dianes de tall per l'enzim trombina (TSR, de l'anglès *thrombine sensitive region*) de la cascada de la coagulació (He et al. 1997). Després hi trobem quatre dominis semblants a EGF i una regió terminal SHBG (de l'anglès *Steroid Hormone Binding Globulin*) o domini G (globular). Les funcions d'aquests dominis estan més explicades a l'apartat de l'estructura de GAS6 (vegeu l'**APARTAT 1.2.2, PÀGINA 23**).

Aquest domini G a la PS conté el lloc d'unió a la proteïna C4BP (Villoutreix et al. 1998) i un altre que pot unir-se al receptor tirosina quinasa específic (TYRO3) quan es presenta en forma lliure al plasma (Stitt et al. 1995b). Aquesta regió també presenta un lloc d'interacció amb el factor V (Nyberg et al. 1998).

La síntesi de PS, com la majoria de factors dependents de la vitamina K, és essencialment hepàtica, tot i que també s'expressa en cèl·lules endotelials, cèl·lules de Leydig i megacariòcits (Fair et al. 1986; He et al. 1994; Schwarz et al. 1985; Stern et al. 1986).

El mecanisme de regulació de la síntesi de la PS encara no és clar, tot i que es creu que hi podrien estar implicades algunes citoquines que augmentarien la seva expressió (IL-6 i IL-4) i el TNF, que sembla inhibir-la (Hooper et al. 1995; Smiley et al. 1997).

El gen de la PS, *PROSI*, està localitzat a la regió centromèrica del cromosoma 3 (3p11.1-q11.2), ocupa 101 Kb de DNA genòmic, està estructurat en 15 exons i 14 introns (Schmidel et al. 1990) i conté un promotor sense caixa TATA (Tatewaki et al. 2003).

El mRNA de *PROSI* té 3,5 Kb que corresponen a una regió 5'UTR (112 pb de l'exó 1), una regió codificant (des de l'extrem 3' de l'exó 1 fins la zona 5' de l'exó 15) i una regió 3' no codificant de 1.139 pb (Lundwall et al. 1986).

1.2. *GAS6 (growth arrested specific gene 6)*

GAS6 (OMIM: 600441) és el gen central del nostre estudi i del qual n'hem analitzat l'estructura genètica.

1.2.1. Identificació de la proteïna *GAS6*

La proteïna *GAS6* (**Swiss-Prot**: Q14393) va ser identificada i descrita inicialment en línies cel·lulars NIH 3T3 (provinents d'un ratolí embrionari) com el producte d'un gen l'expressió del qual, en línies cel·lulars, augmentava unes 30 vegades quan la cèl·lula estava en fase G_0 del cicle cel·lular i era privada d'aliment. Aquesta proteïna va ser obtinguda a partir de l'aïllament del seu cDNA (Manfioletti et al. 1993).

L'any 1995 es va descriure que la *GAS6* és un lligand dels receptors tirosina quinasa TAM, que inclou els receptors TYRO3, AXL i MERTK (Ohashi et al. 1995; Varnum et al. 1995).

Posteriorment, la proteïna *GAS6* va ésser identificada com un factor de creixement en les cèl·lules de Schwann humanes (Li et al. 1996). Quan s'hi afegia *GAS6*, els receptors tirosina quinasa es fosforilaven i s'estimulava el creixement cel·lular. Aquests estudis van suggerir la importància de la *GAS6*, a més, com a factor neurotròfic necessari per a la supervivència neuronal (Funakoshi et al. 2002).

1.2.2. Estructura de *GAS6*

La proteïna humana presenta 678 aminoàcids amb un pes molecular de 75kDa. La proteïna *GAS6* conté, després del propèptid, un pèptid senyal a la zona N-terminal, i a continuació, com totes les proteïnes dependents de la Vitamina K, té un domini Gla a la regió N-terminal amb 12 residus d'àcid γ -carboxiglutàmic (**FIGURA 4**). Aquests residus permetran la unió (mitjançant ponts d'ions Ca^{2+}) als fosfolípids carregats negativament de membranes de cèl·lules activades, i, per tant, la interacció d'aquesta proteïna amb les membranes de les cèl·lules que han estat lesionades (Huang et al. 2003).

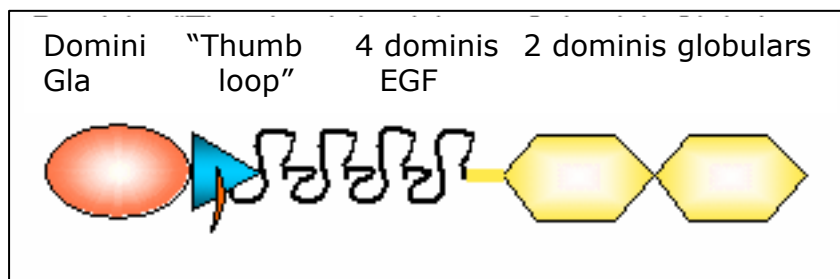
Seguidament hi ha una petita regió (*thumb loop*) que conté una zona que a la PS és sensible al tall per la trombina en dos llocs concrets amb la seqüència Leu-Arg-Ser i que a la *GAS6* aquests són substituïts per Ile-Gln-Lys i Phe-Ala-Thr, el que provoca un canvi conformacional que no permet l'atac proteolític de la trombina ni l'activitat anticoagulant que té la PS.

El següent domini presenta 4 repeticions de motius semblants al factor de creixement epidèrmic (EGF), cadascun amb 6 residus de cisteïna que formen 3 ponts disulfur i una regió *consensus* amb residus Asp i Asn que seran β -hidroxilats. Aquesta hidroxilació tindrà un paper important en l'alta afinitat per la unió a ions Ca^{2+} (Handford et al. 1990) i estarà també involucrat en l'alta afinitat de les interaccions proteïna-proteïna (Rebay et al. 1991).

FIGURA 4

Estructura de la proteïna GAS6.

) : TSR (regió NO sensible al tall per la trombina a GAS6)



Més cap a la regió carboxi-terminal la GAS6 presenta un parell de dominis semblants als mòduls globulars de la laminina G on s'hi ha identificat una regió d'unió a receptors tirosina quinasa (RTK) (Fisher et al. 2005). Aquests dominis s'assemblen a la proteïna d'unió a hormones sexuals (SHBG) i als presents a altres proteïnes amb dominis G (laminina A o l'agrina) que han estat descrits com a importants en la regulació del creixement i la diferenciació cel·lular (Mark et al. 1996). Aquest domini G és el responsable de la unió de la molècula de GAS6 amb els RTK de la família AXL o receptors TAM (TYRO3, AXL i MERTK), la qual cosa és afavorida per la interacció del domini Gla amb els fosfolípids de membrana (Sasaki et al. 2002).

El Calci (Ca^{2+}) és molt important en l'estructura conformacional i, probablement, en l'activitat funcional de GAS6. Provoca un canvi conformacional de la regió amino-terminal de la proteïna, concretament al domini Gla, que permetrà la interacció amb la membrana de la cèl·lula. Els ions Ca^{2+} tindran també molta afinitat pels residus hidroxilats de la regió EGF i afavoriran la interacció proteïna-proteïna.

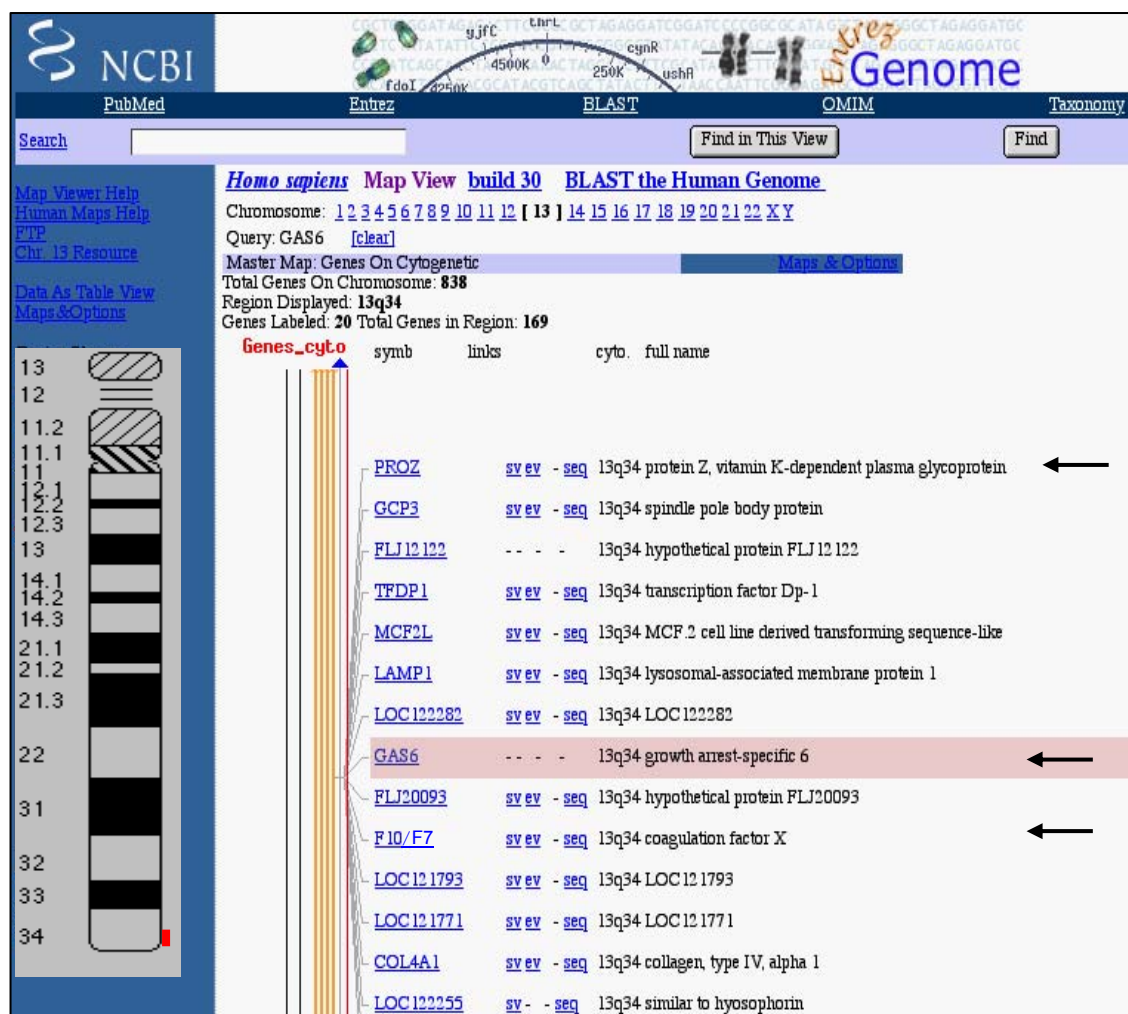
1.2.3. Identificació del gen *GAS6*

El gen *GAS6* (**ID Entrez: 2621**) va ésser localitzat al cromosoma 13, concretament a la regió telomèrica del braç llarg (13q34), (**FIGURA 5**), mitjançant FISH (hibridació *in situ* fluorescent) del cDNA de *GAS6* marcat per “*random priming*” amb biotina 16-dUTP i hibridat en els cromosomes metafàsics de cultius de limfòcits (Saccone et al. 1995). En aquesta mateixa regió també es localitzen els gens que codifiquen per altres proteïnes dependents de la vitamina K com són *PROZ*, *F7* i *F10*.

El cDNA de *GAS6* va ser inicialment identificat en cultius de cèl·lules de ratolí i, posteriorment, es va aïllar l’homòleg humà en cèl·lules HeLa el qual prediu una proteïna de 678 aminoàcids amb un 81% d’identitat amb la proteïna del ratolí (Manfioletti et al. 1993).

FIGURA 5

Localització del gen *GAS6* i d’altres gens que codifiquen per proteïnes dependents de la vitamina K. (figura modificada de la base de dades del NCBI)



1.2.4. Expressió de GAS6

La proteïna GAS6 té un ample espectre d'expressió en teixits i òrgans humans. Està present en altes concentracions al pulmó, moll de l'os, fetge, intestins i endoteli. En teixits de ratolí el mRNA de *GAS6* s'ha trobat en grans quantitats a l'estómac, cor, pulmó, ronyó, moll de l'os, cèl·lules de Leydig i endoteli vascular (Manfioletti et al. 1993).

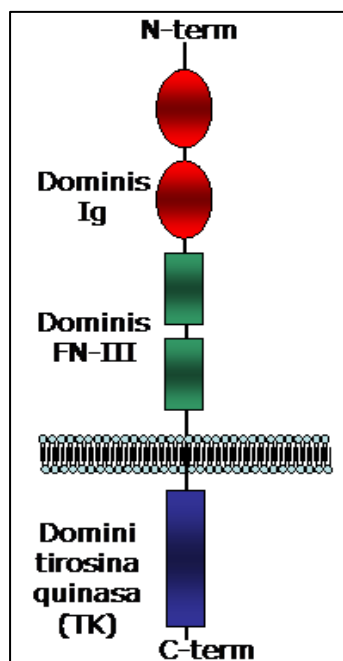
La proteïna *gas6* també s'ha trobat en altes concentracions al sistema nerviós central de la rata madura (Prieto et al. 1999) i en oligodendròcits humans fetals (Shankar et al. 2003). Tot i que alguns estudis indiquen que aquesta proteïna es troba en quantitats apreciables a les plaquetes de ratolí (Angelillo-Scherrer et al. 2001), d'altres no la detecten en les dels humans (Balogh et al. 2005).

1.2.5. GAS6 com a lligand de receptors tirosina quinasa

L'any 1995 la proteïna GAS6 va ésser identificada com a lligand del receptor AXL (Varnum et al. 1995), tot i que també pot unir-se al TYRO3 i al MERTK i estimular-ne l'autofosforilació (Ohashi et al. 1995), amb el següent ordre d'afinitats:

AXL > TYRO3 > MERTK (Nagata et al. 1996).

FIGURA 6
Estructura dels RTKs



Així doncs, la GAS6 és un lligand dels receptors tirosina quinasa TAM (TYRO3, AXL i MERTK, **TAULA 2**). La unió amb el receptor permet la dimerització de les molècules d'aquest receptor i en provoca l'autofosforilació dels dominis tirosina quinasa intracel·lulars, els quals tenen un paper molt important en la transducció del senyal des del medi extracel·lular, i lideren una sèrie de respostes com la proliferació, diferenciació i supervivència cel·lular (Crosier et al. 1997).

De moment no s'han descrit altres funcions de la proteïna GAS6 fora de la seva interacció com a lligand amb els RTK.

1.2.5.1. Estructura dels receptors TK TAM

Aquesta subfamília de receptors tenen en comú els dominis extracel·lulars: dos dominis semblants a la Immunoglobulina (Ig) a la zona N terminal, dos repeticions de dominis de fibronectina de tipus III (uns motius semblants als de les proteïnes de la matriu extracel·lular i a les molècules d'adhesió de cèl·lules neuronals), i un domini tirosina quinasa intracel·lular (**FIGURA 6**). Aquesta arquitectura dels dominis extracel·lulars també es troba en molècules d'adhesió cel·lular de la superfamília de les cadherines i les immunoglobulines. Aquests tipus de receptors poden ser bifuncionals ja que poden actuar tant en l'adhesió cel·lular com en la transducció del senyal. Per tant, tenen un paper important en la interacció cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu a través dels seus lligands, la PS i la GAS6 (Wimmel et al. 2001). No està clar que la membrana a la que s'uneix el domini Gla sigui la de la cèl·lula que presenta el receptor. Pot ser una cèl·lula adjacent i així la proteïna pot funcionar com a nexa d'unió entre dues cèl·lules.

Aquests receptors de la GAS6 poden formar heterodímers i s'ha observat una coexpressió en diferents teixits cel·lulars (Lu et al. 1999).

AXL s'expressa a la majoria de teixits, inclòs en monòcits i macròfags perifèrics i es troba sobreexpressat en cèl·lules de leucèmia mieloide crònica (LMC) i leucèmia mieloide aguda (LMA) (Neubauer et al. 1994; O'Bryan et al. 1991); *TYRO3* s'expressa majoritàriament en el cervell i es troba sobreexpressat en cultius de LMA i en el carcinoma de cèl·lules esofàgiques escamoses (Ohashi et al. 1995; Wimmel et al. 2001). S'ha observat que la Proteïna S humana pot activar *TYRO3* mentre que no presenta cap activitat amb els altres receptors TAM (Stitt et al. 1995a). *MERTK* s'expressa en línies cel·lulars neoplàsiques de limfòcits B i T però no en limfòcits normals, fet que va suggerir que podria ser un important protooncogen amb un paper en la transformació cel·lular (Graham et al. 1994). També s'expressa en cèl·lules de sang perifèrica i en cèl·lules mononuclears, monòcits i macròfags del moll de l'os (Graham et al. 1995; Nagata et al. 1996). S'ha descrit que el receptor *MERTK* participa en la fagocitosi dels segments de les cèl·lules apoptòtiques epitelials pigmentades de la retina (vegeu l'**APARTAT 1.2.5.3., PÀGINA 30**)(Hall et al. 2005).

La unió del lligand als receptors *AXL*, *MERTK* i *TYRO3* activa diferents vies de transducció de senyal, entre les que es destaquen la via de la fosfatidilinositol 3 fosfat quinasa (PI3K) i, més tard, de la proteïna *AKT* (anteriorment rebia el nom de *PKB*, és a

dir, proteïna quinasa B) que activen la proliferació cel·lular i l'antiapoptosi, i la via de la PLC γ que condueix a la migració, quimiotaxi i adhesió cel·lulars (**FIGURA 7, PÀGINA 29**). Els receptors TAM també són essencials pel manteniment nutricional de diferents tipus cel·lulars de teixits madurs de mamífers com en els sistemes nerviós, reproductiu i immunològic (Lu et al. 1999).

TAULA 2

Identificadors dels receptors TAM

Receptor	Sinònims	OMIM	ID proteïna	Gen	Locus
Axl	Ufo	#109135		<i>AXL</i>	19q13.1
	Isoforma 1		NP_068713		
	Isoforma 2		NP_001690		
Tyro3	Sky, Rse, Tif	#600341	NP_006284	<i>TYRO3</i>	15q15.1-21.1
MerTK	MER, c-mer	#604705	NP_006334	<i>MERTK</i>	2q14.1

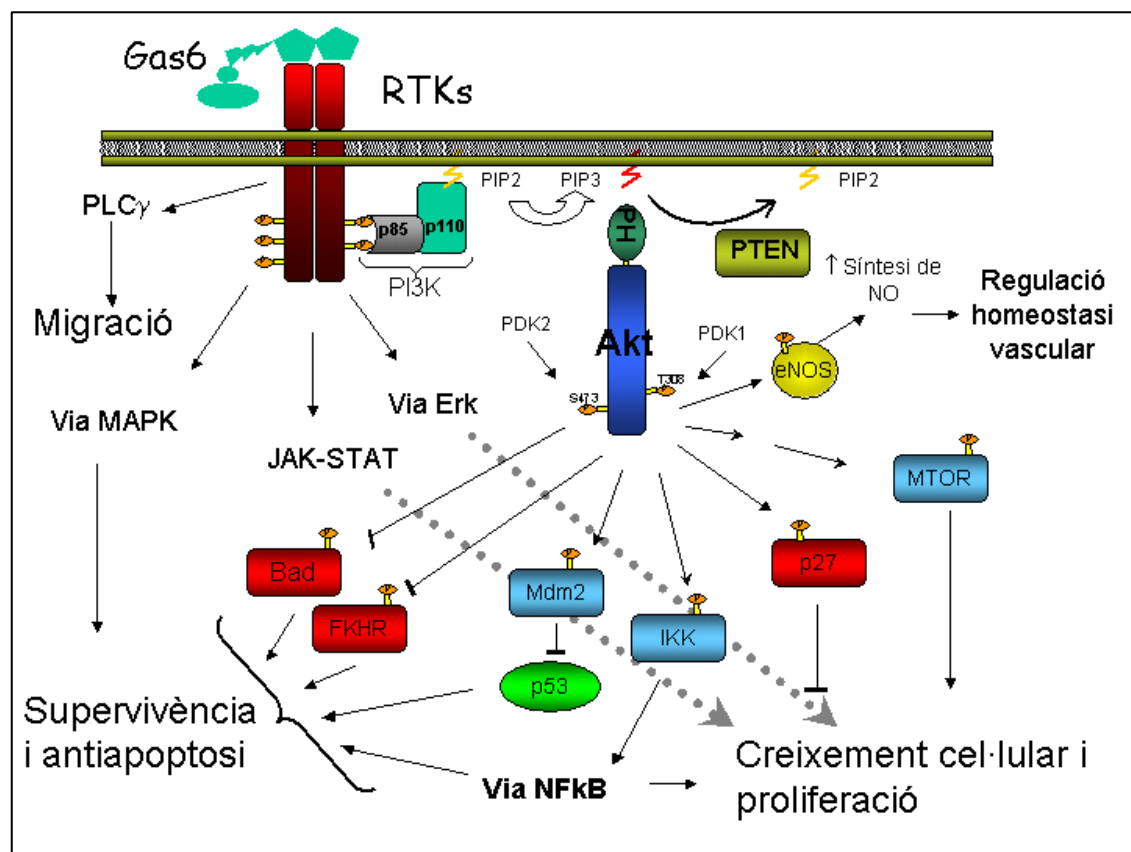
1.2.5.2. Senyalització cel·lular per la unió de la GAS6 als receptors TAM

Quan la GAS6 s'uneix al receptor TAM es produeix la transfosforilació de la cua citoplasmàtica d'aquest receptor i provoca el reclutament de p85-p110 (components del complex enzimàtic PI3K) que transformen els lípids fosfatidilinositol 3,4-bifosfat (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) que poden ésser reciclats per l'enzim PTEN (**FIGURA 7**).

FIGURA 7

Via de transducció del senyal mediada pels receptors TAM

Les fletxes truncades indiquen "inhibició" i les fletxes amb punta "activació".



La interacció de PIP3 amb AKT (situat al citosol en conformació estable) és a través del domini PH, (de l'anglès *pleckstrin homology*, amb homologia a la pleckstrina). Aquesta unió produeix un canvi conformacional en la molècula i deixa lliures dos llocs principals de fosforilació (T306 i S473). La fosforilació d'aquests residus provocarà els diferents esdeveniments que condueixen cap a la inhibició de l'apoptosi i el creixement cel·lular com són la fosforilació de Bad, l'activació de factors de transcripció del tipus

“*forkhead*” (FKHR), de p53 que detecta dany al DNA i del sistema NFκB (Goruppi et al. 1997a).

L'AKT pot activar la síntesi de l'enzim eNOS (òxid nítric sintasa endotelial) que augmenta la síntesi de NO (òxid nítric), important per la regulació homeostàtica del sistema vascular (Emanueli et al. 2004). L'activació d'AKT també provoca la fosforilació de la proteïna MTOR que activa el creixement i proliferació cel·lular i augmenta la síntesi d'àcids nucleics, així com de la p27 que inhibeix la proliferació (Chen et al. 2002).

D'altra banda, els receptors d'aquesta família TAM activen les vies següents:

- Via JAK-STAT: la fosforilació del factor de transcripció STAT3 permet que es dimeritzi i es transloqui al nucli per provocar l'activació de la diferenciació i creixements cel·lulars (Yanagita et al. 2001b).
- Via d'Erk: són cascades serina-treonina quinases que estan lligades a la proliferació cel·lular (Stenhoff et al. 2004).
- Via de les MAPK: l'activació de la MAPK és un pas important per processos de supervivència i antiapoptosi (Lee et al. 1999).
- Via PLCγ: permet activar processos de migració cel·lular (Todt et al. 2004).

D'aquests treballs es dedueix que la proteïna GAS6 i els seus receptors tenen importància en la regulació de la homeostasi cel·lular dels teixits on s'expressen, entre ells la paret vascular.

1.2.5.3. Altres funcions cel·lulars de GAS6

La GAS6 s'uneix a les membranes cel·lulars mitjançant la interacció mediada per ponts de Ca²⁺ del domini Gla de l'extrem N-terminal amb la fosfatidilserina i aquesta unió en facilita la de la zona C-terminal del domini globular de la proteïna GAS6 amb el receptor (**FIGURA 8**).

Els 4 motius semblant a EGF contenen, cadascun d'ells, 6 cisteïnes que poden contribuir a la interacció entre diferents proteïnes que tinguin una estructura de dominis EGF. Així la GAS6 també podria actuar com un lligand divalent que funcioni com una molècula d'adhesió (Stenflo et al. 2000); (Nakano et al. 1997).

També s'ha descrit que la GAS6 està implicada en protegir les cèl·lules d'entrar en apoptosi mitjançant l'activació per fosforilació d'AKT i una significant inducció d'activitat MAP quinasa. La implicació del receptor a la via de senyalització per AKT va

ser confirmada en ratolins deficientes en AXL en els que en presència de la GAS6 no s'observava cap efecte antiapoptòtic. Aquests resultats indiquen que la via de senyalització GAS6-AKT té una important funció en l'augment de la supervivència cel·lular en condicions d'estrès (Bellosta et al. 1997).

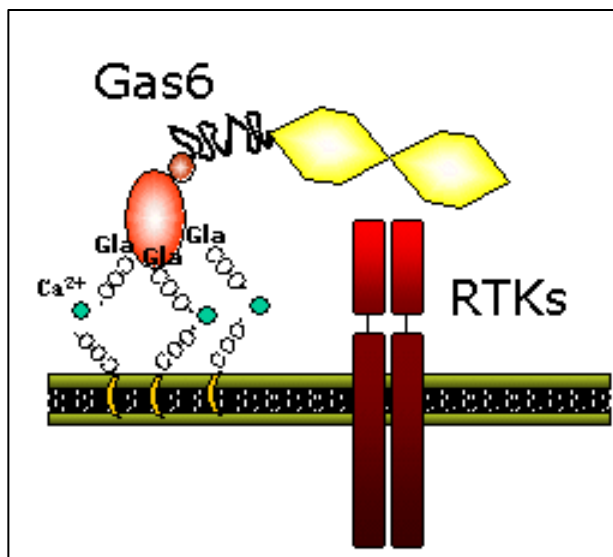
A més, la unió de GAS6 als fosfolípids de membrana de cèl·lules activades i concretament a la fosfatidilserina (un fosfolípid situat a la capa interna de la membrana cel·lular i que només és exposada a l'exterior quan es produeix una lesió) és un marcador fagocitari per a que els macròfags de classe A i B reconguin les cèl·lules apoptòtiques i les fagocitin. Els ratolins deficientes en el receptor MERTK, mostren una menor capacitat d'eliminació de cèl·lules apoptòtiques per fagocitosi (Hall et al. 2005) i, a més a més, la MERTK participa en la fagocitosi dels segments de les cèl·lules apoptòtiques epitelials pigmentades de la retina (RPE) senyalitzant-les perquè siguin reconegudes pels macròfags (Hall et al. 2005; Hall et al. 2001).

Pel que fa a la Proteïna S també té la funció de marcador de les cèl·lules apoptòtiques per dirigir-les cap als receptors de la PS (TYRO3) situats als macròfags (Anderson et al. 2003).

FIGURA 8

Interacció de Gas6 amb els RTK.

(fosfatidilserina; ● ions de Calci (Ca^{2+})



1.2.6. GAS6/AXL a l'endoteli vascular

La GAS6 i l'AXL són proteïnes expressades per les cèl·lules endotelials, perícits i cèl·lules musculars llises i la interacció entre lligand i receptor està relacionada amb la migració a través dels capil·lars sanguinis de leucòcits durant la formació de la neointima en vasos lesionats (Melaragno et al. 1998). S'ha descrit que aquesta unió GAS6-AXL té propietats antiapoptòtiques, de proliferació i de quimiotaxi sobre cèl·lules musculars llises de la vasculatura (VSMC) (Nakano et al. 1996).

El fet de trobar expressió de la GAS6 en les cèl·lules precursors de cèl·lules T i en monòcits suggereix un potencial paper en l'activació endotelial durant la resposta inflamatòria inicial després de la lesió vascular. A part d'això, altes concentracions de GAS6 inhibeixen l'adhesió dels granulòcits a cèl·lules endotelials i suggereixen un efecte antiinflamatori a les cèl·lules endotelials per la interacció GAS6-AXL (Avanzi et al. 1998).

En el model de ratolins deficientes en ApoE, s'observà que tant la GAS6 com l'AXL augmentaven la seva expressió de manera molt evident a la placa respecte la paret vascular sana. La deficiència en GAS6, a més a més, afecta de manera directa a l'arquitectura de la placa ateromatosa (Lutgens et al. 2000 i altres dades no publicades). Tot i que el número de macròfags i limfòcits és similar en animals ateroscleròtics amb GAS6 o sense, les cèl·lules de la musculatura llisa migren d'una manera desorganitzada en els animals GAS6^{-/-}. Sorprenentment, els paràmetres de divisió cel·lular i apoptosi no estan modificats per l'absència de GAS6 i suggereixen que el paper fonamental de la GAS6 a la placa és de localització correcta de les VSMC a la zona de la lesió. Aquestes dades suggereixen que el paper sobre la migració cel·lular és una funció específica d'aquesta molècula ja que pot permetre l'apropament de diferents proteïnes.

1.3. Models animals de GAS6

1.3.1. Model d'aterotrombosi.

Els ratolins deficients en *gas6* són viables, fèrtils i no mostren diferències en mida, pes o comportament. No pateixen hemorràgies ni trombosis espontànies (Angelillo-Scherrer et al. 2001).

Aquests ratolins deficients en *gas6* estan més protegits contra la trombosi venosa i arterial induïda i la formació dels trombes és més lenta i no tan extensa com en els ratolins normals. Aquesta resistència, no obstant, no està donada per un augment de la trombòlisi. Amb la inducció de la trombosi mitjançant col·lagen / epinefrina hi ha una disminució de la producció de trombes i de la mortalitat (Angelillo-Scherrer et al. 2001). També s'observà una agregació plaquetar disminuïda en els ratolins deficients quan s'hi afegeix l'inductor de trombosi LPS.

Les anàlisis de factors de la coagulació en aquests ratolins mostren que hi ha un manteniment dels nivells de factors procoagulants, factor V, factor VIII i protrombina, un augment del nombre de plaquetes circulants a causa, segurament, que no estan agregades, i un augment de fibrinogen. A més, es va observar que els anticossos antiGAS6 inhibien la funció plaquetar mitjançant un bloqueig de l'agregació de les plaquetes.

L'expressió dels receptors de la *gas6* en els ratolins deficients en *gas6* no presenta diferències respecte els ratolins normals. Quan s'hi afegeix la proteïna *gas6* recombinant, alguns d'aquests ratolins deficients recuperen el seu fenotip normal.

1.3.2. Model de nefropatia

Un grup japonès també va crear el ratolí deficiënt en el gen *gas6* com a model de nefritis nefrotòxica (NTN), malaltia que podia ser induïda per la injecció dels anticossos anti-Thy1.1. La proteïna *gas6* havia estat descrita anteriorment com un potent inductor de la proliferació de les cèl·lules mesangials del glomèrul (Yanagita et al. 1999). A més, quan s'administrava warfarina a aquests ratolins es bloquejava la via *gas6/axl*, i s'inhibia la proliferació de les cèl·lules mesangials i l'acumulació de les proteïnes de la matriu extracel·lular.

Aquests ratolins deficients en el gen *gas6* no tenien quantitats detectables d'axl en condicions normals, però quan s'hi afegia l'inductor de la proliferació, l'expressió d'aquest receptor augmentava significativament (Yanagita et al. 2001a).

A banda d'això, malgrat que aquest model no presentava cap anomalia significativa, s'observava que els ratolins deficients estaven menys afectats de glomerulonefritis respecte als ratolins normals. El conjunt de proliferació de cèl·lules del glomèrul, l'esclerosi del glomèrul i l'acumulació de fibrina/fibrinogen havia disminuït després de la inducció. D'aquesta manera, es pot atribuir a la proteïna *gas6* un important paper dins de l'àmbit de la progressió del dany renal crònic (Yanagita et al. 2002).

1.3.3. Model animal deficient pels receptors TAM

Han estat descrits diferents models animals deficients en els receptors TAM, anul·lant un sol gen, dos o tots tres gens dels receptors. El ratolí deficient en algun dels 3 receptors TAM (TYRO3, AXL o MERTK) és viable i fèrtil, i no presenta importants defectes anatòmics.

Els ratolins deficients en el receptor TYRO3 (TYRO3 *-/-*) poden patir problemes en el sistema nerviós central a partir del setè mes de vida ja que pateixen convulsions i la paràlisi d'alguna extremitat (Lu et al. 1999).

Els ratolins deficients en el receptor AXL (AXL *-/-*) presenten més apoptosi induïda per privació d'aliment de fibroblasts (Bellosta et al. 1997).

Els ratolins deficients en el receptor MERTK (MerTK *-/-*) són cecs a causa d'una completa degeneració postnatal dels fotoreceptors (Scott et al. 2001). Presenten una sensibilitat augmentada a un xoc endotòxic (Camenisch et al. 1999) a causa d'una pèrdua de la capacitat d'eliminar les cèl·lules apoptòtiques, tenen la melsa dos cops augmentada de mida i són propensos a patir autoimmunitat (Cohen et al. 2002; Scott et al. 2001).

Quan són dos els receptors que s'eliminen, en aquests ratolins (TYRO3 *-/-* i Axl *-/-*; o Tyro3 *-/-* i MerTK *-/-*; o Axl *-/-* i MerTK *-/-*) s'hi observen uns fenotips més pronunciats que en els mutants d'un sol receptor però són fèrtils, el que permet generar ratolins triple mutants (sense cap dels 3 receptors).

Els ratolins triple mutants (Tyro3 *-/-*, Axl *-/-* i MerTK *-/-*) o TAM *-/-* són viables però infèrtils i amb alguna anomalia neurològica i dèficit psicològic. Aquests ratolins presenten uns processos exacerbats d'autoimmunitat i hiperreactivitat de les cèl·lules

immunes provocat per la manca d'un mecanisme regulador de la resposta immunològica (Lu et al 2001). Són processos d'autoimmunitat molt semblants als observats en malalties autoimmunològiques en humans. La melsa dels ratolins deficients és plena de cèl·lules apoptòtiques que l'engrosseix a causa, segurament, d'un desajustament en les poblacions de limfòcits que expressen els tres receptors causat possiblement per la incapacitat d'eliminació de les cèl·lules apoptòtiques (Graham et al. 1994).

A més a més, en aquests ratolins TAM $-/-$, l'espermatogènesi està truncada perquè hi ha una pertorbació als tubs seminífers a causa de l'apoptosi de les cèl·lules de Sertoli als tubs seminífers. Els receptors TAM són normalment expressats per les cèl·lules de Sertoli durant el desenvolupament postnatal mentre que els seus lligands (la PS i el GAS6) són expressats per les cèl·lules de Leydig abans de la maduresa sexual i per les de Sertoli, després (Lu et al. 2001).

Pel que fa a les plaquetes, el bloqueig o la inactivació al menys d'un dels receptors TAM és suficient per inhibir l'agregació i degranulació plaquetars (Gould et al. 2005) i quan se'ls indueix la trombosi presenten uns trombes més petits de mida i pes que els ratolins normals, però no desenvolupen hemorràgies (Angelillo-Scherrer et al. 2001; Chen et al. 2004a). Aquests ratolins deficients en alguns dels receptors presenten també una disminució de la estabilització dels trombes encara que no prevé l'agregació plaquetar inicial (Angelillo-Scherrer et al. 2005; Saller et al. 2006).

1.4. LA PATOLOGIA VASCULAR COM MALALTIA COMPLEXA

1.4.1. MALALTIES COMPLEXES

Les malalties comunes humanes tenen una elevada prevalença a la població general. Tot i que es coneix que tenen una base genètica important, els gens que hi intervenen acostumen a tenir efectes més o menys lleus. La complexitat d'aquestes patologies és deguda, d'una banda, a l'heterogeneïtat genètica, és a dir, hi ha múltiples gens implicats, cadascun dels quals no és ni necessari ni suficient per provocar la malaltia (malaltia poligènica); i de l'altra, a la interacció amb factors ambientals (malaltia multifactorial) (**FIGURA 9**).

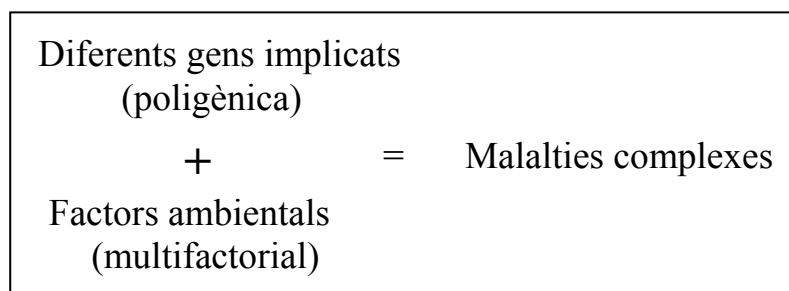
La GAS6 és una proteïna que ha estat implicada en moltes malalties complexes a causa de les seves propietats: malaltia cardiovascular, artritis reumatoide, càncer, nefritis crònica, entre d'altres (Angelillo-Scherrer et al. 2005; Munoz et al. 2004; O'Donnell et al. 1999; Sun et al. 2003; Yanagita et al. 2002).

Les malalties estudiades en aquesta tesi són complexes i poden compartir mecanismes patogènics comuns (malaltia ateroscleròtica i trombosi) (Cambien et al. 2005).

Els mecanismes que participen en la inflamació, la trombosi i les malalties aterotrombòtiques, en general, són reaccions en cadena en les que hi intervenen un bon nombre de proteïnes en diferents mecanismes o xarxes metabòliques, l'activitat de les quals pot presentar variacions si els gens que les codifiquen presenten polimorfismes que afecten a la seva expressió o funció. Les diferències d'activitat podrien determinar la susceptibilitat individual a patir les diferents malalties.

FIGURA 9

Característiques de les malalties complexes.



1.4.2. L'HEMOSTÀSIA i la TROMBOSI

Tots els mecanismes de l'hemostàsia tenen com a finalitat preservar la integritat dels vasos segellant qualsevol trencament que pugui aparèixer.

Quan es produeix el trencament d'un vas, s'activen un conjunt de cèl·lules i proteïnes que la sang transporta que interaccionen amb la paret lesionada. Aquests elements activats provoquen que la sang s'espesseixi en aquest punt convertint la sang en una substància més sòlida (coàgul) que es diposita al voltant de la zona lesionada actuant com tap (tap hemostàtic) (Mann et al. 1988).

Si es produeix una fissura o una alteració rugosa de la part interna de la paret, es desencadenen els mateixos mecanismes i es produeix un coàgul a dins del vas, i no només al voltant del vas (generació del trombe) (Kalafatis et al. 1997).

Els mecanismes de l'hemostàsia eviten una pèrdua excessiva de sang en situacions d'una lesió vascular i inicien els mecanismes de reparació de la zona lesionada; el resultat és un fi balanç entre coagulació, inhibició de la coagulació i fibrinòlisi. En el cas que es produeixi una desregulació d'aquest procés es pot generar un procés trombòtic, és a dir, el creixement d'un trombe estable que pot obstruir els vasos sanguinis. L'equilibri i la modulació recíproca entre aquests tres processos és fonamental pel bon funcionament de l'hemostasi implicant:

- La formació ràpida d'un coàgul a la zona lesionada.
- La limitació de l'extensió del coàgul només a la zona afectada per la lesió.
- La dissolució del coàgul un cop la lesió ha estat reparada.

1.4.2.1. L'hemostàsia primària

L'hemostàsia primària és la resposta inicial al trencament d'un vas sanguini per l'exposició de la sang al teixit subendotelial.

Les plaquetes suporten una sèrie de reaccions com l'adhesió, l'agregació, l'alliberament del contingut dels grànuls i canvis morfològics que condueixen a la formació del tap plaquetar. Aquest és el mecanisme on la proteïna GAS6 podria tenir una importància essencial, a través d'algunes de les seves funcions descrites; per exemple, estimulants l'adhesió i agregació plaquetars (Angelillo-Scherrer et al. 2001); (Angelillo-Scherrer et al. 2005).

- La primera reacció que ocorre després de la lesió vascular és un reflex nerviós que provoca la vasoconstricció de la zona de la lesió i com a conseqüència dóna una disminució local del flux sanguini.

- Un cop produïda la lesió, la sang entra en contacte amb les parets del vas afectat i amb els teixits extravasculars, concretament amb els components col·lagenosos de la membrana basal. D'aquesta manera s'activen les plaquetes i s'adhereixen a les superfícies danyades gràcies a la interacció de les mateixes amb els fosfolípids de membrana carregats negativament; comença el procés d'agregació plaquetar i simultàniament, la coagulació sanguínia. Normalment les plaquetes no s'adhereixen a l'endoteli vascular intacte. Això és en part a causa de l'acció de la PGI₂ (prostaglandina I₂ o prostaciclina) que està produïda per les cèl·lules endotelials i és un potent inhibidor de l'adhesió plaquetar.

- El factor de von Willebrand (VWF) que és un complex multimèric d'unitats peptídiques s'expressa i s'uneix a les plaquetes i al subendoteli, el que permet localitzar les plaquetes als llocs de la lesió i iniciar l'adhesió plaquetar. Les plaquetes també s'uneixen directament al col·lagen exposat de les membranes basals i de l'interstici vascular d'aquestes zones lesionades (Beguin et al. 1999).

- L'agregació plaquetar és induïda pel fibrinogen mitjançant la unió al receptor de les plaquetes, GP IIb-IIIa. Les plaquetes que circulen en forma discoïdal canvien la seva morfologia i esdevenen circulars amb pseudòpodes (White et al. 1978).

- Les plaquetes produeixen tromboxà A₂ i àcid araquidònic, i alliberen ADP que potencien l'agregació fins que es forma el tap plaquetar, amb les membranes de les plaquetes carregades negativament, i s'inicia la via intrínseca de la coagulació que porta a la formació de fibrina que formarà una xarxa que estabilitzarà el trombe (Holmsen 1994).

Aquests diferents processos donen lloc a la formació del "tap plaquetar".

Quan s'altera l'hemostàsia primària (davant un traumatisme o de vegades, de manera espontània) apareixen hemorràgies immediates i més duradores del que és normal (Davie et al. 1991; Furie et al. 1988).

1.4.2.2. La coagulació

Un cop s'ha produït una ferida que ha provocat el trencament de vasos sanguinis petits, l'hemorràgia s'atura per la formació del tap plaquetar primari i l'activació del sistema de la coagulació que és una cascada de reaccions enllaçades que tenen com a finalitat que un zimogen es converteixi en una serina proteasa activa que catalitza la transició a proteasa del següent precursor/zimogen en la cascada. Aquestes reaccions permeten la generació de trombina i la formació de la xarxa de fibrina (Dahlback 2000; Dahlback et al. 2005; Mann et al. 1993).

L'exposició del factor tissular (TF, de l'anglès *tissue factor*, que és una glicoproteïna present a la membrana) a la sang fa que una part del FVII de la sang s'activi (FVIIa) i s'uneixi al TF, la qual cosa provoca la iniciació de la coagulació. El complex estable FVIIa-TF permet activar el factor IX (FIX) i el factor X (FX) circulants en FIXa i FXa, els quals amplifiquen el sistema amb l'activació més eficient del FVII.

El FXa i el seu cofactor FVa s'uneixen a les plaquetes activades per formar un complex que permet activar eficientment la protrombina a trombina i la trombina permet l'activació del fibrinogen a fibrina.

El FV circulant pot ser activat majoritàriament per la trombina generada pel procés. La trombina també activa el FVIII a FVIIIa que és un important cofactor del FIX en el complex que converteix el FX a FXa.

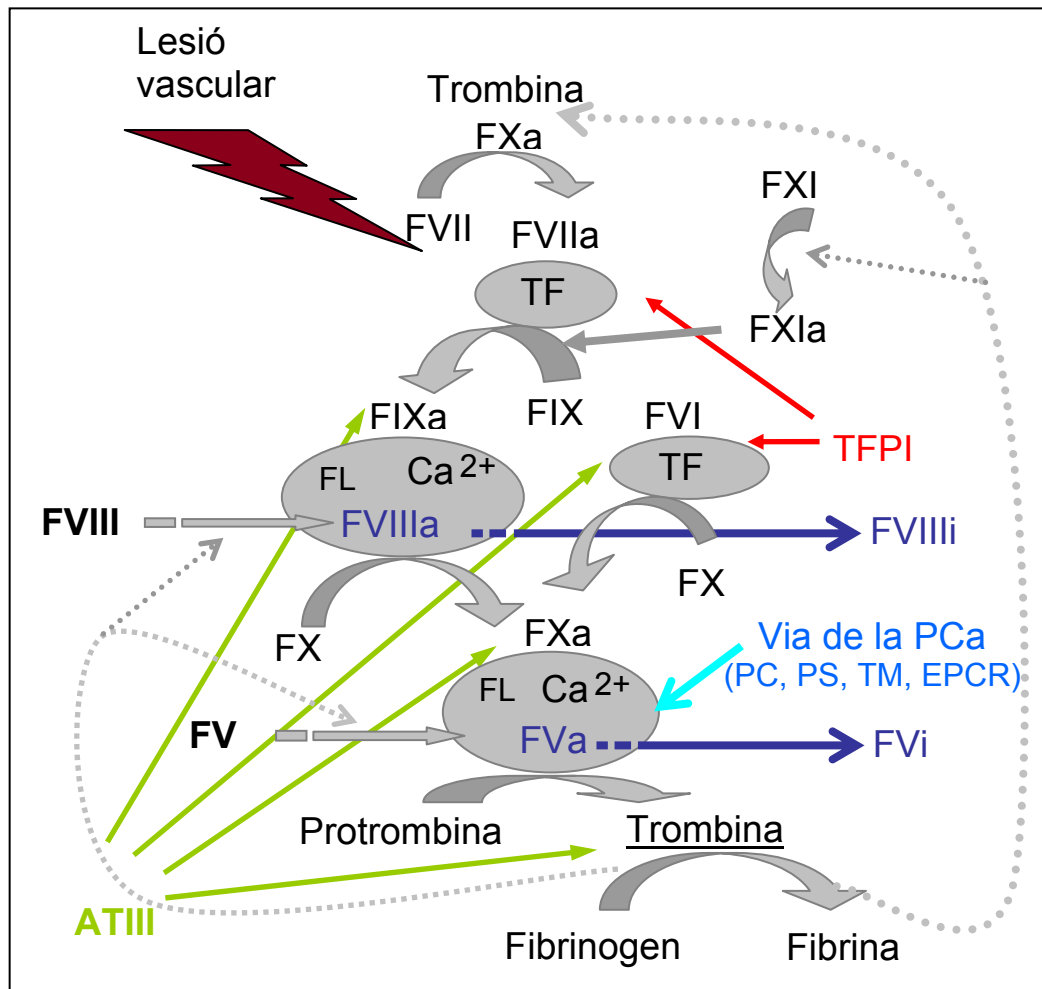
La trombina és l'enzim clau en la cascada de la coagulació (**FIGURA 10**) ja que permet amplificar la coagulació activant el factor V (FV), factor VIII (FVIII), factor XI (FXI) i factor XIII (FXIII), així com també talla proteolíticament el fibrinogen en monòmers de fibrina que formaran la xarxa de fibrina que estableix el coàgul.

Tots aquests processos són molt eficients a causa de les característiques del domini Gla que presenten la majoria d'aquestes proteïnes (vegeu l'**APARTAT 1.1., PÀGINA 15**) el qual afavoreix la seva unió a les superfícies fosfolipídiques de les cèl·lules endotelials i plaquetes activades, concentrant o localitzant les reaccions on s'ha produït la lesió.

FIGURA 10

La cascada de la coagulació i les seves vies d'inhibició.

En **VERMELL**: via d'inhibició del factor tissular (TF); en **VERD**: via d'inhibició de l'antitrombina III (ATIII); en **BLAU**: via d'inhibició de la Proteïna C activada (APC); FL: fosfolípids.



1.4.2.3. La inhibició natural de la coagulació

El procés de la coagulació es troba controlat en l'organisme per mecanismes anticoagulants. Actualment, se'n coneixen tres: el mecanisme de l'inhibidor de la via del factor tissular (TFPI), el mecanisme de la proteïna C-trombomodulina i el mecanisme de l'antitrombina III (**FIGURA 10**).

El TFPI té tres dominis inhibidors serina proteasa repetits en tàndem. Els dos primers amb importància funcional a la coagulació, el primer domini s'uneix al complex factor VIIa-TF (prèviament format), el segon permet la unió amb el factor Xa. Aquestes unions inhibeixen les dues proteases i, per tant, s'impedeix que progressi la cascada de coagulació per aquesta via inicial.

El mecanisme de la proteïna C- trombomodulina controla la cascada de la coagulació inhibint els cofactors de la mateixa. El receptor de la PC (EPCR, de l'anglès *endothelial protein C receptor*) s'unirà a la PC i la direccionarà cap al complex format per la trombina i la trombomodulina (receptor de la trombina que es troba a les membranes de cèl·lules endotelials). Aquest correcte apropament de les proteïnes afavoreix la digestió de la PC per part de la trombina. Com a conseqüència, s'hi allibera un pèptid d'activació de 14 aminoàcids i la forma activa de la proteïna C (APC) unida a l'EPCR. Posteriorment se separen l'EPCR i l'APC, i amb l'ajut de la Proteïna S (vegeu **PÀGINA 21**) com a cofactor, l'APC és capaç de segmentar les cadenes més pesades dels cofactors de la coagulació Va i VIIIa i, en conseqüència, inactivar-los, inhibint en darrer terme la formació de fibrina (Lu et al. 1996; Shen L 1994; Varadi et al. 1996).

El mecanisme de l'antitrombina III (ATIII) protegeix les parets vasculars contra la formació de coàguls ja que desenvolupa la seva acció inhibidora en la interfase sang-paret vascular, zona on es generen molts enzims de la cascada de la coagulació. L'ATIII és un inhibidor de proteases de la serina de la família de les serpines que té un extrem N-terminal carregat positivament que interaccionarà amb els proteoglicans de sulfat d'heparà generats per les cèl·lules endotelials. Aquest fet li provoca canvis conformacionals que l'activen i que afavoreixen l'aproximació entre l'ATIII i els seus enzims diana (factor IIa (o trombina), factor Xa, factor IXa, factor XIa i factor XIIa) i els inhibeix a través de la interacció d'una arginina del seu lloc reactiu C-terminal amb la serina del lloc actiu d'aquestes proteases de serina (Bauer et al. 1991).

1.4.2.4. La fibrinòlisi

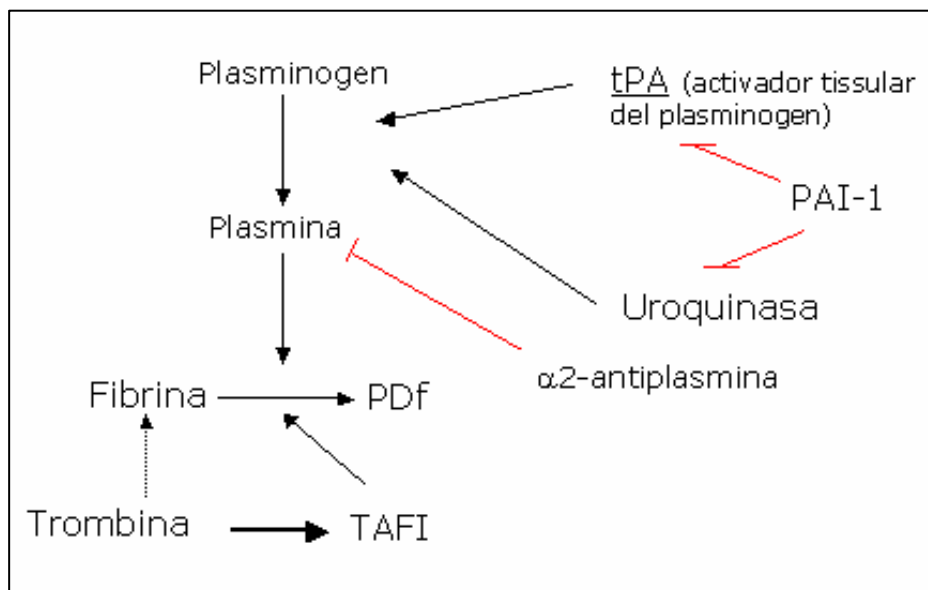
El procés de la fibrinòlisi permet la dissolució del coàgul un cop la lesió vascular ha estat reparada (Bauer et al. 1991; Gaffney PJ 1994).

La proteïna central en la fibrinòlisi és el plasminogen que té la capacitat d'unir-se als polímers de fibrina. Només quan s'ha unit a fibrina el plasminogen pot ser activat, mitjançant proteòlisi, a plasmina pels seus activadors fisiològics, principalment l'activador del plasminogen de tipus tissular (TPA). La plasmina és una proteasa de serina que és capaç de dissoldre la fibrina del coàgul, i genera a partir d'aquesta uns pèptids solubles (PDF, producte de degradació de la fibrina) que són capaços d'inhibir la trombina (**FIGURA 11**).

És necessari un control de la funció fibrinolítica per tal d'evitar hemorràgies a l'organisme. Aquest control es dona bàsicament a través de l'inhibidor tipus 1 de l'activador del Plasminogen (PAI-1), de TAFI (de l'anglès *thrombin-activable fibrinolysis inhibitor*) i de l'antiplasmina α_2 (**FIGURA 11**). El PAI-1 és un inhibidor de serina proteasa (SERPINA) que inhibeix l'Uroquinasa i el TPA en formar un complex no reversible amb ell; el TAFI no permet que el TPA s'uneixi a la fibrina i l'antiplasmina α_2 , es difon molt lentament del plasma a l'interior dels coàguls, on inhibeix la plasmina.

FIGURA 11

Procés de la fibrinòlisi i el seu control.



1.4.3. L'ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi és un procés complex que afecta de forma selectiva el circuit arterial i resulta de l'acció combinada de factors genètics i ambientals. A l'actualitat és la principal causa de mort als països desenvolupats i també en molts que es troben en vies de desenvolupament (Bonow et al. 2002). El terme **aterosclerosi** prové del grec *atero*=lípid i *sclero*=dur, i no s'ha de confondre amb **arteriosclerosi** (*arterio*=artèria). L'arteriosclerosi és un terme més general que defineix totes les lesions que donen lloc a un engruiximent de la paret vascular arterial.

L'aterosclerosi és una lesió que es localitza en gran part dins de la capa íntima de la paret de l'artèria. En aquestes lesions hi ha diferents tipus de cèl·lules, sobretot cèl·lules musculars llises procedents de la capa mitja i també s'hi pot trobar macromolècules, acúmuls de lípids i elements generats de la necrosi cel·lular de la lesió (Libby et al. 2002).

La formació de la placa ateroscleròtica es caracteritza per l'engruiximent de la paret arterial que ocasionalment pot produir l'oclusió de la llum del vas i impedeix el flux sanguini cap als teixits, els quals sense el suficient subministrament d'oxigen i nutrients, poden patir isquèmia i una posterior necrosi. No obstant, s'assumeix que la majoria d'esdeveniments vasculars aguts, com la cardiopatia isquèmica i els accidents cerebrovasculars, ocorren, precisament, en lesions poc oclusives, però susceptibles de ruptura i trombosi (Drouet 2002).

La malaltia ateroscleròtica afecta principalment artèries de calibre mitjà, com les coronàries, les caròtides, les renals, les bassilars, les cerebrals i l'aorta. L'endoteli és la capa de l'artèria que sembla tenir un paper més important en l'inici del procés ateroscleròtic. En condicions normals aquest epitel·li té funcions de manteniment de l'equilibri hemostàtic, a més d'impedir la unió de plaquetes i leucòcits a la paret del vas (Watkins et al. 2006).

Quan es produeix una lesió, les plaquetes entren en contacte amb l'endoteli lesionat, s'activen i alliberen els grànuls amb citoquines que permetran la posterior unió de macròfags i limfòcits i iniciaran la resposta inflamatòria.

L'endoteli vascular activat pot expressar diferents molècules (selectines, citoquines, molècules d'adhesió i factors quimiotàctics) que promouen la migració de monòcits a l'espai subendotelial. La transformació de monòcits en macròfags i la captació de LDL-

oxidases per receptors depuradors presents a la superfície d'aquests comporta la formació de cèl·lules escumoses, que és la primera lesió identificable a la placa ateroscleròtica. Si continua l'estímul, es produeix l'acumulació de macròfags, limfòcits T i mastòcits que permeten la migració de cèl·lules musculars llises (VSMC) i aquestes afavoreixen un augment de la producció de la matriu extracel·lular i, per tant, de la placa que esdevé més fibrosa i més vulnerable (és a dir, susceptible a trencament i trombosi) (Choudhury et al. 2004). La zona necròtica de la placa és altament trombogènica pel seu elevat contingut en factor tissular, i el contacte amb els elements sanguinis promou la formació de la trombina, l'activació de les plaquetes i formació de fibrina, principal constituent del trombe plaquetar oclusiu, causant de la isquèmia i necrosi de l'òrgan o teixit afectat, responsable dels síndromes clínics vasculars aguts (Ross 1999).

Durant les diferents fases de progrés de la placa aterotrombòtica hi ha una resposta inflamatòria a diversos estímuls (tabaquisme, presència de radicals lliures, alteracions metabòliques, infeccions per microorganismes, etc.) que provocaran l'activació de macròfags i de mecanismes apoptòtics. Aquests factors de risc aterotrombòtic poden ser ambientals o amb un significant component heredable. Aquests darrers poden tenir diferents *loci* que determinen els nivells de diferents trets fenotípics en general (per exemple, hipertensió, nivell de lípids, entre d'altres), i tenen una clara implicació en la formació i desenvolupament de la placa ateroscleròtica (Lusis et al. 2004).

Si l'oclusió dels vasos a causa de la placa ateroscleròtica no és total provoca una disminució del flux sanguini que pot provocar l'angina de pit en el cas de trombosi coronària lleu, o de AIT (accident isquèmic transitòri) en l'accident cerebrovascular.

1.4.4. LA CARDIOPATIA ISQUÈMICA

Una de les malalties que n'hem analitzat la implicació de la proteïna GAS6 és la cardiopatia isquèmica. Les malalties del cor i del sistema circulatori en general ocasionen aproximadament la meitat de les defuncions que es produeixen als països europeus; d'aquest grup de malalties, la cardiopatia isquèmica és la causa fonamental de defunció. La cardiopatia isquèmica comporta moltes morts prematures i, a més, atès que l'assistència de les malalties cardiovasculars és cara i prolongada, constitueix també una gran càrrega econòmica a Europa (Dep. Salut Pública Comissió Europea 2005).

La cardiopatia isquèmica pertany al grup de malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic i afecta a les artèries coronàries. Aquesta malaltia és la isquèmia del miocardi, és a dir, la manca de subministrament d'oxigen a la musculatura del miocardi, el que provoca la mort de les cèl·lules i, per tant, una part de l'òrgan deixa de funcionar. Això provoca una disminució del flux sanguini a les artèries coronàries.

Les dues manifestacions clíniques principals de la cardiopatia isquèmica són l'infart agut de miocardi i l'angina de pit. D'una banda, la manifestació més greu de la cardiopatia isquèmica és l'infart de miocardi que és el nom que rep la necrosi aguda del miocardi d'origen isquèmic, generalment causada per l'obstrucció trombòtica d'una artèria coronària. D'altra banda, el terme *angina de pit* designa un concepte clínic definit per les sensacions de dolor, opressió o malestar toràcic que es poden atribuir a una isquèmia transitòria del miocardi ja que es resol en unes hores.

En aquesta tesi hem treballat amb mostres de DNA de pacients que havien patit un infart agut de miocardi i una angina de pit.

1.4.5. LA MALALTIA CEREBROVASCULAR

La malaltia on s'ha analitzat *GAS6* més extensament és la malaltia cerebrovascular. A Catalunya, la malaltia vascular cerebral és la primera causa de mort en dones de més de 65 anys i en homes de més de 75 anys; també és la primera causa mèdica d'invalidesa i la segona de demència. Juntament amb el càncer i la cardiopatia isquèmica és una de les malalties amb més prevalença i morbimortalitat (Dept. Sanitat-Generalitat Catalunya 2005).

La malaltia cerebrovascular és la interrupció del subministrament de sang a qualsevol part del cervell, la qual cosa produeix un dany al teixit cerebral que en molts casos pot ser irreversible atès que les cèl·lules cerebrals poden morir. La interrupció pot ser provocada ja sigui per una hemorràgia o per coàguls de sang al cervell.

La majoria dels accidents cerebrovasculars es deuen a les plaques ateroscleròtiques o als coàguls de sang que obstrueixen el flux sanguini (isquèmia). Aquests casos són aproximadament el 80% mentre que l'hemorràgia al cervell que es presenta si es trenca un vas sanguini o si hi ha una lesió considerable representa el 20% restant (**FIGURA 12**).

Els accidents cerebrovasculars de tipus isquèmic poden ser lleus o greus. L'**atac isquèmic transitori (AIT)** és un "mini accident cerebrovascular" provocat per una interrupció temporal (minuts o hores) del flux de sang cap a una zona del cervell que produeix una breu i sobtada disminució de les funcions cerebrals. Els símptomes es resolen per complet en menys de 24 hores. Per exemple, un coàgul sanguini pot dissoldre's i permetre que la sang flueixi de nou de manera normal.

Si la interrupció del flux sanguini es prolonga en el temps, pot causar una disminució de la funció cerebral irreversible. Els símptomes varien segons l'àrea del cervell afectada i poden incloure canvis en la visió, la parla o la comprensió, vertigen, disminució del moviment o de la sensibilitat en una part del cos o canvis en el nivell de consciència. L'accident cerebral irreversible s'anomena **ICTUS** i les cèl·lules cerebrals de la zona danyada moren (s'infarten) i es causa un dany permanent en aquella àrea del cervell i fins i tot la mort de l'individu.

Seguint el criteri de classificació anomenat TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) (Adams et al. 1993) que permet agrupar l'ictus isquèmic segons les característiques clíniques i els resultats en estudis diagnòstics, els accidents cerebrovasculars de causa isquèmica es poden agrupar segons l'origen:

- ✓ aterotrombòtic: és causat per la formació de la placa aterotrombòtica en algun vas del cervell que queda obturat.
- ✓ cardioembòlic: és una malaltia causada per un èmbol que prové del cor i que viatja fins quedar retingut en un vas del cervell.
- ✓ llacunar: és un infart secundari que té una afectació a algun petit vas, amb una mida inferior a 15 mm.
- ✓ d'origen desconegut: no es coneix la causa que ha produït l'ictus.
- ✓ de causes rares: d'altres orígens com poden ser el càncer, traumatismes, etc.

Els accidents cerebrovasculars de causa hemorràgica intracranial es poden classificar segons la topografia del sagnat en:

- ✓ lobar: afecta als lòbuls del cerebel o als lòbuls frontals, parietal, temporal o occipital del cervell.
- ✓ profunda: localitzada al tronc cerebral, ganglis basals, càpsula interna o nucli dentat del cerebel.
- ✓ cerebelar: no ha pogut ésser classificada perquè afectava a ambdues zones, les regions lobars i les profundes i sense poder precisar la topografia inicial del sagnat.

Una causa molt comuna d'un accident cerebrovascular és l'aterosclerosi, en la qual s'acumulen dipòsits de greix i plaquetes a la paret de les artèries formant plaques. Amb el pas del temps, les plaques comencen a bloquejar lentament el flux de sang. La placa per si mateixa pot bloquejar l'artèria prou per causar un accident cerebrovascular que, en aquest cas és definiria com a aterotrombòtic.

Una altra classificació que es pot realitzar és l'agrupació de diferents subgrups que comparteixen les causes fisiopatològiques de la malaltia, es pot agrupar els ictus hemorràgics profunds i ictus isquèemics llacunars i/o aterotrombòtics (Fazekas et al. 1999, Tanaka et al. 1999).

Amb freqüència, la placa fa que la sang flueixi de manera anòmala, la qual cosa produeix un coàgul sanguini que pot romandre al lloc de l'estrenyiment i impedir que la sang circuli cap a totes les artèries més petites que irriga. Si l'accident s'ha produït per un coàgul que s'ha generat aprop de la zona cardíaca (el coàgul que viatja s'anomena èmbol)

i aquest èmbol ha viatjat fins a una artèria de gran calibre rep el nom d'ictus *d'origen cardioembòlic*. En altres casos, aquest coàgul pot detenir-se en un vas més petit, s'anomena ictus *d'origen llacunar*.

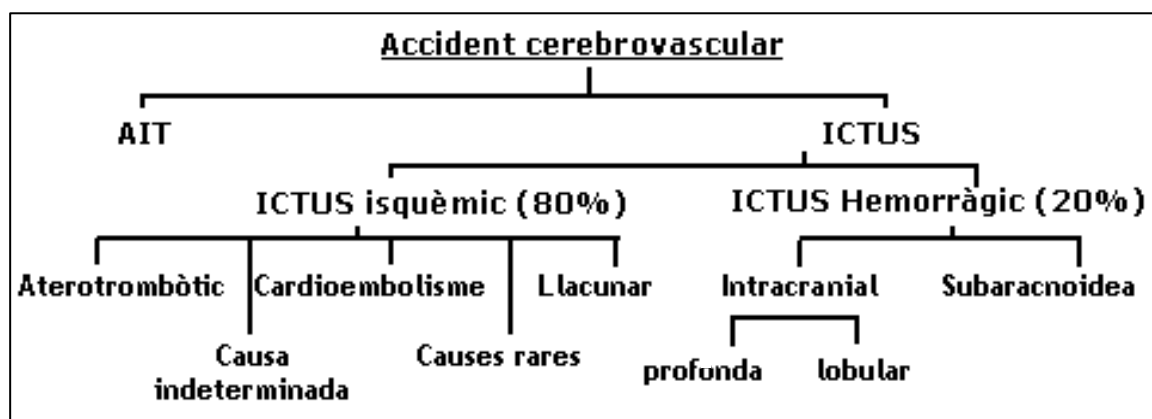
Una segona causa important d'accident cerebrovascular és el vessament de sang al cervell (accident cerebrovascular de tipus hemorràgic) que pot ocórrer quan petits vasos del cervell es debiliten i es trenquen. Algunes persones tenen defectes als vasos sanguinis del cervell que fan que això sigui més probable. La variació del flux de sang després de la ruptura del vas sanguini fa malbé les cèl·lules cerebrals i això produeix l'accident vascular cerebral per absència de l'oxigenació d'aquesta zona.

Hi ha diferents factors ambientals de risc a patir la malaltia cerebrovascular. Entre ells, el fet de tenir pressió sanguínia alta és un dels principals factors de risc que també s'incrementa amb l'edat. Altres factors són els antecedents familiars de la malaltia, el consum de tabac, la diabetis, el colesterol alt i la malaltia cardíaca.

Els diferents estudis genètics que s'ha realitzat fins al moment indiquen que hi ha diversos factors genètics de susceptibilitat a patir la malaltia cerebrovascular, tot i que encara no se n'ha caracteritzat a la majoria (Alberts et al. 2003). No obstant alguns gens ja han estat involucrats en aquesta malaltia, *PDE4D* i *ALOX5AP* (Markus et al. 2006).

FIGURA 12

Classificació dels accidents cerebrovasculars segons la classificació TOAST.



2. OBJECTIUS

Els objectius del present treball han estat:

- Caracteritzar l'estructura del gen *GAS6*.
- Comparar el gen *GAS6* amb gens d'altres membres de la família de proteïnes dependents de la vitamina K.
- Identificar i caracteritzar variants polimòrfiques a *GAS6* en la nostra població.
- Estudiar la importància fisiopatològica de la proteïna *GAS6* mitjançant l'estudi d'associació entre polimorfismes del gen *GAS6* i diferents malalties en les que podria estar implicat, en especial la malaltia aterotrombòtica.
- Analitzar les conseqüències funcionals dels polimorfismes identificats.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. EINES BIOINFORMÀTIQUES

Per iniciar els estudis d'aquesta tesi hem treballat des de la cerca (*in silico*) a les bases de dades, on hi havia relativament poca informació, fins al treball experimental al laboratori per confirmar o caracteritzar les troballes realitzades.

3.1.1. Bases de dades

(Descripció de les bases de dades usades)



GenBank

La base de dades de seqüències *GenBank* del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) recull seqüències de DNA de totes les fonts públiques disponibles. Les seqüències són enviades directament pels laboratoris o adquirides de les bases de dades públiques internacionals, com són l'EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) *Nucleotide sequence database* i la *DNA Database of Japan* (DDBJ) que aporten seqüències humanes. Cada seqüència de DNA és acompanyada de la seqüència de proteïna que se'n deriva i d'informació referent a la font de la seqüència, publicacions, localització cromosòmica i altres informacions rellevants proporcionades pel laboratori que l'envia. La cerca es basa en paraules clau, pot fer-se servir per trobar totes les seqüències disponibles d'interès (*GenBank Database Query Form*: http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html). L'enviament de noves seqüències es fa *online* amb el GenBank a través de la utilitat BankIt a <http://www.ncbi.nih.gov/BankIt/index.html>. Aquesta base de dades ha estat utilitzada per cercar-hi les seqüències del gen *GAS6* humà per comparació amb la del seu cDNA (vegeu l'**APARTAT 3.1.2.**). Els gens *gas6* de rata i ratolí varen identificar-se cercant a la base Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mcw.edu>) i a la Celera Mouse Fragments (<http://cds.celera.com>), respectivament. A més a més el nostre grup hi ha incorporat les seqüències de *GAS6* descrites durant el present treball, tant la del gen en conjunt (BK_001240) com la dels corresponents exons identificats (AY256830-AY256843).

Celera Discovery System

El Celera Discovery System (CDS) és una base de dades de seqüències i dels SNP de diferents organismes



que quan es va iniciar aquesta tesi pertanyia a la companyia privada Celera Genomics (a la qual l'Institut de Recerca Oncològica estava subscript per accedir a la informació sobre

seqüències). Era una plataforma de recerca integrada que permet l'accés *online* a les diferents dades biològiques disponibles, de diferents espècies. Actualment aquesta empresa està fusionada amb altres empreses del sector i forma part de l'empresa Applera Corporation.

dbSNP (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism database*)

Aquesta base de dades de polimorfismes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projectSNP>) és d'accés lliure i recull tots els polimorfismes descrits al genoma humà i d'altres espècies. En un principi només n'incloïa els d'un sol canvi de nucleòtid però actualment ja hi ha polimorfismes de repeticions, petites insercions-delecions i microsatèl·lits, entre d'altres. Aquesta base de dades, a més de la situació exacta del polimorfisme dins del genoma, ens ofereix altres dades com l'heterozigotitat, les freqüències al·lèliques que presenta en les poblacions analitzades i els protocols per la seva anàlisi. Els polimorfismes de *GAS6* que han estat identificats en aquesta tesi s'han introduït a la base i han rebut un número o identificador d'accés concret (vegeu l'**APARTAT 4.4.**). A més, algunes de les variants del gen *GAS6* que estan presents a la base i que s'han considerat interessants, s'han analitzat per observar-ne la freqüència a les poblacions estudiades.

HAPMAP (base de dades d'haplotips)



Aquesta base de dades (<http://www.hapmap.org>) és un projecte internacional que té com a objectiu desenvolupar un mapa dels haplotips del genoma humà que descriu els patrons comuns de la variació de seqüències en el DNA humà en diferents poblacions, per tal d'accelerar la recerca de possibles causes genètiques en malalties humanes. Ofereix la possibilitat de veure el desequilibri de lligament entre diferents SNP d'una mateixa regió cromosòmica i permet visualitzar els principals blocs d'haplotips així com els polimorfismes que els identifiquen (tagSNP). Les dades obtingudes amb aquest projecte són públiques i poden ser utilitzades per qualsevol investigador arreu del món. L'ús d'aquesta base de dades a final de l'any 2005 ens ha permès conèixer quins SNP hi ha en una zona determinada, en 4 diferents poblacions i el grau de LD entre els SNP de la base de dades.

3.1.2. Anàlisi de seqüències



Basic Local Alignment Tools (BLAST)

Els programes BLAST es fan servir per cercar seqüències a les bases de dades de proteïnes i àcids nucleics per similitud de seqüència. Aquests programes comparen una seqüència de proteïna o DNA problema contra totes les seqüències de la base de dades, en qualsevol combinació possible, inclosa la traducció de DNA a proteïna. Els programes BLAST combinen velocitat i sensibilitat i el temps requerit per obtenir els resultats depèn de la seqüència i de la base de dades utilitzada per la cerca. Les noves versions del programa són anomenades *Gapped* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) i admeten petites zones on la seqüència alineada pot ser interrompuda, i d'aquesta manera es poden trobar amb més facilitat similituds de seqüència allà on hi ha petites insercions, delecions o errors de seqüència. Els resultats dels programes de BLAST són presentats com una llista d'alineaments de més a menys identitat entre les seqüències trobades a la base de dades i la seqüència problema enviada, a cadascun dels quals se li assigna un valor E que indica el grau de identitat entre seqüències. Les següents bases de dades del GenBank i de Celera van ser utilitzades en aquest treball amb el *Gapped* BLAST: 1) “non–redundant” (o *nr*), la qual compila seqüències de DNA no redundants o repetitius. És una base de dades de DNA genòmic que comprèn totes les seqüències conegudes, més o menys ordenades i localitzades, que fan referència al genoma d'una determinada espècie; i 2) *htgs* (de l'anglès *human total genomic sequences*), que només té en compte per la cerca les seqüències corresponents a l'espècie humana, encara que també hi inclou DNA redundants.

A més, diferents subprogrames poden ser usats contra diferents bases de dades, com per exemple:

- BLASTn: per comparar seqüències problema de nucleòtids contra una base de dades de DNA genòmic i de mRNA.
- BLASTp: per comparar una seqüència de proteïna contra bases de dades de proteïnes.
- BLASTx: per traduir una seqüència problema de DNA a les sis possibles pautes de lectura i les compara contra les bases de dades de proteïnes.

La nostra cerca de les seqüències relacionades amb el *GAS6* l'hem realitzada bàsicament amb la utilitat BLASTn per comparar les diferents seqüències que disposàvem (els cDNA de *GAS6* d'humà (NM_000820), rata (NM_057100) i ratolí (NM_019521) amb els DNA genòmic no redundants (totes les seqüències que hi ha a les bases de dades que contenen DNA no repetitiu). En humà, les bases consultades foren GenBank i Celera Discovery System (vegeu l'**APARTAT** anterior).

Totes les seqüències objecte d'anàlisi han d'estar en format **FASTA**. Una seqüència en format FASTA comença amb el símbol 'més gran que...' (">") i el text posterior correspon a l'identificador o nom de la seqüència ("ID"). La resta de la línia és descriptiva. Les línies posteriors corresponen a les seqüències que han de ser analitzades, representades pels codis estàndards IUB/IUPAC per a aminoàcids i nucleòtids.

Les unions exó-intró varen ser identificades per la pèrdua de la identitat de seqüència entre el cDNA i la seqüència genòmica consultada, i per la presència dels llocs *consensus* de *splicing* en aquestes regions flanquejants. Tots els resultats amb un valor de $E < 0,001$ es van seleccionar per a la seva anàlisi més detallada.

Anàlisi de predicció de seqüències de *splicing*

Les seqüències completes dels introns i exons més propers als polimorfismes identificats a *GAS6* varen ser sotmeses al programa SpliceView d'accés lliure *online* (<http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html>) que permet predir potencials llocs acceptors o donadors de *splicing* i en dóna uns determinats valors (*score*) per a cada seqüència que detecta com a susceptible.

D'aquesta manera, varen ésser sotmeses les seqüències que contenien els dos al·lels dels diferents polimorfismes. La comparació dels valors (*scores*) obtinguts en analitzar les seqüències normal i variant de cada polimorfisme ofereix una idea del seu possible efecte sobre el procés de *splicing*.

Anàlisi de les seqüències promotores

Per tal de veure si es podia predir alguna regió promotora en el nostre gen d'estudi, *GAS6*, hem utilitzat el programa *Promoter 2.0 Prediction Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>). També hem realitzat l'anàlisi amb el programa *FPROM* de <http://www.softberry.com> que permet predir llocs potencials

d'inici de la transcripció comparant la composició de les seqüències del nostre gen amb les seqüències promotores consensus conegudes. En aquesta anàlisi, els valors negatius indiquen que hi ha una elevada possibilitat que la seqüència sigui una regió promotora. En canvi, els valors positius indiquen que hi ha molta més possibilitat de trobar seqüències promotores que difereixen molt de les seqüències consensus i, per tant, poden ser falsos positius.

Amb l'objectiu d'obtenir una anàlisi completa de la seqüència del gen *GAS6* vam realitzar una cerca *online* per situar les possibles seqüències promotores. Tenint en compte que el gen *GAS6* té una alta similitud amb el gen *PROS1* i que aquest gen no té cap promotor amb la caixa TATA (Schmidel et al. 1990), l'hem analitzat amb el programa de detecció de caixes TATA (http://l25.itba.mi.cnr.it/cgi-bin/wwwHC_TATA.pl) per veure si tampoc hi ha caixes TATA amb alta probabilitat de ser funcionals. També hem realitzat una anàlisi per predir-ne les regions riques en illes CpG que són regions on poden situar-se les seqüències promotores en gens amb carència de caixa TATA. Les illes CpG són importants per la seva capacitat de ser metilades o hipermetilades, i en general es troben en seqüències amb una funcionalitat en la regulació de l'expressió gènica (Robertson 2005). Amb aquesta finalitat s'han utilitzat els programes *CpGPlot* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) i l'aplicació *Human promoter mapping using CpG islands* del *Zhang's Lab: Computational Biology and Bioinformatics Laboratory* (http://rulai.cshl.org/tools/CpG_promoter).

Anàlisi de seqüències repetides

Hem utilitzat el programa RepeatView (<http://l25.itba.mi.cnr.it/cgi-bin/wwwrepeat.pl>) per identificar possibles elements de seqüència repetits, no visibles a simple vista en el gen *GAS6*.

3.1.3. Anàlisis filogenètiques



Les anàlisis filogenètiques i d'evolució molecular de les diferents seqüències de *GAS6* i de les proteïnes dependents de la vitamina K han estat realitzades amb el programa **MEGA** versió 3.1 (Kumar et al. 2004). Aquest programa que permet fer alineaments de seqüència inferint-hi els arbres filogenètics i que està basat en l'alineament **CLUSTAL W**, compara múltiples seqüències de nucleòtids o de proteïna i

mostra el millor alineament possible. D'aquesta manera pot estimar valors de l'evolució molecular de diferents seqüències i testar diferents hipòtesis d'evolució.

3.2. Pacients i controls

Les mostres de DNA que vam utilitzar com a controls per posar a punt la tècnica d'amplificació per PCR i les anàlisis posteriors mitjançant els SSCP dels diferents fragments del *GAS6*, procedien del banc de DNA del nostre laboratori i havien estat obtingudes al llarg dels anys de la sang d'individus anonimitzats que no havien patit cap malaltia trombòtica o relacionada amb malaltia vascular.

Grups inclosos en els estudis d'associació:

Pels estudis d'associació entre polimorfismes del gen *GAS6* i les malalties analitzades es va disposar del DNA i la informació dels següents grups de pacients i controls. En tots els casos els procediments seguits foren aprovats pels comitès ètics dels diferents centres on s'obtingueren les mostres i s'obtingué per escrit el consentiment informat de casos i controls.

1) *Grup de pacients amb la malaltia aterotrombòtica del departament de neurologia de l'Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. Dr. José Villar.*

El grup de pacients consistia en 188 individus no relacionats que han sofert diferents tipus de malaltia aterotrombòtica, d'acord amb un criteri clínic i bioquímic ben definit per l'hospital, en el que s'hi exclouïen pacients amb ictus embòlic o hemorràgic, demència no vascular, malalties psiquiàtriques, neoplàsia activa no cutània (excepte melanoma), insuficiència renal o proteinúria, hepatitis crònica, miopatia, malalties sistèmiques o metabòliques, embaràs, alcoholisme i índex de massa corporal superior a 40 (Munoz et al. 2004). D'aquests pacients 49 havien estat diagnosticats d'infart agut de miocardi, 68 d'angina de pit i 71 d'accident cerebrovascular aterotrombòtic. La mitjana d'edat era de 63,5 anys amb una desviació estàndard de ± 10 anys.

El grup de controls consistia en 110 individus sans no emparentats, sense història de trombosis ni de malalties cardiovasculars i amb una edat similar a la dels pacients.

2) *Grup de pacients amb ICTUS del departament d'ictus de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Dr. Àngel Chamorro i Dr. Víctor Obach.*

El grup de pacients consistia en 656 individus no familiarment relacionats que patien de diferents tipus de malalties cerebrovasculars. Els pacients havien estat admesos a la Unitat d'ictus abans de les 24 h de l'accident cerebrovascular. Un cop a la Unitat es van

realitzar proves CT (*tomografia computeritzada*) i MRI (*imatge de ressonància magnètica*) del cervell per classificar-los com a pacients amb ictus isquèmic o ictus hemorràgic (Chamorro et al. 2005)), essent els primers (ictus isquèmics) a la vegada classificats segons el criteri TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) (Adams et al. 1993) (**FIGURA 12, APARTAT 1.4.5., PÀGINA 44**) en: 457 individus que havien sofert ictus isquèmic i 199 amb hemorràgia intracraneal. El grup control estava basat en una població que comprenia 150 individus sans no emparentats i sense història de trombosi o de malaltia cerebrovascular. Aquests controls són de la mateixa àrea geogràfica que els pacients i, una meitat, han estat escollits per ser l'acompanyant del pacient i l'altra, amb trucades de telèfon a l'atzar. A la **TAULA 3** es descriuen les principals característiques d'aquestes poblacions. S'observa que en el grup de pacients hi ha una major freqüència dels diferents factors de risc.

TAULA 3

Característiques del grup d'ICTUS de l'Hospital Clínic.

^a:valor de P en pacients respecte controls.

	<u>Controls</u>		<u>ICTUS</u>		
	n (%)	<u>Isquèmic</u>	P ^a	<u>Hemorràgic</u>	P ^a
	150	457		199	
Edat (mitjana ± DE)	64,7±9,5	67,4±11,6	0,001	73,1±10,2	<0,001
Homes	75 (50)	199 (65)	<0,001	110 (55)	0,26
Fumador habitual	28 (19)	181 (40)	<0,001	47 (24)	0,009
Hipertensió arterial	36 (24)	288 (63)	<0,001	125 (63)	<0,001
Diabetes mellitus	13 (9)	132 (29)	0,001	43 (22)	0,01
Dislipidèmia	24 (16)	121 (26)	0,03	25 (13)	0,24
Malaltia isquèmica coronària	7 (5)	63 (14)	0,44	17 (8)	0,81

3) *Grup de pacients joves amb ICTUS, del Städtisches Klinikum Ludwigshafen, Heidelberg, Alemanya. Dr. Christopher Lichy.*

Ens van proporcionar mostres de DNA d'un grup de 176 pacients amb accident cerebrovascular dels quals 126 van patir un ictus isquèmic i 50, AIT (accident isquèmic transitori). El grup control constava de 198 individus sans, que no havien patit cap malaltia relacionada amb la patologia aterotrombòtica. Tots els individus d'aquest estudi són menors de 50 anys amb una mitjana d'edat de 35,4 ± 9 anys pels controls i de 40,1 ±

8 anys pels pacients. Els pacients presentaven una diferència estadísticament significativa respecte els controls en els factors de risc ambientals ja coneguts (hipertensió arterial, diabetis, alts nivells de colesterol, entre d'altres). A més, el grup de pacients té una proporció de dones (55%) superior al grup control (41%) (Lichy et al. 2004).

4) Grup de pacients tractats amb anticoagulants orals de la Divisió de Medicina Interna i Cardiovascular del departament de Medicina Interna de la Universitat de Perugia, Itàlia. Dr. Paolo Gresele.

Hem realitzat un estudi cas-control en pacients tractats amb anticoagulants orals (antivitamines K) dels quals uns (casos) han patit complicacions hemorràgiques i els altres (controls) no.

Els grup de pacients amb complicacions hemorràgiques (65 individus) tenen una mitjana d'edat de 70 ± 10 anys i el grup de pacients sense complicacions (51 individus) de 68 ± 10 anys (Castori et al. 2005). També es va analitzar 15 mostres d'individus sans, no tractats amb anticoagulants orals.

5) Grup de pacients amb un infart de miocardi del laboratori de Genètica molecular de l'Institut de Investigació Nefrològica (IRSIN-FRIAT) i Servei de Cardiologia de l'Hospital Central d'Astúries. Dr. Elicer Coto.

L'estudi s'ha realitzat en un grup de 137 homes que han patit un infart de miocardi abans dels 50 anys (45 ± 6 anys) que van ser recollits per la Unitat de Cardiologia de l'Hospital Central d'Astúries. Els 147 controls eren homes sans (sense història de malaltia cardiovascular) donadors del banc de sang o personal de l'Hospital amb una edat mitjana de 43 ± 6 anys (Coto et al. 2003).

6) Grup de pacients amb nefropatia diabètica del departament de nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Dr. Miquel Hueso.

Aquest grup consta de 95 pacients (56 % d'homes) que han patit nefropatia diabètica amb una mitjana d'edat de 64 ± 11 anys. Els respectius controls corresponen a 95 individus diabètics però sense nefropatia (63 % d'homes) amb una mitjana d'edat de $31,7 \pm 10,9$ anys que han estat seleccionats a la mateixa àrea geogràfica que els pacients.

3.3. Mètodes d'extracció d'àcids nucleics

3.3.1. Extracció de DNA genòmic

Quan fou necessària l'extracció del DNA genòmic es realitzà a partir de limfòcits de sang perifèrica, utilitzant el mètode d'extracció salina descrit per Miller (Miller et al.). Partint d'un mínim de 5 ml de sang es realitzà un rentat amb sèrum fisiològic i s'obtingué un precipitat de limfòcits que són llisats per tal de permetre la sortida del DNA del nucli cel·lular. Les proteïnes contaminants són digerides amb proteïnasa K i precipitades amb sals.

Materials

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| ✓ Sèrum fisiològic | ✓ NaCl 5,5 M saturat |
| ✓ Tampó de lisi d'eritròcits (TLE) | ✓ Cloroform |
| ✓ Tampó de lisi de leucòcits (TLL) | ✓ Etanol absolut i etanol al 70% |
| ✓ SDS (dodecil sulfat sòdic) al 10% | ✓ TE (Tris/Edta) 10 mM/0,2 mM |
| ✓ Solució de proteïnasa K (20 ng/ml) | |

TLE:

- 5 ml de Tris 2 M (Sigma) a pH 7,5
- 2,5 ml de MgCl₂ (MERCK) 1 M
- 492,5 ml H₂O_d- MilliQ

TLL:

- 40 ml de NaCl (MERCK) 5 M
- 4 ml d'EDTA 0,5 M
(Boehringer-Manheim)
- 2,5 ml de Tris 2 M (SIGMA) a pH 7,5

Procediment

- Posar de 5 a 15 mL de sang perifèrica en un tub de 50 mL.
- Afegir sèrum fisiològic fins a un volum de 50 mL.
- Centrifugar 10 min a 400 g i a 4°C.
- Decantar el sobrenedant, afegir TLE fins a un volum de 50 mL, agitar suaument i centrifugar 15 min a 1100 g i a 4°C. Repetir aquest pas fins que el sobrenedant es vegi net.
- Decantar el sobrenedant. Aquest precipitat de limfòcits pot guardar-se a -20°C o -80°C.
- Afegir, depenent de la mida del pèl·let, de 3 a 6 mL de la TLL, de 200 a 400 µl de SDS 10% i de 500 a 1000 µl de proteïnasa K. Agitar amb vòrtex fins observar un aspecte homogeni.
- Incubar a 37°C en agitació durant tota la nit.
- Afegir 1 ml de NaCl 5,5M saturat. Agitar 15 s en vòrtex i centrifugar 15 min a 1100 g i a 4°C.
- Traspasar el sobrenedant a un tub net i centrifugar 15 min a 11000 g i a 4°C.
- Traspasar la fase superior a un tub net procurant no arrossegar les fases intermèdia i inferior. Afegir 2 volums d'etanol absolut i agitar amb cura fins a veure aparèixer un precipitat de DNA.
- Agafar la 'medusa' amb una pipeta Pasteur de vidre estèril i eliminar l'excés de sals amb una suau immersió del DNA en etanol al 70%.
- Traspasar la medusa de DNA a un tub net amb 1 ml de TE.
- Resuspendre el DNA per agitació a 37°C durant tota la nit. Afegir més TE en funció de la viscositat de la mostra. Un cop diluït convenientment el DNA, es determina la

concentració mitjançant la lectura, en un espectrofotòmetre, de l'absorbància o densitat òptica (D.O.) de la mostra a una longitud d'ona de 260 i de 280 nm. La lectura de l'absorbància a 260 nm ens permet calcular la concentració de DNA de doble cadena, en mg/ml. Amb el valor obtingut es calcula la concentració del DNA de doble cadena aplicant la següent fórmula:

- $[DNA] = D.O.260 \times \text{factor de dilució} \times (50 \text{ mg/ml DNA} / 1 \text{ D.O.260})$
- La lectura a 280 nm indica la concentració de proteïnes i la relació entre l'absorbància a 260 i 280 nm determina la puresa de la mostra. És aconsellable treballar amb DNAs en què aquest quocient prengui valors entre 1,6 i 2,0.
- Dil·luir les mostres a 50 ng/ μ l com a solució de treball.

3.3.2. Extracció de DNA i RNA de teixit d'artèria coronària

S'ha realitzat l'extracció de DNA i RNA a partir d'artèries coronàries amb placa ateroscleròtica de pacients amb cardiopaties i d'artèries coronàries sense placa que havien estat extretes d'individus que havien estat sotmesos a cirurgia per un trasplantament o alguna intervenció no relacionada amb l'arteriosclerosi. Aquestes extraccions s'han realitzat utilitzant els protocols descrits pels kits d'extracció de DNA (Wizard[®] Genomic DNA Purification kit, Promega) i d'extracció del mRNA total (RNeasy[®] Mini kit, Qiagen).

Per l'extracció del RNA s'ha utilitzat un material fornejat durant tota la nit a 200°C per evitar l'acció de les proteïnes RNases i s'han utilitzat puntes de pipeta amb filtre així com unes micropipetes específiques pel RNA.

La quantitat de mRNA extret d'artèria coronària ha estat molt variable en funció de la quantitat d'artèria inicial de la qual es disposava. En general disposàvem de menys de 10 mg de teixit i hem aconseguit unes extraccions d'entre 0,5 i 2 μ g de RNA total. Quan es realitza l'extracció a partir de l'artèria aterosclerosada amb un gran contingut en placa s'ha de vigilar no agafar el teixit muscular adjacent ja que la separació no és evident.

Purificació dels productes de PCR o RT-PCR

Per netejar els productes d'amplificació obtinguts en les PCR de sals, encebadors i altres components no desitjats, s'han utilitzat protocols dels kits comercials de neteja: *QIAquick PCR purification kit*[®] de QIAGEN i el *StrataPrep[®] PCR Purification Kit* de Stratagene, ambdós basats en l'ús de columnetes amb un polímer que reté el DNA, i que es poden adaptar a la microcentrífuga per fer els rentats i elucions amb H₂O desionitzada.

Amb aquests dos sistemes es poden purificar fragments amplificats de DNA entre 0,1-10 Kb de mida.

3.3.3. Quantificació i determinació de la quantitat dels àcids nucleics extrets (DNA i RNA)

Amb l'objectiu d'obtenir unes extraccions de DNA i RNA de qualitat idònia per ser utilitzades posteriorment, hem establert un llinar de qualitat a partir de les absorbàncies obtingudes per cadascuna de les extraccions.

Així, considerem unes extraccions òptimes per DNA les absorbàncies de $A_{260/280} = 1,7-2,1$ i $A_{260/230} = 2,0-3,0$; en el cas de les extraccions de RNA, les absorbàncies $A_{260/280}$ al voltant de 2,0-2,1. Si el valor és molt inferior ens pot estar indicant que hi ha moltes proteïnes que poden interferir en reaccions posteriors. A la **FIGURA 13** es pot observar la imatge d'una carrera electroforètica de l'extracció de RNA.

FIGURA 13

Carrera electroforètica (80 v 15 min) en gel d'agarosa (lliure de RNases) d'1 μ l del mRNA total extret d'artèries coronàries.



3.4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

L'amplificació de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al. 1988) és actualment un procediment bàsic al laboratori de biologia molecular. Cada fragment que ha de ser amplificat per la PCR requereix una optimització individualitzada de la reacció d'amplificació. Independentment del disseny adequat dels encebadors per cada fragment de DNA, la temperatura d'anellament, el número de cicles o la concentració de reactius com el Mg^{2+} són factors importants que han estat tinguts en compte. El DNA motlle que s'ha amplificat en aquest treball ha estat tant DNA genòmic com el cDNA obtingut per transcripció inversa (**APARTAT 3.9.1.**); en alguns casos s'ha realitzat l'amplificació dels mateixos productes amplificats amb encebadors interns per tal d'obtenir una major especificitat.

Pel que fa als reactius, existeixen molts productes comercials basats en diferents formulacions dels tampons o solucions de polimerases termoestables, amb diferents propietats. Tant l'enzim *Taq DNA polimerase* com la solució tamponant (vegeu els **MATERIALS**) utilitzats en aquest treball han estat de *Roche Applied Science* (Roche Diagnostics). En referència als aparells utilitzats, s'ha disposat majoritàriament dels termocicladors GeneAmp 2400 i 9600 de Perkin Elmer i GeneAmp 9700 dual d'Applied Biosystems.

A continuació es detalla un protocol general, amb modificacions en cada cas dependent del segment de DNA que s'amplifica i de l'aparell termociclador que s'hi utilitza.

Materials

- ✓ Tampó de PCR 10x (100 mM Tris-HCl, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, pH 8,3)
- ✓ dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) a [2 mM].
- ✓ $MgCl_2$ (en cas que sigui necessari afegir-ne més) a [25 mM]
- ✓ Oligonucleòtids (encebadors de la reacció o *primers*) 0,5 μ l a [10 μ M]
- ✓ Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l)

Procediment (vegeu la **TAULA 5** per a condicions específiques de cada fragment amplificat)

- Preparació de la barreja de reacció. Afegir a un tub de 500 µl per a un volum final de 20 µl:

✓ 2 µl Tampó de PCR	✓ 0,5 µl Oligonucleòtids
✓ 2 µl dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) a [2 mM].	✓ 0,1 µl Taq DNA polimerasa
✓ X µl MgCl ₂ (en cas que sigui necessari afegir-ne més) a [25 mM]	✓ Aigua destil·lada (H ₂ O) fins al volum de 20 µl
	✓ Mostra de DNA [50 ng]
- Agitar suaument i fer un pols de centrifuga.
- Col·locar el tub al termociclador on es produirà la reacció d'amplificació i programar l'aparell.

Disseny dels oligonucleòtids encebadors

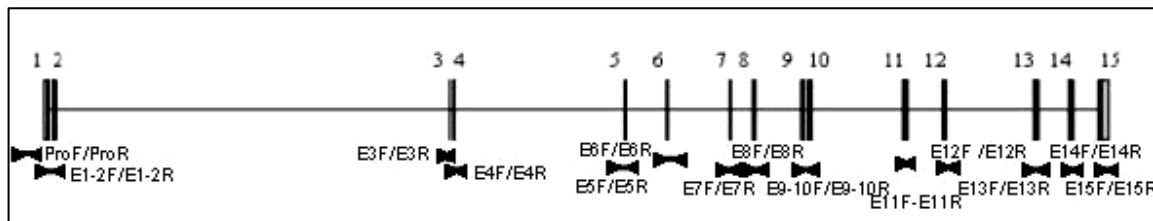
Els oligonucleòtids, de cadena senzilla, utilitzats en les reaccions de PCR han estat dissenyats de manera manual o en algun cas utilitzant algun programa informàtic, com l'Oligo4.0, però sempre comprovat després manualment, tenint en compte que:

- Els oligonucleòtids no poden ser complementaris entre ells, per evitar el seu autoanellament. Aquesta precaució és crítica a l'extrem 3' on qualsevol complementarietat pot conduir a la formació de dímers dels oligonucleòtids.
- Cal intentar que no hi hagi una T(o una A) a l'extrem 3' de l'oligonucleòtid perquè aquest nucleòtid és el menys discriminador i afavoreix alguns aparellaments erronis. Per afavorir l'estabilitat de la unió també és preferible que a l'extrem 3' hi hagi les bases C o G.
- La temperatura d'anellament (T_a) dels dos oligonucleòtids que s'utilitzen en una PCR ha de ser aproximadament la mateixa.

A la **TAULA 4** es descriuen els oligonucleòtids utilitzats i a la **TAULA 5** es descriuen les condicions d'amplificació dels fragments del *GAS6* que han estat analitzats. A la **FIGURA 14** es pot observar la distribució dels oligonucleòtids dissenyats al llarg de gen *GAS6*.

FIGURA 14

Distribució al llarg del gen *GAS6* dels diferents encebadors dissenyats.



TAULA 4

Oligonucleòtids utilitzats per amplificar el DNA genòmic del GAS6 i temps de carrera electroforètica per l'anàlisi dels SSCP dels fragments amplificats.

Nom ^a	Exó	Seqüència d'oligonucleòtid	Posició ^b	pb ^c	SSCPs ^d
ProF (+)	5' UTR	5'- TAT TCC AAG ACA AGA GCC AGA -3'	199- 772	574	4h15m
ProR (-)	"	5'- GCT GCG GCA CCT CAA GCG -3'			
E1/2F (+)	1 i 2	5'- GTC CTC CTT TTA CCC CAT C -3'	553- 1280	728	4h15m
E1/2R (-)	"	5'- GTT CCC CCG CAT CCC GCC -3'			
E3F(+)	3	5'- TCA GAG ACC CTC GTA GT -3'	16715-16900	186	2h30m
E3R (-)	"	5'- TTC CTT CCA AGA GTT AC -3'			
E4F (+)	4	5'- CTG AGT TGG TGG AGG TGG T -3'	18027-18444	418	4h
E4R (-)	"	5'- AAG TTT GGC GAA AAG GGA GC -3'			
E5F (+)	5	5'- GCA GGG GTG GGG CAG TTG AA -3'	24923-25708	786	4h15m
E5R (-)	"	5'- GTG CCG AGG ACA GAC AAG G -3'			
I5F (+)	"	5'- CCC ACC ATC TAC CTC CAC AC -3'	25837-26853	1.017	-
E6R (-)	"	5'- GAA CCC AGC CAG CAG C -3'			
E6F (+)	6	5'- GGA TCT CTT CCT ACC GTA GCC A-3'	26562-26853	292	**
E6R (-)	"	5'- GAA CCC AGC CAG CAG C -3'			
E7bF (+)	7	5'- ACA GTC TGG ATG CGA CCT CT -3'	29075-29623	549	3h45m
E7bR (-)	"	5'- TTG CTG CTC CCC GTC CCT T -3'			
E8F (+)	8	5'- TTC CCT CAA GAA AGA GCC CG -3'	29939-30419	481	3h
E8R (-)	"	5'- TCT CAT CCC AAA CCT CCA CA -3'			
E9/10F (+)	9 i 10	5'- CAG GGG AGC AGG AGT GAA GG -3'	32014-32679	666	3h
E9/10R (-)	"	5'- ATG AAC TAA ACG GGG CAG G -3'			
E11F (+)	11	5'- TGT GGT TTT TCT CAG TTG G -3'	36038-36344	307	3h45m
E11R (-)	"	5'- GCT TCC TGA CAC CGT TCC C -3'			
E12F (+)	12	5'- GCC CGT TTC TGC CGT AGA G -3'	37539-37896	358	3h15m
E12R (-)	"	5'- CTT GCT TTC AGC GTA TGC C -3'			
E13F (+)	13	5'- TCA CCT ACA GGG CAT TTG G -3'	41023-41593	571	2h30m
E13R (-)	"	5'- GGC TTG GCT CAT CAG ACC -3'			
E14F (+)	14	5'- CAT TCA CTA CCA GAA ACC CC -3'	42527-42970	444	3h15m
E14R (-)	"	5'- TGG TCT GAT GGG TGT GGA C -3'			
E15F (+)	15	5'- TGC CTC CTG CTT GTC TGC CG -3'	43619-44344	726	**
E15R (-)	"	5'- CAG CCC CGC TCA TCC CAA ACG -3'			

^a: el nom de l'oligonucleòtid indica la localització i el sentit del mateix (+, directe; -, revers); ^b: la posició es refereix al DNA genòmic del gen GAS6 (BK001240) (Munoz et al. 2004) ^c: nombre de parells de bases que té el fragment amplificat; ^d: temps de carrera d'electroforesi a 600 v en gels d'acrilamida comercial (ExcelGel® DNA Analysis Kit; vegeu l'APARTAT 4.4., PÀGINA 125) (**: gels manuals d'acrilamida 12%, carrera 16-18 h a 300 v).

TAULA 5

Condicions específiques per l'amplificació dels fragments del GAS6 que contenen els exons i les regions intròniques flanquejants

Exó	Primers	condicions de la reacció (volum final de 20 µl) ⁺					Condicions d'amplificació [*]					
		tampó PCR 10X (µl)	MgCl ₂ (25 mM) µl ^{**}	dNTPs (2 mM) µl	encebadors (10 µM) µl (µM)	Taq (5 U/µl) DNA µl (U) (ng)	Desnat. a 95°C s	Anellam. °C	Extensió s a 72°C s			
5'UTR	ProF-ProR	2+9 ^b	-	2	1+1 (0,5)	0,12 (0,6)	75	35	30	57	30	45
1-2	E1/2F-E1/2R	2+10 ^b	-	2	1+1 (0,5)	0,2 (1)	50	32	45	57	30	45
3	E3F-E3R	2	-	2	0,8+0,8 (1,6)	0,09 (0,45)	50	35	30	55	30	30
4	E4F-E4R	2 ^a	1,2	2	0,8+0,8 (1,6)	0,15 (0,75)	50	32	30	59	30	30
5	E5F-E5R	2	-	2	0,8+0,8 (1,6)	0,09 (0,45)	50	20+15	30	61+57	45	60
i5	I5F-E6R	2	-	2	1+1 (0,5)	0,09 (0,45)	50	35	45	62	45	60
6	E6F-E6R	2	-	2	0,8+0,8 (0,4)	0,1 (0,5)	50	35	30	62	30	30
7	E7F-E7R	2 ^a	2,4 (3 mM)	2	1+1 (0,5)	0,1 (0,5)	50	30	30	57	30	30
8	E8F-E8R	2 ^a	1,2 (1,5 mM)	2	0,8+0,8 (0,4)	0,1 (0,5)	25	35	30	57	30	30
9-10	E9/10F-E9/10R	2	-	2	0,8+0,8 (0,4)	0,09 (0,45)	50	35	30	56	30	45
11	E11F-E11R	2	-	2	0,8+0,8 (0,4)	0,09 (0,45)	50	33	30	57	30	30
12	E12F-E12R	2	-	2	0,8+0,8 (0,4)	0,09 (0,45)	50	40	30	62	30	30
13	E13F-E13R	2 ^a	2 (2,5mM)	2	0,8+0,8 (0,4)	0,08 (0,4)	25	35	30	57	30	45
14	E14F-E14R	2	-	2	0,75+0,75 (0,37)	0,15 (0,75)	50	35	30	61	30	45
15	E15F-E15R	2	-	2	1+1 (0,5)	0,1 (0,5)	50	35	30	56	30	30

⁺ Afegiu-hi H₂O fins als 20 µl. * Tots aquests fragments han estat amplificats amb una desnaturalització inicial de 5 min a 95°C i una extensió final de 7 min a 72°C.

^{**} Quantitat de MgCl₂ extra a afegir a la PCR. ^a Tampó de PCR sense MgCl₂; ^b µl de Betaina 4mM afegits.

3.5. Seqüenciació del DNA

La determinació de la seqüència dels productes de PCR s'ha realitzat mitjançant la seqüenciació automàtica d'aquests, utilitzant seqüenciadors i metodologia d'Applied Biosystems. Aquesta tècnica es fonamenta en el mètode de Sanger o dels dideoxinucleòtids (Sanger et al. 1977).

Les reaccions de seqüenciació tenen un format semblant a les de PCR, ja que també es fonamenten en cicles de temperatura de desnaturalització, anellament i extensió, i utilitzen un enzim DNA polimerasa termoestable. No obstant, aquestes reaccions inclouen dideoxinucleòtids que actuen com a finalitzadors de l'extensió i només utilitzen un encebador, la qual cosa implica l'acumulació del producte de forma lineal i no de forma exponencial com a les PCR. Per les reaccions de seqüenciació s'ha emprat el reactiu comercial Big Dye™ Terminator Mix v3.1 (Applied Biosystems) que inclou dideoxinucleòtids marcats amb diferents fluorescències. Els productes d'aquestes reaccions han estat analitzats amb els seqüenciadors automàtics ABI PRISM 377 i 3100 (Applied Biosystems), utilitzant el programa d'anàlisi de seqüències *DNA Sequencing Analysis Software v.5.1*. I les seqüències resultants han estat comparades amb la seqüència normal del *GAS6* (BK_001240) usant el programa Sequencher™ (*GeneCodes Corporation*).

En aquest treball la seqüenciació s'ha utilitzat principalment com a part de la metodologia per caracteritzar l'estructura gènica del *GAS6* i per identificar noves variants d'aquest gen.

Materials

- ✓ Big Dye™ Terminator Mix v3.1 (Applied Biosystems)
- ✓ Producte de PCR purificat (200 ng)
- ✓ Oligonucleòtid encebador (10 µM)

Procediment

- Purificar el producte de PCR de la resta de components de la reacció d'amplificació (dNTPs, oligonucleòtids,...) utilitzant el sistema comercial QIAquick PCR Purification kit® (QIAGEN) segons les instruccions del fabricant.
- Preparació de la barreja de reacció. Afegir en un tub de 200 µl:
 - ✓ 1 µl d'encebador a 10 µM
 - ✓ 200 ng del producte de PCR
 - ✓ 2 µl Big Dye v3.1
 - ✓ H₂O fins a 10 µl

- ✓ Agitar molt suaument amb la μ pipeta i centrifugar 3 s a 10000 g
- Col·locar el tub en el termociclador on es produirà la reacció de seqüenciació i programar:

30 cicles de:	Desnaturalització:	30 s a 95 °C
	Hibridació:	30 s a 50 °C
	Extensió:	2 min a 60 °C

Un cop finalitzada la reacció de seqüenciació, el producte es purifica per gelfiltració en una columna de Sephadex G-50, que elimina els dideoxinucleòtids fluorescents no incorporats al producte:

Materials

Preparació del *Sephadex* G-50:

- ✓ 30 g de Sephadex G-50
- ✓ 300 ml TE 10/1 (Tris 10 mM; EDTA 1 mM)

Agitar suaument durant 30 min a 65°C, canviar tres vegades la fase superior per TE. La darrera vegada canviar per aigua destil·lada.

Tampó de càrrega: 1:5 d'EDTA 50 mM pH 8,0 i formamida desionitzada, respectivament.

Procediment

- Omplir una columna AUTOSEQ G-50 (Pharmacia) amb Sephadex G-50 en TE. Col·locar la columna a dins un tub eppendorf de 1,5 ml.
- Centrifugar a 450 g durant un minut.
- Afegir 10 μ l d'aigua destil·lada.
- Centrifugar a 450 g durant 1 min. Col·locar la columna en un tub nou de 1500 μ l.
- Afegir els 10 μ l de la reacció de seqüenciació.
- Centrifugar a 450 g durant 1 min i recollir el sobrenedant en tub eppendorf net.
- Liofilitzar la mostra al Speed-Vac. Guardar a -20°C fins que s'hagi d'analitzar pel seqüenciador.
- Resuspendre la mostra en 5 μ l de tampó de càrrega. Agitar.
- Desnaturalitzar a 98°C durant 2 min i deixar en gel. Carregar 2,5 μ l de mostra en un gel de poliacrilamida al 6%. Electroforesi a 30W durant 10-12 h a l'aparell ABI 377.

Les dades són recollides i analitzades amb els programes específics per a l'anàlisi de seqüències (*DNA Sequencing Analysis Software v.5.1*) d'ABI PRISM 377 o 3100 (Applied Biosystems).

3.6. Electroforesi

L'electroforesi s'utilitza per separar molècules amb càrrega elèctrica en solució. Es basa en l'aprofitament del moviment que tenen les molècules carregades sota l'acció d'un camp elèctric i en el fet que la seva velocitat de migració és proporcional a la seva càrrega i inversament proporcional a la seva mida. En aquest treball s'ha utilitzat electroforesi en gels d'agarosa i d'acrilamida. Aquesta tècnica s'ha usat amb una finalitat generalment analítica, però en alguns casos també per a fins preparatius, recuperant les molècules extretes del gel.

3.6.1. Electroforesi en gels d'agarosa

L'electroforesi en gels d'agarosa s'ha emprat tant per la separació de molècules de DNA (mida de 70 pb fins a diverses Kb) com de RNA. S'han preparat gels a diferents concentracions d'agarosa, que determinen la dimensió del porus del gel, depenent de la mida de les molècules que es volen separar.

Materials

✓	<i>TBE 10X:</i>	900 mM Tris 720 mM àcid bòric 24 mM EDTA
✓	Diluir 20 vegades amb aigua bidestil·lada per obtenir el TBE 0,5X.	
✓	<i>Tampó de càrrega:</i>	0,25% blau de bromofenol 40% sacarosa
✓	<i>Marcador d'1Kb (INVITROGENE)</i>	

Procediment

- Pesar la quantitat d'agarosa necessària.
 - Dissoldre l'agarosa en TBE 0,5X, per escalfament.
 - Abocar la solució d'agarosa tèbia (50°C) a sobre un motlle horitzontal i col·locar una pinta en un extrem que servirà de motlle per carregar les mostres en el gel.
 - Una vegada el gel està solidificat, es retira la pinta i es submergeix el gel en una cubeta d'electroforesi plena de TBE 0,5X.
 - Afegir tampó de càrrega a les mostres (proporció 1:5; tampó:mostra).
 - Carregar les mostres en els pouets del gel. En un dels pouets s'hi carrega el marcadore d'1Kb, el mateix volum que d'àcids nucleics.
 - Connectar la cubeta a una font de voltatge (70-110 v) i deixar que migrin les mostres fins que el blau de bromofenol, contingut en el tampó de càrrega, indiqui que la separació és adient.
 - Tenyir el gel amb una solució de bromur d'etidi a 0,5 µg/ml durant uns 15 min.
 - Rentar el gel amb aigua per separar l'excés de bromur d'etidi.
- Visualitzar el DNA o RNA en un transil·luminador de llum ultraviolada.

3.6.2. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

Els fragments de DNA resolts electroforèticament en gels d'agarosa poden ser recuperats i purificats a partir del gel, per a poder ser utilitzats en aplicacions posteriors. En primer lloc, es duu a terme l'electroforesi preparativa amb els DNA d'interès en un gel d'agarosa i visualització amb bromur d'etidi.

El DNA d'interès és posteriorment purificat amb l'ajuda del *Agarose Gel Extraction kit* de Qiagen, basat en la utilització de pols de sílice que reté adsorbit el DNA en presència de sals caotrópiques, i permet realitzar els rentats per endur-se les impureses fins al pas final d'elució. S'ha seguit bàsicament el protocol suggerit pel fabricant amb alguna petita modificació.

Materials

- | |
|--|
| ✓ QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) |
|--|

Procediment

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Realitzar l'electroforesi (70-90 v)• Tallar el DNA (banda de DNA d'interès) en el mínim bloc d'agarosa possible, intentant no contaminar-la amb altres fragments, i transferir-lo a un tub eppendorf estèril.• Pesar el tub (prèviament tarat). |
|---|

Seguir el protocol descrit en el QIAquick Gel Extraction kit i seguir les recomanacions del fabricant per obtenir el producte final de PCR amplificat.

3.6.3. Electroforesi en gels de poliacrilamida

Aquest tipus d'electroforesi s'ha utilitzat per visualitzar fragments de DNA de mida inferior a 300 pb, per separar fragments de restricció de mides molt similars (diferències menors a 50 pb) i per les anàlisis dels polimorfismes de conformació de la cadena senzilla i l'heterodúplex (SSCP/HD) de fragments fins a 600 pb (tot i que l'òptim és de 200-300 pb), amplificats a partir de DNA genòmic.

Aquest nivell de separació no es pot aconseguir utilitzant gels d'agarosa amb dimensions de porus més grans. Els gels de poliacrilamida es formen per la copolimerització del monòmer d'acrilamida amb l'agent entrecreuador bis-acrilamida.

Aquesta polimerització requereix la presència d'un iniciador, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), i un catalitzador, el persulfat d'amoni (APS). La porositat dels gels de poliacrilamida és determinada per la proporció relativa: acrilamida-bis-acrilamida i per la concentració global d'acrilamida al gel.

En el desenvolupament d'aquest treball, s'han preparat gels amb una proporció acrilamida: bis-acrilamida 29:1 i 19:1 amb percentatges globals del 8-14%, depenent de la mida de les molècules que volem separar.

Materials

<i>Solució d'acrilamida:</i> bis-acrilamida 29:1 o 19:1 al 40% (Farmacia)	
TEMED	tetrametiletilendiamina (SIGMA)
APS	persulfat d'amoni al 1%
<i>Tampó de càrrega (STOP solution):</i>	0,25% blau de bromofenol
	0,25% xilen cianol
	40% sacarosa
<i>TBE 10X</i> (per córrer el gel d'acrilamida s'utilitza TBE al 1X)	
<i>marcador d'1 Kb</i>	
<i>bromur d'etidi:</i>	0,5 µg/ml de bromur d'etidi
<i>Revelador</i> (tinció de plata):	30 g Na ₂ CO ₃ / l
	500 µl de formaldèhid al 37%

Procediment

Per a un gel de 20x20 cm:

- Netejar dos vidres (un de gran i un de més curt) amb aigua i sabó. Deixar que s'assequin i passar-hi etanol. L'etanol impedirà que el gel s'enganxi al vidre i després sigui difícil de treure.
- Col·locar els dos vidres enfrontats i espaiats mitjançant separadors de 0,6 mm. Subjectar-los amb quatre pinces als laterals.
- Afegir en un vas de precipitats el volum de solució d'acrilamida:bis-acrilamida 29:1 o 19:1 al 40% necessari per obtenir la concentració final desitjada, 5 ml de TBE 5x, H₂O fins a 25 ml, 180 µl d'APS al 10% i 20 µl de TEMED. Agitar-ho.
- Immediatament, recollir la barreja preparada amb una xeringa i posar-la lentament entremig dels dos vidres, sense que s'hi formin bombolles.
- Col·locar la pinta, que formarà els pouets on es carregaran les mostres.
- Deixar que polimeritzi 1 hora com a mínim.
- Treure la pinta i les pinces i col·locar el gel en una cubeta d'electroforesi vertical. Omplir el càtode i l'ànode de la cubeta amb TBE 1X. Si es vol córrer el gel a 4°C (perquè la carrera sigui més homogènia), muntar la cubeta a 4°C.
- Afegir 10 µl de tampó de càrrega a les mostres i carregar al gel la barreja (uns 20 µl), juntament amb el marcador d'1 Kb (la mateixa quantitat que de DNA) en un altre pou perquè ens permeti situar les bandes que obtindrem.
- Connectar la cubeta a una font de voltatge (150-400 v) i deixar córrer les mostres el temps necessari per a la separació desitjada.
- Finalitzada l'electroforesi, se separen els dos vidres amb ajut d'una falca, procurant que el gel quedi adherit a un dels dos vidres. Es recupera el gel unit al vidre.

Tinció: s'ha utilitzat dos tipus de tincions diferents, la de bromur d'etidi, que és menys laboriosa però també menys sensible (detecta quantitats > 50 ng), i la tinció amb nitrat de plata, que a part de ser molt més sensible permet guardar el gel.

Amb solució de **bromur d'etidi:**

- Submergir el gel en una solució de bromur d'etidi (0,5 µg/ml) durant uns 15 min.
- Rentar el gel amb aigua per eliminar el bromur d'etidi en excés.
- Visualitzar el DNA en un transil·luminador de llum ultraviolada.

Amb **nitrat de plata:**

- i. *Fixació:* submergir el gel en etanol al 10% durant 5 min en agitació.
- ii. *Oxidació:* submergir el gel en àcid nítric al 1% durant 3 min en agitació.
- iii. *Rentat:* submergir el gel en aigua bidestil·lada durant 10 s. Repetir el rentat.
- iv. *Tinció:* submergir el gel en solució de nitrat de plata (2 g/l) durant 20 min en agitació.
- v. *Rentat:* repetir el pas (iii).
- vi. *Revelat:* Afegir solució de revelat a sobre del gel fins a cobrir-lo i agitar uns 20s. Llençar aquest revelador que s'ha saturat. Afegir de nou revelador fins que el gel quedi ben submergit, agitar uns minuts fins aconseguir la tinció desitjada. Eliminar el revelador.
- vii. *Aturada:* Submergir el gel en àcid acètic al 10% durant 10 min en agitació.
- viii. *Rentat:* repetir el pas (iii).
- ix. Recollir el gel adherint-lo en un paper Whatman 3 MM. Cobrir-lo amb plàstic i assecat-lo al buit a 80°C (50 min).

3.7. Anàlisi de SSCP

POLIMORFISME DE CONFORMACIÓ DE CADENA SENZILLA I DE L'HETERODÚPLEX (SSCP / HD)

L'anàlisi dels polimorfisme de conformació de cadena senzilla (SSCP, de l'anglès *Single Strand Conformation Polymorphisms*, o SSCA de l'anglès *Single Strand Conformation Analysis*) va ser originàriament descrita per Orita (Orita et al. 1989). Es basa en la tendència que tenen les cadenes senzilles de DNA a plegar-se formant estructures secundàries, determinades per la seqüència de nucleòtids, les quals influeixen en la seva mobilitat electroforètica en gels no desnaturalitzants. La presència d'una mutació origina un canvi conformacional que altera la mobilitat electroforètica i genera un patró de bandes anòmal que no es detecta en els individus control. Alhora també es formen noves molècules heterodúplex (HD), fruit de la renaturalització entre una cadena salvatge i una altra de l'al·lel mutat, que també presenten una mobilitat electroforètica anormal. L'anàlisi dels SSCP pot arribar a detectar un 80% de mutacions, tot i que cal variar les condicions de carrera electroforètica per a cada fragment amplificat per tenir una resolució més àmplia. D'altra banda, malgrat que en aquest treball s'han analitzat fragments de més de 600 pb, l'òptim són 200-300 pb ja que en augmentar la mida dels fragments es perd resolució.

Les reaccions de PCR s'han realitzat tal i com s'ha indicat anteriorment a la **TAULA 5** amb les condicions adequades per a cada fragment concret. Els fragments amplificats per PCR varen ser analitzats per electroforesi horitzontal en gels d'acrilamida al 12,5% en gels comercials (ExcelGel[®] DNA Analysis Kit, Pharmacia Biotech) utilitzant l'equip Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia Biotech) a una temperatura de 5°C. De forma suplementària es van fer servir gels verticals d'acrilamida (29:1) al 10-14% a 4°C (en càmera freda). Els gels eren revelats per tinció de plata, de forma manual o emprant el sistema comercial (DNA Sylver Staining kit[®] (Pharmacia Biotech)) en el cas dels gels horitzontals. Els temps de carrera són diferents per a cada fragment analitzat, intentant, però, visualitzar tant la doble cadena com la simple.

Materials

- ✓ Tampó de càrrega: 95% formamida
- ✓ Solució desnaturalitzant: 20 mM EDTA pH 8,0
0,05% blau de bromofenol
0,05% xilen cianol
10 mM NaOH
- ✓ gels d'acrilamida al 12,5 % (ExcelGel® DNA Analysis Kit, Pharmacia Biotech)

Procediment

- Utilitzar entre 1-4 µl de cada producte de PCR, depenent de la intensitat de la banda visualitzada per electroforesi en un gel d'agarosa al 2%.
- Diluir-los amb solució desnaturalitzant (amb NaOH) 1:1.
- Desnaturalitzar-los 2-3 min a 95°C. Posar-los ràpidament en gel.
- Carregar 6 µl de cada mostra en un gel de poliacrilamida al 12,5% comercial amb 48 pous de capacitat de càrrega. Hem seguit les recomanacions del fabricant a l'hora de la càrrega i la preparació del gel.
- Realitzar electroforesi de tots els productes amplificats a 5°C i 600 v, (les millors condicions per veure possibles canvis), durant 2,5 h - 4,5 h segons el fragment a analitzar (**TAULA 4**).
- Tinció amb plata, emprant el sistema comercial segons les recomanacions del fabricant (Amersham Pharmacia).
- Assecar el gel a temperatura ambient durant una nit i cobrir-lo amb una transparència per a mantenir-lo.
- Comparar el patró de bandes dels fragments analitzats.
- Quan es detecta un patró de bandes anòmal respecte al control per a un dels fragments es caracteritza el canvi mitjançant seqüenciació directa d'un nou producte de PCR.

3.8. Anàlisi dels polimorfismes

3.8.1. Anàlisi de polimorfismes a *GAS6*

3.8.1.1. Digestió amb enzims de restricció

En aquest treball la digestió s'ha utilitzat com a mètode per a comprovar les variants identificades als gens *GAS6*, en els casos en què la variant abolia una diana de restricció o en generava una de nova respecte l'al·lel més freqüent. També s'ha utilitzat aquest mètode per analitzar els genotips d'alguns dels polimorfismes identificats a *GAS6* i *PROZ*, en mostres de diferents poblacions (**TAULA 6**).

Materials

- ✓ BSA (albúmina bovina sèrica)
- ✓ Enzims de restricció
- ✓ Tampó de digestió específic de l'enzim

Procediment

S'afegeix a un tub de 200 µl:

- ✓ Tampó de digestió per una concentració final 1X
 - 1 mg/ml BSA, si la digestió sense BSA no és prou bona
 - 7,5 µl de DNA (producte de PCR)
 - 1-5 Unitats (U) d'enzim (depenent de la capacitat de tall de l'enzim)
 - H₂O bidestil·lada fins a un volum de 20 µl
 - Agitar i fer un pols a la centrifuga.

Col·locar el tub a la temperatura de digestió òptima de l'enzim durant l'estona necessària en cada cas (normalment durant tota la nit, a no ser que l'enzim talli en excés). Guardar a 4°C o visualitzar per electroforesi en gel d'agarosa o acrilamida si es formen fragments molt petits o similars.

TAULA 6

Polimorfismes analitzats utilitzant enzims de restricció.

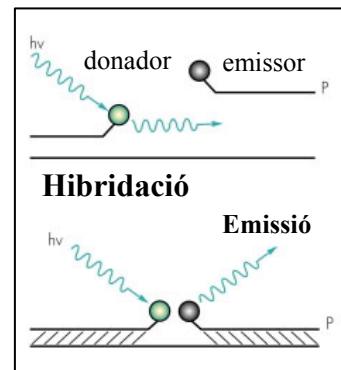
Polimorfisme	Oligo.	Enzim	Ta*	condicions digestió (Vfinal= 20 µl)				Mida fragment amplificat		
				Enzim U	Tampó**	BSA(10 ng/µl)	PCR	No dig.	al·lel + freqüent	al·lel - freqüent
<i>GAS6</i>										
c.713-155	T>C	E8F-E8R	65°C	1,25 U	3 (2µl)	0,5 µl	7,5 µl	481 pb	T: 481 pb	C: 427 + 54 pb
c.834+7	G>A	E8F-E8R	37°C	2 U	4 (2 µl)	-	7,5 µl	481 pb	G: 481 pb	A: 345 + 146 pb
c.1332	C>T	E12F-E12R	37°C	1 U	4 (2 µl)	0,5 µl	12,5 µl	358 pb	C: 358 pb	T: 285 + 73 pb
c.1478-94	C>G	E13F-E13R	37°C	1 U	2 (2 µl)	0,1 µl	7,5 µl	571 pb	C: 514 + 57 pb	G: 357 + 157 + 57 pb
c.1869	T>C	E14F-E14R	37°C	2 U	4 (2 µl)	-	5 µl	444 pb	T: 289 + 79+76pb	C: 203+86 + 79 + 76 pb
<i>PROZ</i>										
IVS6+76	G>A	PROZF-PROZR	37°C	2U	4 (2 µl)	-	7,5µl	320 pb	G: 320 pb	A: 221 +99 pb

* Incubació durant tota la nit. ** Tampó corresponent a cada enzim (New England Biolabs®), Oligo: oligonucleòtids encebadors de la reacció.

3.8.1.2. Anàlisi de polimorfismes amb QF-PCR (LightCycler[®])

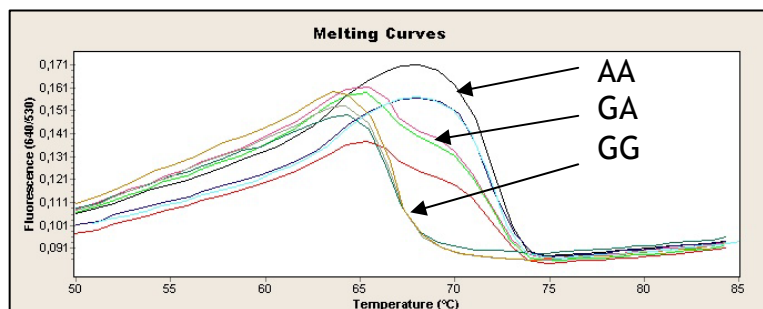
La utilització de les sondes FRET (de l'anglès *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) en un aparell de PCR a temps real (LightCycler[®], Roche Diagnostics, Manheim, Alemanya) per genotipar els SNP és un procediment ràpid i senzill que presenta avantatges considerables per l'anàlisi de moltes mostres en front dels mètodes més tradicionals com els enzims de restricció. Aquesta plataforma d'anàlisi (LightCycler[®]) es fonamenta en l'ús de capil·lars que permet augmentar molt la superfície on es realitza la reacció i per l'escalfament de l'aire es pot produir la reacció molt més ràpidament que en una PCR convencional. Atès que el nostre grup està duent a terme estudis d'associació al·lèlica està molt interessat en el desenvolupament d'aquests mètodes de genotipació de mitjà rendiment.

FIGURA 15
Funcionament de les sondes FRET.



Dues sondes FRET ('anchor', d'ancoratge; i 'sensor', específic del polimorfisme) són específiques a dues seqüències contigües al DNA a analitzar. Una de les sondes està marcada a 3' amb un fluoròfor donador, l'altra amb el receptor a 5' i estan separades per 2 o 3 nucleòtids. Quan les sondes no s'uneixen a la seqüència diana, no es detecta cap senyal de fluorescència; en canvi, si s'uneixen a la seqüència, la proximitat entre les dues sondes permet la transferència d'energia des del donador al receptor i com a resultat es detecta un senyal fluorescent (**FIGURA 15**).

FIGURA 16
Corba de fusió de la sonda sensor específica per un al·lel polimòrfic del GAS6.



Augment de temperatura de 50°C a 85°C i detecció de la fluorescència (RED 640) a una rampa de 0,1°C/s. En aquest exemple, la sonda sensor s'ha dissenyat complementària a l'al·lel A.

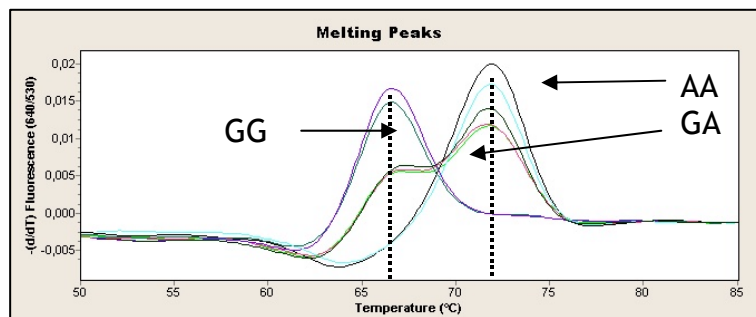
La quantitat de senyal és proporcional a la quantitat de seqüència diana i pot ser mesurat durant la PCR, a temps real.

En acabar el procés d'amplificació es realitza una procés de dissociació de la sonda: desnaturalització, renaturalització inespecífica a baixa temperatura i una lenta desnaturalització.

La temperatura de fusió (T_m , de l'anglès *melting*) de la sonda sensor és aquella a la que un 50% de les molècules s'han deshibridat i desnaturalitzat i aquesta, dependrà de la força d'unió al motlle la qual, al seu torn, és menor o major segons l'al·lel amplificat (*mismatch* (no aparellament complet)) o hibridació completa (al·lel pel qual la sonda ha estat dissenyat). Al final, s'obté un gràfic com el que es mostra a la **FIGURA 16**, en la que es distingeixen clarament els tres possibles genotips gràcies a la representació de les diferents temperatures de desnaturalització de cadascun del al·lells. Per tal de genotipar més fàcilment les mostres es realitza la segona derivada d'aquesta corba i s'obté un gràfic semblant a la **FIGURA 17**.

FIGURA 17

Segona derivada de la corba de fusió de la **FIGURA 16**.



Diferents genotips obtinguts en l'anàlisi. * T_m del fragment amb al·lel específic (A) per sonda sensor: 72°C; * T_m del fragment no específic (G) (una base no hibridada amb la sonda sensor): 66°C.

La mida més adequada per amplificar fragments en aquest termociclador (LightCycler[®] v2.0) oscil·la entre els 100 a 500 pb, tot i que es treu més rendiment a l'aparell quan més petita és la mida del fragment perquè permet disminuir temps en el procés d'amplificació (i s'arriba a poder fer una PCR d'un fragment de 150 pb en uns 30-40 minuts). Les sondes (**TAULA 7**) han estat sintetitzades per TIB MOLBIOL (<http://www.TIB-MOLBIOL.de>). En alguns casos els dissenys de les sondes i encebadors també s'ha fet a TibMolBiol i en d'altres l'hem fet nosaltres mateixos amb l'ajuda del programa Oligo 4.0.

Les fluorescències que hem utilitzat per marcar les sondes que hem fet servir són:

- Fluoresceïna que s'uneix a la regió 3' de l'oligonucleòtid.
- Red640 que s'uneix a la regió 5' de l'oligonucleòtid.

Entre la sonda específica del polimorfisme (sonda sensor) i la sonda d'ancoratge a la seqüència (sonda anchor) hi ha d'haver entre 4 i 6 graus de diferència en els valors de la temperatura de fusió. La sonda anchor ha de tenir el valor més elevat per tal que es desprengui més tard i puguem assegurar que la temperatura de fusió mesurada és la de la sonda sensor.

Materials

- ✓ Sondes específiques per a cada fragment (sensor i anchor) a 4 μM
- ✓ Oligonucleòtids encebadors de la reacció a 10 μM
- ✓ LightCycler™ Fast Start DNA MasterHybridization Probes kit (Roche Diagnostics)
- ✓ MgCl_2 (25 mM)

Procediment

Per tal d'amplificar els diferents fragments que contenen el polimorfisme que volem genotipar s'han utilitzat diferents encebadors que es mostren a la **TAULA 7**.

Les reaccions contenen (en un volum final de 10 μl ajustats amb H_2O):

- 4 mM de MgCl_2
- 0,3 μM de cada encebador
- 0,2 μM de cada sonda d'hibridació
- 1 μl de 10X Fast Start DNA MasterHybridization mix
- 10 ng de DNA

que es barreja amb una suau centrifugació prèvia a l'inici de l'amplificació.

TAULA 7

Genotipació dels SNP de GAS6 analitzats mitjançant LightCycler®.

Polimorfisme	Oligonuc. ^a	Seqüència	Amplificació ^b	Fusió	Al·lel espec.	Al·lel alternatiu
						<i>T_m</i>
c.280+170 C>G	Anchor	5'-AACACAAGTTTCTCTGTTTATTTTAT-fluoresceïn-3'	2 s 95°C	20 s 95°C	61°C	56°C
	Sensor G	5'-LCRed640-CCACAGCTTTATTCCTGTTAGTGG-3'	8 s 55°C*	30 s 45°C		
	Directe	5'-CAAGATACTTAGGTAAGTCTCAA-3'	13 s 72°C	0 s 95°C**		
	Revers	5'-AACTCAGAGAAGGGTTTGC-3'				
c.712+26 G>A	Anchor	5'-CGGTCACCCCTCACITTTCTCTGAC-fluoresceïn-3'	3 s 95°C	20 s 95°C	67°C	62°C
	Sensor A	5'-LCRed640-CCCAAAGTCTAGACACGGGTGCCAG-3'	5 s 61°C*	30 s 45°C		
	Directe	E7F	22 s 72°C	0 s 95°C**		
	Revers	E7R				
c.834+7 G>A	Anchor	5'-GGGGCCCTCAAAGCTGTCCCAGGACAT-fluoresceïn-3'	5 s 95°C	20 s 95°C	71°C	65°C
	Sensor A	5'-LCRed640-GACACCTGTGAGGTAGGCAGCCCC-3'	10 s 57°C*	30 s 45°C		
	Directe	E8F	22 s 72°C	0 s 95°C**		
	Revers	E8R				
c.1263 G>C	Anchor	5'-GACTGTATCATCTGAACCTCACCCGTGG-fluoresceïn-3'	2 s 95°C	20 s 95°C	65°C	59°C
	Sensor C	5'-LCRed640-GGTATTCCCTTCCATGAGAAAGACCTTCGTG-3'	10 s 57°C*	30 s 45°C		
	Directe	5'-CCCTTCAGAACGTGCCTCC-3'	14 s 72°C	0 s 95°C**		
	Revers	5'-CGTCTACACAGGGACAGGTACAGTAC-3'				

^a: Oligonucleòtids (sonda: anchor i sensor; encebador: directe i revers).

^b: Desnaturalització inicial (600 s a 95°C) seguit de 45 cicles d'amplificació (rampes de transició a 20°C/s).

* Mesura de fluorescència puntual; ** Mesura de fluorescència contínua (rampa d'augment de temperatura de 0,15(°C/s)).

3.8.1.3. Anàlisi del polimorfisme c.600+304-377del de l'intró 5 del GAS6

El polimorfisme c.600+304+377del identificat a l'intró 5 de *GAS6* ha estat analitzat per electroforesi en un gel d'agarosa al 2,5 % del producte de 713 pb o 786 pb, depenent l'absència o presència de la deleció respectivament, que s'obté d'amplificar per PCR amb els oligonucleòtids (encebadors) E5F-E5R (**TAULES 4 i 5**).

3.8.2. Anàlisi d'altres polimorfismes

Tres dels gens físicament propers al gen *GAS6* a la regió 13q34, són els dels factors de la coagulació factor VII i factor X (*F7* i *F10*) i el de la proteïna Z (*PROZ*).

3.8.2.1. Anàlisi del polimorfisme de *PROZ*

El genotip per al polimorfisme IVS6+76G>A (o també anomenat c.573+76G>A) al gen *PROZ* s'ha determinat per anàlisi de restricció amb l'enzim *Hpa* I d'un fragment de DNA de 320 pb corresponent a part de l'exó 6 i l'intró 6 on s'hi localitza el polimorfisme, seguint el mètode descrit per Lichy (Lichy et al. 2004).

També s'ha realitzat la genotipació d'aquest polimorfisme mitjançant l'anàlisi dels SSCP del fragment amplificat amb els primers PROZF i PROZR que han permès realitzar una comprovació alternativa de la genotipació per digestió enzimàtica. Aquesta anàlisi ha estat realitzada seguint el procediment de l'apartat anterior, amb gels manuals d'acrilamida (29:1) al 12% amb 13 hores de carrera a 4°C.

Materials

Per a l'amplificació del fragment analitzat s'utilitzaren els següents materials :

✓ Oligonucleòtid directe:

PROZ-F: 5'-TAACACCATAGACAGAGTCCGATATTCGC -3'

✓ Oligonucleòtid revers:

PROZ-R: 5'-ATGAACTCGGCATTAGAACATGGTTGGAA -3' (Lichy et al. 2004; Zhao 2004).

✓ Enzim *Hpa* I (3 U/μL) amb el tampó corresponent (NE buffer 2, NE Biolabs).

✓ Agarosa al 2,5%.

Procediment (descriu a la **TAULA 6**)

3.8.2.2. Anàlisi del microsatèl·lit D13S285 lligat a *F10* i *F7*

L'anàlisi d'aquest marcador s'ha realitzat per PCR amb primers fluorescents i l'anàlisi al seqüenciador ABI 310, seguint el protocol que havia estat descrit anteriorment (Kimura et al. 1999).

Materials

Oligonucleòtid directe:

✓ **D13S285F**: 5'-ATA TAT GCA CAT CCA TCC ATG -3', marcat amb fluorescència HEX.

Oligonucleòtid revers:

✓ **D13S285R**: 5'-GGC CAA AGA TAG ATA GCA AGG TA -3', no ha d'estar marcat amb fluorescència per tal de tenir un eficiència d'amplificació major.

✓ Taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics)

✓ dNTPs (2 mM)

Procediment

Realitzar la PCR a les condicions estàndard d'amplificació (**APARTAT 3.4.**):

Desnaturalització inicial de la mostra:	5 minuts a	95 °C
Amplificació de 30 cicles:	30 s de desnaturalització a	95 °C
	30 s d'hibridació a	57 °C
	30 s d'extensió a	72 °C
Extensió final:	7 minuts a	72 °C

Un cop amplificat el producte, preparem: 0,5 µl del producte de PCR + 0,5µl de tampó de càrrega + 0,5 µl de marcador estàndard (TAMRA 500) que indica diferents bandes corresponent a mides entre 80 i 108 pb) i ho separem per electroforesi capil·lar amb l'equip ABIPRISM 310. Els resultats s'analitzen amb els programes GeneScan® Analysis Software i Genotyper®v2.5 (Applied Biosystems).

3.9. Anàlisi d'expressió del mRNA de *GAS6*

La transcripció inversa (RT, de l'anglès *reverse transcription*) seguida per la PCR és la tècnica més comuna emprada per analitzar l'expressió de mRNA obtingut de diverses fonts. La RT-PCR en temps real és altament sensible i permet la quantificació de transcrits rars o pocs comuns i la detecció de canvis petits en l'expressió gènica. Aquesta tècnica proporciona la precisió necessària i produeix resultats de quantificació fiables, així com ràpids.

3.9.1. Transcripció inversa

La transcripció inversa és la síntesi de DNA, a partir d'un motlle de RNA, duta a terme per l'enzim transcriptasa inversa. En el nostre cas s'ha usat la transcriptasa inversa murina que es troba al First Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia Biotech).

Materials

First Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia Biotech):

- ✓ Bulk first Strand cDNA Mix
- ✓ Solució DTT (ditiotreitòl 200 mM en solució aquosa)
- ✓ pd (N)₆ (hexàmers de desoxinucleòtids a l'atzar a 0,2 µg/µl en solució aquosa)

Procediment

- Aliquotar 0,5-1 µg de RNA total en un tub i s'hi posa fins a un volum final de 8 µl d'aigua lliure de RNAses. Aquest tub s'incuba durant 10 minuts a 65°C.
- Deixar el tub en gel i afegir-hi:
 - 5 µl de Bulk first Strand cDNA Mix (que conté l'enzim)
 - 1 µl de DTT
 - 1 µl pd(N)₆
- Incubar durant 1 hora a 37 °C

Per realitzar aquest estudi disposàvem dels RNA d'artèria coronària d'individus control i d'individus amb placa d'ateroma dels quals havíem determinat anteriorment el genotip concret pel polimorfisme c.834+7G>A de *GAS6*. De cadascun dels mRNA (amb mostra suficient) hem realitzat dues RT i els cDNA obtinguts varen ésser utilitzats per

realitzar la reacció de PCR específica pel gen l'expressió del qual es volia analitzar (*GAS6* i els gens de referència escollits).

3.9.2. PCR a temps real

L'anàlisi de l'expressió gènica per RT-PCR a temps real es basa en la detecció dels productes sintetitzats en la PCR mitjançant la incorporació de *SYBR[®]Green I* que, a temps real, s'uneix específicament al solc menor del DNA de doble cadena i emet fluorescència a una intensitat proporcional al nombre de còpies amplificades (Morrison et al. 1998). La quantitat de còpies que hi ha del producte amplificat augmenta a mesura que avancen els cicles de PCR i, per tant, més molècules de fluorescència s'hi uneixen. La recollida de dades (senyals de fluorescència) de la PCR a temps real permet realitzar les anàlisis a la fase exponencial de la reacció amb la qual cosa hi ha més precisió en la quantificació i evita la manipulació post-PCR. L'anàlisi de l'emissió de fluorescència permet determinar el número de cicle on comença la fase exponencial de la PCR. Aquest punt, anomenat "crossing point" (CP) depèn directament de la quantitat inicial de DNA a la reacció. Per tant, quanta més quantitat de DNA inicial posem a la reacció, el CP o la fase exponencial de la PCR començarà abans.

L'elecció del mètode de quantificació depèn de la seqüència objectiu de l'estudi, de la quantitat de mRNA present en el teixit (o del seu grau d'expressió en el teixit), del grau de precisió exigida i de les necessitats de quantificació relativa o absoluta. En el nostre cas hem utilitzat la quantificació relativa, que està basada en l'expressió d'un gen a estudiar (en el nostre cas *GAS6*, definit pel fragment que agafa els encebadors D1 i Cb2, **TAULA 10**) respecte a un gen de referència. Els gens de referència, en principi, són d'expressió constant en totes les mostres. Els que s'utilitzen habitualment són principalment gens del manteniment cel·lular ("*housekeeping genes*") com els de la GAPDH, l'albumina, les actines, les tubulines, la ciclofilina, el 18S rRNA o el 28S rRNA. En el nostre estudi hem utilitzat com a gens de referència el gen de la GAPDH, el gen de la β 2-microglobulina i el gen de la ciclofilina A. La síntesi de mRNA d'aquests gens de referència sembla ser estable en diversos teixits, fins i tot sota tractaments experimentals.

En aquest treball hem realitzat l'anàlisi de l'amplificació a temps real del cDNA de *GAS6* en la plataforma LightCycler[®] (Roche) que inclou el programari necessari per calcular els valors CP i determinar l'especificitat de la reacció mitjançant les corbes de fusió dels fragments amplificats. Amb la utilització del *SYBR[®]Green I*, la incorporació en cada experiment de la corba de fusió permet comprovar l'especificitat del producte

amplificat. Aquesta corba de fusió (*melting curve*) es realitza després del programa d'amplificació de la PCR i consisteix en la incubació del producte amplificat durant uns segons a la temperatura a la que es manté la doble cadena (S2b, **TAULA 8**). S'augmenta la temperatura lentament (una rampa de 0,1-0,2°C/s) fins a 95-98°C quan el fragment amplificat està completament deshibridat. Durant aquest increment de temperatura l'aparell ha de recollir la informació de la fluorescència de manera contínua i així quan es produeixi la desnaturalització del producte amplificat es produeix una pèrdua d'emissió de fluorescència (SYBR[®]Green I). Aquest punt de "no aparellament" amb una temperatura concreta de deshibridació, és específic per a cada fragment de DNA amplificat. Cal assegurar-se que no s'està amplificant algun altre fragment inespecífic de la reacció, el qual es detectaria per la presència d'un altre pic de pèrdua de fluorescència a una temperatura diferent a l'esperada. Aquesta especificitat també pot ser confirmada mitjançant un gel d'agarosa on s'ha visualitzat una banda corresponent a la mida correcta, a més a més d'haver comprovat anteriorment per algun mètode directe (seqüenciació, per exemple), que el fragment amplificat és el desitjat (**FIGURES 41-44**).

Materials

- ✓ *LightCycler[®] Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics)*
- ✓ MgCl₂ (25 mM)
- ✓ Encebadors (10 µM)

Procediment

Posar en la barreja de la reacció (9 µl) per a cada capil·lar:

- ✓ 0,8 µl MgCl₂ (3 mM) pels fragments que amplifiquen *GAS6*, *B2M*, *GAPDH* i *ciclofilina A*.
- ✓ 0,3 µl de l'encebador directe (0,5 µM) i 0,3 µl del revers (0,25 µM)
- ✓ 1 µl de *LightCycler[®] Fast Start DNA Master SYBR[®]Green I*
- ✓ H₂O fins a 10 µl de volum final de reacció al capil·lar

Un cop afegida la barreja de la reacció a cada capil·lar, afegir-hi 1 µl de cDNA (dilució 1/10 de la RT a partir de 1 µg de RNA de la mostra a analitzar), tancar i centrifugar els capil·lars.

El volum final de reacció en el capil·lar és de 10 µl.

Colocar-ho en el rotor de l'aparell *LightCycler[®]*

En iniciar l'anàlisi és necessari calcular primer l'eficiència (relació entre CP i quantitat inicial de mRNA) de cada reacció de PCR per a una parella d'encebadors concreta. L'eficiència de la reacció de PCR pot canviar segons la procedència del RNA (teixits, línies cel·lulars); per tant, cal fer una corba patró per a cada tipus de RNA que utilitzem.

Per calcular l'eficiència de la reacció vam fer una barreja de 1,5 µg de RNA (amb 0,5 µg de RNA amb genotip GG, 0,5 µg de RNA amb genotip GA i 0,5 µg de RNA amb genotip AA d'individus control). A partir d'aquest RNA es va fer la transcripció inversa i es va obtenir el cDNA necessari per realitzar l'amplificació per PCR. Es realitza una sèrie de dilucions seriades amb factor 5. L'eficiència de la reacció es calcula a partir del pendent d'aquesta corba segons la fórmula: $E=10^{[-1/\text{pendent}]}$ (Pfaffl 2001). Aquesta corba patró (**FIGURES 41-44**) permet observar a quina dilució es pot treballar perquè siguin fiables els resultats obtinguts (Pfaffl 2001; Pfaffl et al. 2002).

Les condicions d'amplificació dels diferents fragments de cDNA de *GAS6* i els gens de referència inclosos a l'estudi els hem aconseguit estandarditzar i es mostren a la **TAULA 8**. A la **TAULA 9** es poden veure els oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació.

TAULA 8

Condicions d'amplificació dels diferents fragments de cDNA per l'estudi d'expressió.

Tipus:	<u>Quantificació</u> (40 cicles)				<u>Fusió</u> (confirmació del producte)		
Segments:	<u>S1</u>	<u>S2a</u>	<u>S2b</u>	<u>S2c</u>	<u>S3a</u>	<u>S3b</u>	<u>S3c</u>
T ^a diana	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	95 °C	60 °C	98 °C
Temps incubació	10'	2"	8"	15"	0"	30"	0"
Rampa transició T ^a (°C/s)	20	20	20	20	20	20	0,15
Adquisició Fluorescència (640 nm)	No	No	No	puntual	No	No	Contínua

S: segments de la reacció; 1: desnaturalització del cDNA i activació de la hot start polimerasa; 2: cicle d'amplificació (a: desnaturalització, b: hibridació, c: extensió); 3: procés de fusió (a: desnaturalització, b: renaturalització; desnaturalització lenta).

A l'aparell LightCycler®v2.0 cada carrera permet fer 32 reaccions en capil·lars (les noves versions d'aparells de PCR quantitatives fluorescents ja són de molt més alt

rendiment, fins a 384 reaccions en plaques). Cada reacció (amb els corresponents encebadors per amplificar un fragment específic, **TAULA 9**) es fa en capil·lars separadament i per duplicat per tal de confirmar els resultats obtinguts. Si aquests valors no difereixen molt, menys de 0,3 cicles, el valor utilitzat per a l'anàlisi serà el valor mig de les dues rèpliques. Si no cal repetir la reacció.

A cada carrera cal posar un control negatiu de la reacció (aigua en lloc de cDNA per veure possibles contaminacions), la dilució de la RT-PCR d'un control intern de la reacció (mostra que coneixem quin CP presenta i que a la majoria dels casos és una dilució 1/10 del pool dels RNA amb els tres diferents genotips), i hi afegim també les dilucions de la RT de les diferents mostres a analitzar. Així, per tal de poder realitzar l'estudi de quantificació relativa, els resultats de cada mostra amplificada del gen diana seran normalitzats per la mateixa mostra (en un capil·lar diferent) amplificada per al gen de referència però en carreres diferents. Els controls positiu i negatiu es posen per a cada gen a amplificar, és a dir, a l'amplificació per a cada parella d'encebadors utilitzats (Butlletí anual d'ABI.Prism, 2001).

TAULA 9

Primers utilitzats per amplificar el cDNA de *GAS6* i dels gens de referència, (+): primer directe o "forward"(-): primer revers.

<u>Nom del fragment</u>	<u>Seqüència de l'oligonucleòtid</u>	<u>Localització amplificada (nts)</u>	<u>Exó</u>	<u>Mida</u>
<i>GAS6</i> (NM_000820):				
D1 (+):	5'-TCAAGGTCAACAGGGATGCT-3'	1312-1331	Exó 11	
Cb2 (-):	5'-CATCCTCGTGTTCACCTTTC-3'	1538-1519	Exó 12	<u>227 pb</u>
E8RT-F(+):	5'-CGGGCGTGGGGGCCTCAA-3'	923- 940	Exó 8	
E8RT-R(-):	5'-GGTGGCCTCCGGCAAAGA-3'	1155-1138	Exó 10	<u>233 pb</u>
Encebadors per a amplificar els gens de referència:				
<i>Ciclofilina A</i> (NM_021130):				
<i>Ciclofilina A</i>				
F(+):	5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG-3'	132-151	Exó 1-2	
<i>Ciclofilina A</i>				
R(-):	5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3'	456-438	Exó 5	<u>325 pb</u>
<i>β2-microglobulina</i> (NM_004048):				
B2M-F (+):	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3'	160-179	Exó 2	
B2M-R (-):	5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'	428-409	Exó 3	<u>269 pb</u>
<i>GAPDH</i> (NM_002046):				
GAPDHF (+):	5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3'	292-311	Exó 3	
GAPDHR (-):	5'-ATGACCTTGCCACAGCCT-3'	737-719	Exó 8	<u>446 pb</u>

Per calcular els *Crossing Points* (CP) de les reaccions d'amplificació s'ha utilitzat el Mètode del Màxim de la Segona Derivada del programa del LightCycler (v4.0) i no el *FitPoint Analysis* perquè el primer dona de forma objectiva els CP mesurats com a l'augment màxim o acceleració de la fluorescència (acostuma a estar a prop de la porció log-linear de la reacció) i així no es depèn d'una anàlisi manual de les dades que sempre pot produir uns certs errors (Fit Point Analysis). Els valors CP que proporciona el LightCycler® ja poden ser utilitzats per l'anàlisi d'expressió gràcies als programes Microsoft® Excel i REST® (*Relative Expresión Software Tool*) (Pfaffl et al. 2002).

Tradicionalment, la quantificació relativa es realitzava amb el càlcul dels ratio d'expressió relativa entre cada mostra individualment, normalment sense correcció per l'eficiència de la reacció d'amplificació.

El programa REST® combina la quantificació i normalització de l'expressió gènica en un sol càlcul i incorpora les eficiències d'amplificació dels gens de referència i diana per corregir les diferències entre les reaccions dels gens que s'estudien. Amb el programa EXCEL es calculen les mitjanes de les rèpliques de les eficiències i dels CP de les mostres analitzades (que han de donar un resultat similar a l'obtingut amb el programa d'anàlisi d'expressió absoluta del LightCycler®). Aquestes mitjanes s'introdueixen a l'aplicació REST que calcula les possibles diferències d'expressió dels transcrits analitzats (**TAULA 10**), i també realitza comparacions entre grups de pacients i control i determina si hi ha diferències significatives mitjançant una prova estadística (Pfaffl 2002).

El gen diana estudiat és *GAS6* amb l'amplificació del fragment resultant dels encebadors D1 (directe) i Cb2 (revers) i ha estat normalitzat amb els gens de referència *Ciclofilina A*, *GAPDH* (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa) i *B2M* (beta-2 microglobulina).

TAULA 10

Equació utilitzada pel càlcul de la ratio de l'expressió gènica.

E: Eficiència de la reacció de PCR. diana: desviació de CP del control menys CP de la mostra del transcrit diana. ΔCP referència: desviació de CP del control menys el CP de la mostra del transcrit de referència.

<p>Ratio d'expressió=</p>	$\frac{(E_{\text{gen diana}})^{\Delta\text{CP}_{\text{gen diana}} \text{ (mitjana control-mitjana mostra)}}}{(E_{\text{gen ref.}})^{\Delta\text{CP}_{\text{gen ref.}} \text{ (mitjana control-mitjana mostra)}}$
-------------------------------	--

El model estadístic *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test*[©] inclòs al programari REST[©] permet trobar diferències en l'expressió entre pacients i controls avaluant l'agrupació de les mitjanes de cada població (Pfaffl 2001; Pfaffl et al. 2002).

Per a aquest estudi hem utilitzat 26 mostres d'artèria coronària, 10 mostres de les quals corresponien a mostres amb placa ateroscleròtica i 16 sense placa amb genotips diversos per al polimorfisme de l'intró 8 de *GAS6* (c.834+7G>A).

3.10. Anàlisis estadístiques

3.10.1. Estudis d'associació

En aquest treball s'han realitzat anàlisis d'associació al·lèlica en estudis cas-control. L'associació al·lèlica és la coincidència d'un factor genètic i un fenotip i la seva anàlisi posa a prova la presència d'una diferència significativa (augment o disminució) de la freqüència del factor genètic en els individus afectes, respecte a la població general.

El manteniment de l'equilibri de Hardy-Weinberg en els genotips de la mostra control s'ha posat com a requisit indispensable per a l'anàlisi de la mostra i aquest equilibri s'ha comprovat mitjançant la comparació de les freqüències genotípiques observades a cada població respecte les esperades segons les freqüències al·lèliques, mitjançant el test de χ^2 . Alguns programes d'estimació de les freqüències genotípiques i d'haplotips també calculen que els polimorfismes estiguin en equilibri de Hardy Weinberg com a pas previ a realitzar un estudi posterior d'efectes d'un determinat genotip o haplotip (com és el cas del programa THESIAS, vegeu **APARTAT 3.10.3.**).

La significació de les diferències al·lèliques i genotípiques en els grups de pacients respecte els seus controls s'ha analitzat mitjançant el mètode estadístic de la χ^2 comparant les freqüències al·lèliques i genotípiques observades dels pacients de cadascuna de les malalties estudiades respecte els valors esperats dels seus controls.

L'associació entre genotips o haplotips i fenotips (patir o no patir la malaltia d'estudi) s'ha analitzat per regressió logística ajustant pels altres factors de risc de la malaltia que són estadísticament significatius en la població de pacients respecte la de controls. Per realitzar aquests càlculs de regressió logística univariant (sense tenir en compte els factors de risc) o multivariant (incloent a l'anàlisi els factors de risc per a cada grup d'estudi), hem utilitzat el *software* SPSS versió 12. S'ha obtingut els valors de les Odds Ratio (OR) i l'interval de confiança (IC) en un 95%. Aquesta anàlisi ens proporciona també valor de P. Inicialment, aquesta anàlisi es va realitzar sota un model d'herència codominant (cada genotip, heterozigots i homozigots per l'al·lel menys comú són comparats amb els homozigots per l'al·lel més comú), dominant (la suma de homozigots per l'al·lel menys comú i dels heterozigots són comparats amb els homozigots per l'al·lel més comú) i recessiu. Després, s'escollí el model recessiu en el que els homozigots per l'al·lel menys freqüent són comparats amb la combinació dels homozigots per l'al·lel més freqüent i els heterozigots.

3.10.2. Anàlisi de desequilibri de lligament

El desequilibri de lligament (LD, de l'anglès *linkage disequilibrium*) és una associació al·lèlica a causa del lligament entre dos loci molt propers. En aquests casos la possibilitat de fenòmens de recombinació entre ells és molt baixa, i tots dos loci són transmesos de forma conjunta. Tot i que hi ha diverses mesures per a quantificar el LD (D' , d , r^2 ,...) (Devlin et al. 1995), en aquest treball, per l'estudi de LD entre els diferents polimorfismes analitzats, hem treballat amb el coeficient de desequilibri (D) que és la diferència entre les freqüències haplotípiques observades i les esperades, i més concretament, hem utilitzat el valor D' que correspon a $D' = D/D_{\max}$.

On D_{\max} és el valor més petit de p_1q_2 i p_2q_1 . Essent p_1 i p_2 les freqüències gèniques dels al·lèls més comuns i, q_1 i q_2 , $1 - p_1$ i $1 - p_2$, respectivament. La D' pot variar entre -1 i 1, havent-hi LD si és significativament diferent de zero. Quan $D=0$ correspondrà a una situació d'equilibri de lligament, essent D dependent de les freqüències al·lèliques a la població i, sobretot, de la distància física entre ells. La seva significació es pot analitzar amb l'estadístic χ^2 .

Aquest coeficient resulta molt útil per comparacions de desequilibri de lligament entre *loci* (Zapata et al. 1995). El LD tendirà a ser menor com més allunyats estiguin dos *loci* i també disminuirà al llarg del temps com a resultat de la recombinació.

Amb l'objectiu de fer tests d'associacions al·lèliques entre 2 *loci* s'ha utilitzat simultàniament diferents programes estadístics de màxima versemblança per tal de comparar resultats i per determinar quin és el desequilibri del lligament existent entre els diferents polimorfismes analitzats:

- **THESIAS** : Hem utilitzat aquest paquet de programes (Tregouet et al. 2004) per determinar el LD entre polimorfismes com a pas previ a l'anàlisi d'haplotips (<http://genecanvas.ecgene.net/>).
- **2LD**: (Zhao 2004) mètode simple que permet calcular el LD entre 2 marcadors polimòrfics; calcula el valor D' i l'error estàndard. S'ha utilitzat per comparar els resultats amb els dels altres programes i per obtenir les freqüències al·lèliques del marcador D13S285.

- **EH** (o EH+) (programa desenvolupat per Jürg Ott; <http://linkage.rockefeller.edu/ott/eh.htm>): permet realitzar l'estudi de LD entre polimorfismes multial·lèlics; en el nostre cas només hem utilitzat aquest programa per calcular el LD entre els al·lels del marcador D13S285 i els SNPs de *GAS6*, i per comprovar que pels SNP dial·lèlics els resultats són equiparables als d'altres programes. Hem utilitzat també una modificació del programa EH (per Jian'An Luan, del grup de Jürg Ott) anomenat **LDtest** però restringit a locus bial·lèlics (*software* no publicat).
- **SNPStats** ((Sole et al. 2006), <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats>): és un nou paquet de programes dissenyat per fer més ràpida i senzilla l'anàlisi d'associació de diferents polimorfismes amb un fenotip concret. L'hem utilitzat per comparar els resultats que hem obtingut amb els altres programes.

3.10.3. Anàlisi dels possibles haplotips determinats pels SNP de *GAS6*

Un haplotip és la combinació d'al·lels de diversos polimorfismes presents en un determinat segment del cromosoma. Si aquesta regió és prou petita, la probabilitat que hi hagi recombinació és molt baixa i, per tant, l'haplotip es transmetrà íntegre a la descendència. Els haplotips es poden definir a partir de qualsevol combinació d'al·lels polimòrfics.

Com que l'estudi que s'ha realitzat és a partir de la genotipació de diferents polimorfismes en individus no relacionats de diferents poblacions i no a partir de famílies o genealogies, no s'ha pogut determinar la fase dels haplotips (a quin cromosoma es troben) per a cada individu i, per això, necessitem determinar els haplotips dels individus mitjançant una anàlisi d'estimació estadística amb el programa d'anàlisi genètica THESIAS (<http://genecanvas.ecgene.net/>) (Tregouet et al. 2004). Aquest mètode fa una estimació dels haplotips presents en la mostra a partir de les freqüències al·lèliques observades de cada polimorfisme. Els models que es plantegen per aquesta inferència són algorismes EM (de l'anglès *Expectation-Maximization*) (Slatkin et al. 1996) per tal de trobar una aproximació numèrica. Aquest algorisme que es troba implementat en diferents programes dona unes estimacions de màxima versemblança de les freqüències haplotípiques. Aquest programa, a més, permet analitzar l'associació entre els diferents

haplotips identificats i un fenotip determinat i avaluar l'efecte de l'al·lel menys freqüent d'un polimorfisme concret, respecte a l'altre al·lel, en un mateix fons haplotípic.

4. RESULTATS

4.1. Caracterització de *GAS6*

Amb l'objectiu d'identificar l'estructura gènica del gen *GAS6* hem realitzat cerques de similitud de seqüència a partir de la seqüència de referència del cDNA de *GAS6* (NM_000820).

4.1.1. Determinació de l'estructura gènica

El punt de partida utilitzat per a la identificació de les seqüències gèniques del *GAS6* va ser el seu cDNA. Qualsevol semblança entre les seqüències de les bases de dades i el cDNA del gen podia ser suggestiu de ser una seqüència associada al gen. Les bases de dades accessibles per realitzar l'anàlisi d'homologia foren GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), l'EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) *Nucleotide Sequence Database* i la base de dades de Celera (vegeu l'**APARTAT 3.1.1., PÀGINA 59**). L'algoritme més popular usat en la cerca d'homologies és el BLAST (vegeu l'**APARTAT 3.1.2., PÀGINA 62**) i s'utilitza el format FASTA per introduir-hi les seqüències. Aquests programes estan integrats en sistemes com l'Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>).

Les cerques inicials (finals de l'any 2001) amb el programa BLASTn a les seqüències del genoma humà amb el cDNA de *GAS6* varen permetre la identificació d'una sèrie de seqüències desordenades de la base de dades de Celera, concretament els contigs **GA_x2HTBKU7WGK**, **GA_x39G1FFYRM8**, **GA_x5YUV32W8MG** (anteriorment amb el nom **GA_x5YUV32VS4F**), **hCG1811217** (anteriorment amb el nom **GA_x5YUV31SQYN**), **GA_x39G1FFYRUN**, **GA_x39G1FFYRMH** i **GA_x39G1FFYRME** (**GA_x5YUV31SQYN**) (**TAULA 11** i **FIGURA 18**). Aquesta nomenclatura s'anava actualitzant cada cop que s'enllaçaven diferents conjunts de seqüències i el nom nou es referia a l'antiga seqüència i la seqüència identificada de nou. Abans de la identificació per part del nostre grup, a la base de dades pública només apareixia el contig '**gi10801406**' que corresponia a la seqüència d'algun exó de *GAS6* però de manera desordenada i amb zones de seqüència sense desxifrar en mig.

Aquests contigs identificats corresponien a seqüències del genoma humà localitzades a la zona més allunyada del centròmer del braç llarg del cromosoma 13, la qual cosa suggeria que podien ser seqüències del gen *GAS6* que ja havia estat descrit que es situava en aquesta zona del cromosoma.

TAULA 11

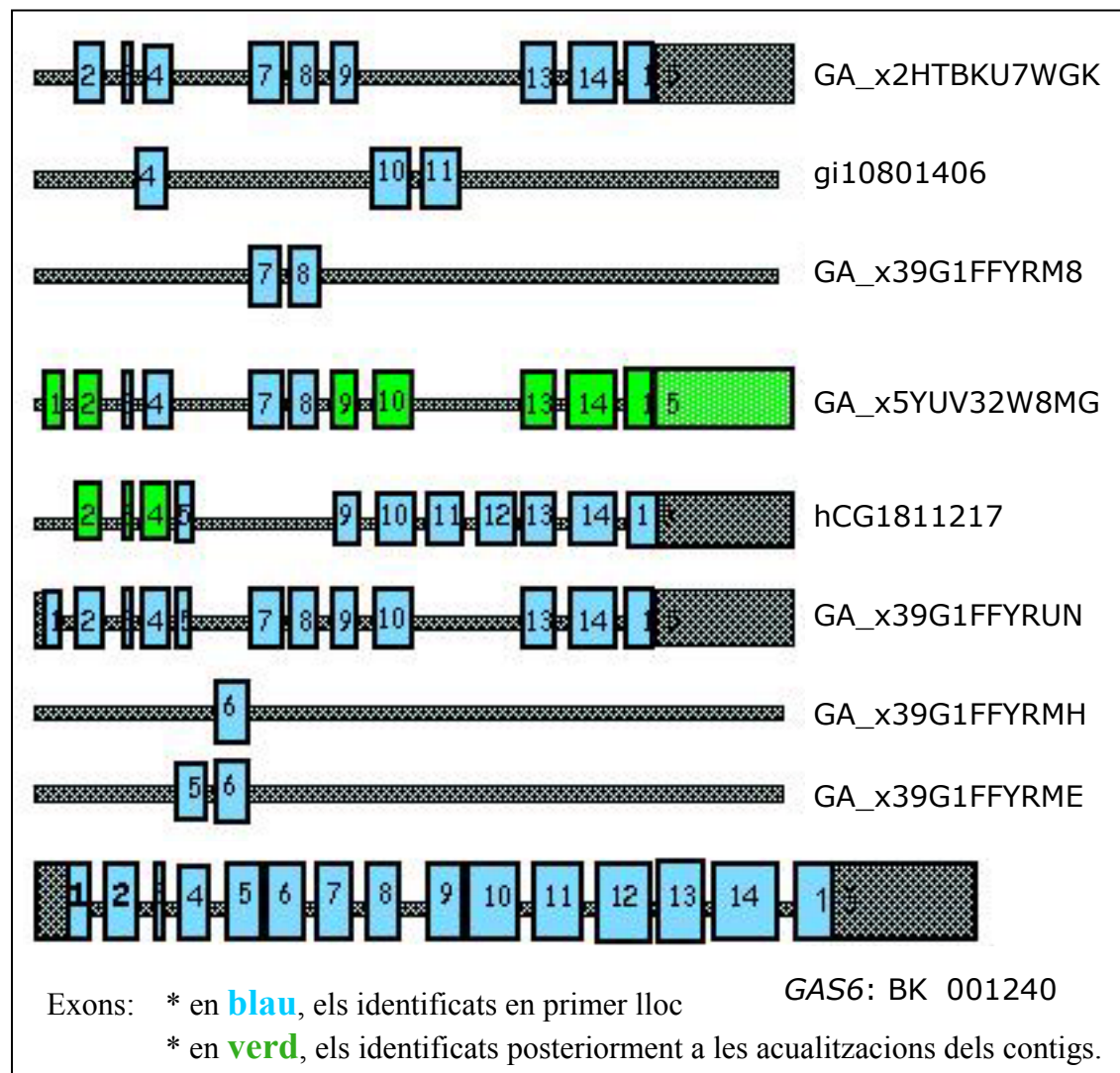
Identificació de contigs que contenen seqüències de GAS6 mitjançant BLASTn. ^a: la identitat de seqüència en aquest cas inclou també algunes regions intròniques flanquejants

Contig	Exó	Identitat ^a	Evalor	Base de dades
gi10801406	4	44/49	2,0	GenBank
(Octubre 2001)	10	162/164	3e-80	
	11	165/165	3e-86	
GA_x2HTBKU7WGK	2	169/169	5e-89	CDS
(Juliol 2001)	3	26/26	0,001	
	4	65/65	5e-27	
	7	125/125	8e-63	
	8	125/125	8e-63	
	9	122/122	5e-61	
	13	176/176	3e-89	
	14	233/233	e-127	
	15	442/449	0,0	
GA_x39G1FFYRM8	7	125/125	4e-60	
(Agost 2001)	8	125/125	4e-60	
GA_x5YUV32W8MG	3	26/26	0,19	
(Agost 2001)	4	65/65	5e-24	
GA_x5YUV32VS4F	7	125/125	9e-59	
	8	125/125	9e-59	
(s'hi afegeix...)	1(5')	49/68	0,003	
Octubre 2002	2	169/169	1e-83	
	9	122/122	2e-56	
	10	194/194	4e-98	
	13	176/176	9e-88	
	14	233/233	e-120	
	15	442/449	0,0	
hCG1811217	5(5')	52/52	2e-16	
(Gener 2002)	9	122/122	7e-57	
GA_x5YUV31SQYN	10	194/194	1e-98	
	11	165/165	9e-82	
	12	169/169	4e-84	
	13	176/176	4e-88	
	14	233/233	e-121	
	15	442/449	0,0	
(s'hi afegeix...)	2	169/169	4e-84	
(Octubre 2002)	3	26/26	0,25	
	4	65/65	7e-24	
GA_x39G1FFYRUN	1(3')	46/46	1e-11	
	2	169/169	8e-83	
	3	26/26	4,6	
	4	65/65	1e-22	
	5(parcial-5')	51/51	2e-14	
	9	122/122	1e-55	
	10	194/194	3e-97	
	11	165/165	2e-80	
	12	169/169	8e-83	
	13	176/176	7e-87	
	14	233/233	e-120	
	15	442/449	0,0	
GA_x39G1FFYRMH	6	123/124	8e-55	
(Setembre 2002)				
GA_x39G1FFYRME	5(3')	52/59	9e-14	
(Desembre 2002)				
(Març 2003)	5	116/123	2e-50	
GA_x5YUV31SQYN	6	125/125	9e-60	

Les darreres cerques a la base de Celera, abans que es fes públic el total de la seqüència del cromosoma 13, indicaven que el possible gen *GAS6* per mètodes matemàtics tenia un total de 12 exons, entre els quals no s'inclouien els exons 1, 5 i 6 atès que eren zones de difícil accés.

FIGURA 18

Identificació de contigs que contenen seqüències de *GAS6*.



L'algoritme que genera el programa BLASTn calcula el valor E (de l'anglès *Expectation*), és a dir, la probabilitat que aquesta seqüència problema sigui idèntica per atzar a les diferents seqüències de les bases de dades que s'hi han alineat. Quan més baix és el valor E més significant és la probabilitat que siguin semblants dues seqüències. En el cas que la mida de la seqüència sotmesa sigui alta (més de 50 pb), hi haurà major especificitat i les seqüències de sortida que ens ofereix el programa seran més semblants a la seqüència problema. Per exemple, pel que fa a l'exó 3 de *GAS6*, com que només té

25 pb ens dona un valor d'E = 0,008 , mentre que l'exó 8, amb 122 pb, obté un valor E= 7e-62; perquè és molt més difícil trobar aquesta seqüència específica a l'atzar en tot el genoma. Les regions flanquejants exó/intró estan definides com els punts als quals les seqüències genòmiques perden la identitat amb el cDNA i es va comprovar que tots els llocs acceptors/donadors de *splicing* segueixen la regla AG/GT.

L'encaix de totes les seqüències identificades corresponents als diferents exons va anar seguida d'una verificació de la seqüència per seqüenciació directa dels productes de PCR que inclouen els diferents exons i les regions flanquejants. Un cop confirmades varen ser sotmeses a la bases de dades GenBank (els números d'accés corresponents a cada seqüència es troben a la **TAULA 12**).

TAULA 12
Organització gènica del *GAS6*.

Exó	Mida (bp)	5'donador <i>splicing</i> ^a	3'acceptor <i>splicing</i> ^a	GenBank ^b	Intró (kb)	E valor
1 ^c	222	tgaggtgCCGCAGCCG...	...CTTGgtgagt	AY256830	0,1	2E-37
2	167	ctccctccgggagCGGC...	...GACGgtgagc	AY256830	15,5	4E-88
3	25	ttctttttccacagGATT...	...TTAGgttaagt	AY256831	1,4	0,008
4	63	ctttctctctgcagACTG...	...CAAgttaagt	AY256832	6,7	4E-26
5	123	gtgtccccaatcagACCT...	...AAAGgtacgt	AY256833	1,5	4E-48
6	123	gtgcttgttcccagATGT...	...CAAGgttaagg	AY256834	2,4	7E-62
7	123	ttttttgcttgcagACAT...	...CGAGgtaccc	AY256835	0,8	7E-62
8	122	ccctgggtggcagATGT...	...TGAGgttaggc	AY256836	1,8	7E-62
9	119	cccgtccgtggcagGACA...	...CCAGgttagg	AY256837	0,1	4E-60
10	190	ctgtgggtgcccagGCTG...	...GACAgtagt	AY256838	3,6	5E-103
11	165	ctgcctctcttcagATCT...	...GCCTgtgagt	AY256839	1,4	9E-86
12	169	ctctgcctttccagATAA...	...TACAgtaagt	AY256840	3,4	4E-88
13	176	cgctttcattgcagTGCG...	...GCAGgtaggg	AY256841	1,2	3E-92
14	229	tegggtctctgcagCTGG...	...CCAGgttaggt	AY256842	0,9	2E-126
15*	445	tccttgccggcccagATGT...	...AAAAtaaaa	AY256843		0,0

^a Les MAJÚSCULES indiquen nucleòtids dels exons i les minúscules dels introns, en **negreta** les seqüències consensus de *splicing*. ^b Número de la seqüència assignat al GenBank. ^c L'exó 1 conté el codó ATG que codifica per la 1a metionina a la posició 135. * L'exó 15 conté el codó d'aturada a la posició 445.

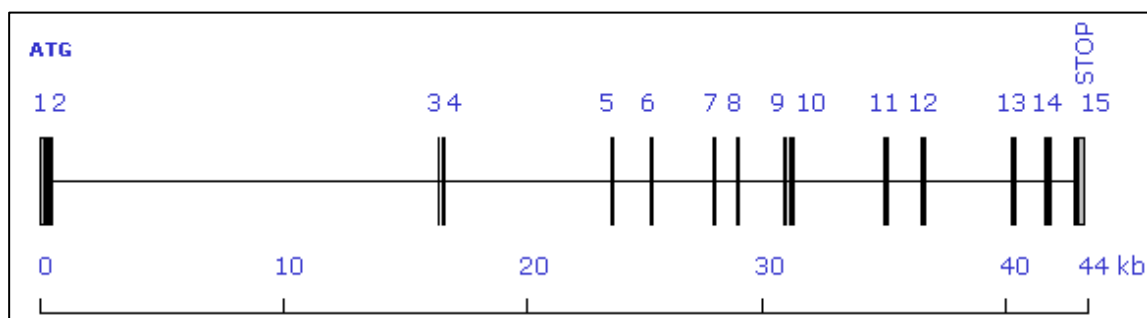
D'aquesta manera s'ha pogut completar l'estructura del gen *GAS6* humà que està format per 15 exons distribuïts al llarg de 43.484 pb (**FIGURA 19**), amb un rang de mides que va des dels 25 pb de l'exó 3 fins a les 445 pb de l'exó 15 (**TAULA 12**).

La seqüència completa del gen *GAS6* amb 45.840 pb (765 pb a l'extrem 5' i 1.591 pb a l'extrem 3') va ser sotmesa a la base de dades pública GenBank i va rebre l'identificador BK001240.

FIGURA 19

Caracterització de l'estructura gènica de *GAS6*.

Les línies verticals corresponen als exons i les horitzontals als introns.



L'anàlisi de l'estructura genètica ens va permetre identificar, en una primera fase, tres regions de repeticions en els introns 5 i 10 (**TAULA 13**).

L'anàlisi de la repetició de l'intró 5 mitjançant els encebadors (I5F i E6R), indica que no és una repetició polimòrfica a la nostra població. Les altres repeticions no s'han pogut analitzar perquè no disposen dels encebadors idonis per amplificar aquella zona.

TAULA 13

Característiques de les repeticions identificades a *GAS6*.

(la localització fa referència a BK001240); N= nombre de repeticions.

Repetició	localització*	pb	N	conservació
Intró 5	25.916 a 26.607	41	17	82%
Intró 10 A	32.651 a 33.108	38	12	99,5%
Intró 10 B	34.775 a 36.058	47	27	92%

D'altra banda, l'anàlisi informàtica de *GAS6* per possibles repeticions, mitjançant el programa RepeatView, ens ha permès detectar elements repetitius en seqüències de DNA diferents a les zones descrites anteriorment (**TAULA 14**).

Tenint en compte totes aquestes seqüències que formen part de zones repetides (més de 8.700 pb), aproximadament el 19 % de la seqüència de *GAS6* correspon a zones de seqüència repetida.

TAULA 14
 Repeticions detectades pel programa
 RepeatView a BK001240.

<u>Zona de</u> <u>Repetició</u>		<u>longitud</u>
5.181	— 6.270	1.090 pb
8.343	— 8.437	95 pb
12.532	— 12.704	173 pb
13.115	— 14.139	1.025 pb
17.132	— 17.351	220 pb
21.607	— 21.666	60 pb
22.591	— 23.445	855 pb
27.872	— 28.582	711 pb
30.570	— 31.227	658 pb
33.237	— 33.326	90 pb
36.493	— 36.829	337 pb
39.565	— 39.888	324 pb

4.1.2. Anàlisi de predicció de seqüències promotores

Amb l'objectiu d'aprofundir una mica més en l'anàlisi del gen *GAS6* del qual n'hem determinat l'estructura, hem realitzat estudis *online* per observar si hi ha zones que presentin homologia amb seqüències *consensus* promotores conegudes. La seqüència analitzada és la BK001240 i considerem el nucleòtid +1 del gen al primer nucleòtid que és transcrit a mRNA.

Així, hem utilitzat diferents programes informàtics que permeten la detecció de possibles regions promotores:

* Amb l'aplicació FPROM ("*human promoter prediction*") de **SoftBerry** (<http://www.softberry.com>), es detecta tres zones susceptibles de ser regions promotores a les posicions -38 pb, +295 pb (a l'exó 1) i 1.007 pb (a l'intró 2) respecte l'inici del gen *GAS6* (**TAULA 15**). No obstant, no identifica cap seqüència *consensus* de ser caixa-TATA en zones pròximes a on està situada la primera ATG (metionina) del mRNA de *GAS6*.

TAULA 15

Resultats de l'anàlisi del FPROM de *GAS6* (BK001240) i 5 Kb a 5' de *GAS6* (NT_077627).

Name: BK001240 test sequence (Length of sequence: 48.484 bp)						
13 promoter/enhancer(s) are predicted						
<u>Posició</u>	<u>GAS6 posició</u>	<u>valor</u>				
<u>prom.</u>						
4962	-38 pb	LDF: +13.273				
6007	1007 pb	LDF: +9.062				
5295	295 pb	LDF: +7.857				
5668	668 pb	LDF: +7.602				
31440	26440 pb	LDF: +2.688	TATA box at	31409	+4.321	TAAATATA
12890	7890 pb	LDF: +2.341	TATA box at	12860	+4.851	CATAAAGC
35625	30625 pb	LDF: +2.110	TATA box at	35594	+5.644	TTTAAAAA
12119	7119 pb	LDF: +0.418	TATA box at	12087	+7.587	CATAAAAA
3926	-1074 pb	LDF: +0.256	TATA box at	3892	+3.514	AATAAAAA
2707	-2293 pb	LDF: -0.021	TATA box at	2676	+5.702	CATATAAA
6334	1334 pb	LDF: -0.103	TATA box at	6302	+5.392	AATAAATG
33160	28160 pb	LDF: -0.704	TATA box at	33115	+5.535	TTTAAATG
23371	18371 pb	LDF: -0.803	TATA box at	23343	+5.912	TTTAAAAA

* Amb el programa de predicció de seqüències promotores *Promoter 2.0 Prediction Server* del **Center for Biological Sequence analysis (CBS)** de la *Technical University of Denmark DTU* (<http://www.cbs.dtu.dk/>), es detecta una zona reconeguda com a possible regió promotora amb la màxima puntuació de tot el gen a la zona de 500 pb de l'inici de

la seqüència BK001240 o a -265 pb de l'inici de *GAS6* (**TAULA 16**). La resta de zones es presenten en una puntuació molt menor i no han estat considerades com a zones d'importància en seqüències promotores.

TAULA 16

Anàlisi de 5Kb a 5' de *GAS6* (NT_077627) i 5 Kb després de l'inici del gen (BK001240) amb el programa *Promoter 2.0 Prediction Server* (<http://www.cbs.dtu.dk>).

Position(pb)	Score	Likelihood	Posició <i>GAS6</i>
1100	1.110	Highly likely prediction	-3.900 pb
1700	0.542	Marginal prediction	-2.200 pb
2800	1.185	Highly likely prediction	-2.200 pb
3400	0.616	Marginal prediction	-1.600 pb
4000	0.570	Marginal prediction	-1.000 pb
4700	1.164	Highly likely prediction	-265 pb
5900	0.534	Marginal prediction	935 pb
6500	0.665	Marginal prediction	1.435 pb
7100	0.526	Marginal prediction	2.135 pb

* Amb el programa de detecció de caixes TATA (http://l25.itba.mi.cnr.it/cgi-bin/wwwHC_TATA.pl) s'ha identificat una única seqüència a 547 pb de l'inici de BK001240 que podria ser la caixa TATA del gen *GAS6* però que es troba lluny de l'inici de transcripció i que no ha estat confirmada en altres anàlisis (**TAULA 17**).

TAULA 17

Potencials caixes TATA trobades a la regió 5' de *GAS6*.

Posició a BK001240	Patró observat	Localització a <i>GAS6</i>
547	GGTATTGCGT	-219 pb
2.043	CCTTTTAAAG	+1.277 pb
2.067	GGAATAAATG	+1.301 pb
2.790	ACTTTAATAC	+2.024 pb

Com la majoria de regions promotores, la regió flanquejant 5' proximal del gen *GAS6* és més rica en GC que en AT. Per això, hem utilitzat diferents programes *online* per detectar illes CpG que poden ser indicadors de les seqüències promotores del gen (L'anàlisi amb la regió de 10 Kb a 5' del gen amb (NT_077627) no detecta cap altra illa CpG, dades no mostrades).

* L'ús de l'aplicació **Human promoter mapping using CpG islands** del **Zhang's Lab: Computational Biology and Bioinformatics Laboratory** (http://rulai.cshl.org/tools/CpG_promoter/) identifica dues regions a l'anàlisi amb la seqüència BK_001240, una de 1.056 pb (entre 547 pb i 1.603 pb), i l'altra de 371 pb

(entre 1.662 i 2.033 pb) amb una proporció de CpG superior a l'esperada per la zona que indica que és una illa CpG (**TAULA 18**).

TAULA 18

Cerca de promotors utilitzant illes CpG (*Human promoter mapping using CpG islands*).

Resultats mostrats amb una probabilitat superior a 0,35.

CpG island pos.	GAS6 Position	posterior prob.	Class
(547..1603)	-218 - 838 pb	0.85524603	"+"
(38070..38449)	37305 - 37684 pb	0.71781838	"+"
(1662..2033)	897 - 1268 pb	0.50162692	"+"
(23223..23476)	22458 - 22711 pb	0.44306741	"-"
(43608..43994)	42843 - 43229 pb	0.40955412	"-"
(40408..40796)	39643 - 40031 pb	0.39599650	"-"
(32615..33062)	31850 - 32297 pb	0.38058710	"-"

class "+" = CpG island is related to a promoter.
class "-" = CpG island is not related to a promoter.

* L'anàlisi de les primeres 10 Kb de BK001240 mitjançant l'aplicació **CpGPlot** de l'**European Bioinformatics Institute** (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>) també troba les dues regions reconegudes com a illes CpG en el programa anterior (**TAULA 19** i **FIGURA 20**) a *GAS6* i només una illa CpG al gen *PROSI* (**TAULA 20**).

TAULA 19

Resultat de l'anàlisi de CpGPlot.

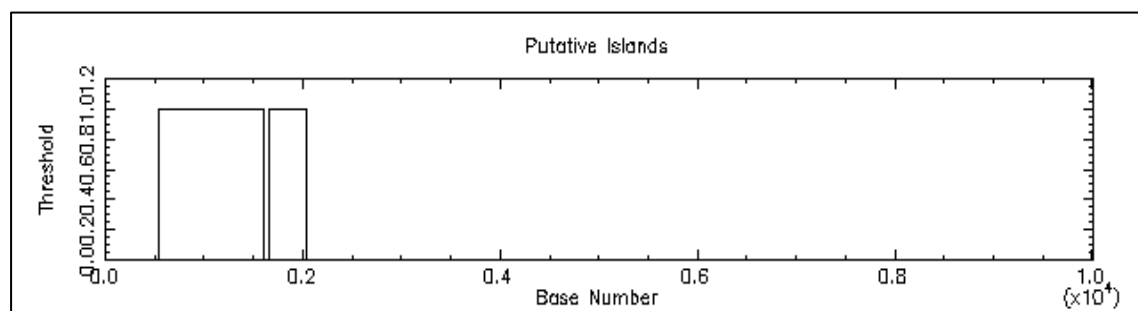
CPGPLOT islands of unusual CG composition
CPGPLOT islands of unusual CG composition
EMBOSS_001 de 1 a 10000

Observada/Esperada ratio > 0.60
Percent. C + Percent G > 50.00
Longitud > 200

Longitud 1057 (547-1603) (-219 pb a 837 pb de *GAS6*)
Longitud 372 (1662..2033) (897 pb a 1268 pb de *GAS6*)

FIGURA 20

Illes CpG (CpGPlot) de les 10 Kb inicials de BK001240 que conté el gen *GAS6*.



TAULA 20

Resultat de l'anàlisi de CpGPlot a PROS1.
(-1 Kb a 5' del gen i + 3 Kb a 3' de l'inici de PROS1).

```
CPGPLOT islands of unusual CG composition
EMBOSS_001 from 1 to 4000

Observed/Expected ratio > 0.60
Percent C + Percent G > 50.00
Length > 200

Length 324 (913..1236)
```

* I utilitzant l'aplicació *CpG islands mapping* de <http://www.itba.mi.cnr.it/webgene> es pot observar que hi ha una seqüència molt rica en CpG: des del nucleòtid 431 fins al 2.133 amb una ratio d'observats/esperats de 0,93. Hi ha un 69% de C+G i un 11% de CpG. És la zona del gen amb un valor més alt de seqüències amb illes CpG (**TAULA 21**). Tots aquests programes coincideixen en assenyalar l'existència d'una zona situada aproximadament a 220 pb abans i 1.268 pb després de l'inici del gen.

TAULA 21

Resultat de l'anàlisi de les 10 Kb a 5' de BK001240 amb l'aplicació *CpG islands mapping*.

```
ID BK001240
Results of CpG islands mapping Obs/Exp >0.60
URL: www.itba.mi.cnr.it/webgene
Key Location/Qualifiers

FT CpG_island 431 - 2133 %C+G= 69; %CpG= 11, Obs./Exp.= 0.93
FT CpG_island 6865- 7154 %C+G= 54; %CpG= 4, Obs./Exp.= 0.65
FT CpG_island 9131- 9430 %C+G= 60; %CpG= 5, Obs./Exp.= 0.62
FT CpG_island 9577- 9853 %C+G= 55; %CpG= 4, Obs./Exp.= 0.62
FT CpG_island 18274-18479 %C+G= 50; %CpG= 3, Obs./Exp.= 0.61
FT CpG_island 18482-18919 %C+G= 50; %CpG= 4, Obs./Exp.= 0.65
FT CpG_island 20228-20608 %C+G= 50; %CpG= 3, Obs./Exp.= 0.62
FT CpG_island 21176-21573 %C+G= 65; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.60
FT CpG_island 23619-23818 %C+G= 65; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.61
FT CpG_island 27863-28638 %C+G= 66; %CpG= 0, Obs./Exp.= 1.02
FT CpG_island 29031-29592 %C+G= 61; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.63
FT CpG_island 29865-30470 %C+G= 62; %CpG= 5, Obs./Exp.= 0.61
FT CpG_island 32336-33149 %C+G= 65; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.62
FT CpG_island 36492-37166 %C+G= 53; %CpG= 5, Obs./Exp.= 0.73
FT CpG_island 37394-38604 %C+G= 63; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.66
FT CpG_island 38926-39170 %C+G= 53; %CpG= 4, Obs./Exp.= 0.64
FT CpG_island 40269-40948 %C+G= 63; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.64
FT CpG_island 43206-44448 %C+G= 62; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.66
FT CpG_island 44907-45106 %C+G= 66; %CpG= 6, Obs./Exp.= 0.60
```

Amb aquests resultats es pot deduir que el promotor de *GAS6* no té caixa TATA i que presenta dues illes CpG al voltant dels exons 1 i 2 del gen, on probablement hi ha les seqüències corresponents a llocs d'unió de factors de transcripció.

4.2. Relació entre *GAS6* i altres gens humans de proteïnes dependents de la vitamina K

Aquesta comparació de proteïnes, així com l'alineament del domini Gla i de la seqüència del mRNA de *GAS6* de les diferents espècies analitzades, s'ha realitzat mitjançant el programa **MEGA (APARTAT 3.1.3., PÀGINA 63)** que permet obtenir arbres filogenètics a partir de l'alineament de les seqüències utilitzant el programa ClustalW.

En primer lloc, s'ha fet l'anàlisi filogenètica de les proteïnes dependents de la vitamina K a l'espècie humana. A la **FIGURA 21** es pot observar l'alineació de les seqüències amb domini Gla realitzada amb el programa ClustalW de comparació de seqüències. El grau de conservació de la zona del domini Gla és molt més gran que pel conjunt de la proteïna (**TAULA 22**). L'anàlisi amb el programa ClustalW ens indica que el 44% de identitat de seqüència de les proteïnes *GAS6* i PS es manté a nivell del mRNA, amb una identitat del 42%. La mida dels exons de *GAS6* és similar a la dels exons de *PROSI* i la diferència més important entre els dos gens és la longitud dels introns.

TAULA 22

Identitat de seqüència entre la *GAS6* i les proteïnes dependents de vitamina K.

	<u>Domini Gla</u>	<u>Proteïna completa</u>
Proteïna S	67 %	44 %
Proteïna Z	51 %	26 %
Proteïna C	49 %	25 %
Factor IX	55 %	25 %
Factor VII	47 %	23 %
Factor X	53 %	25 %
Protrombina	53 %	16 %

FIGURA 21

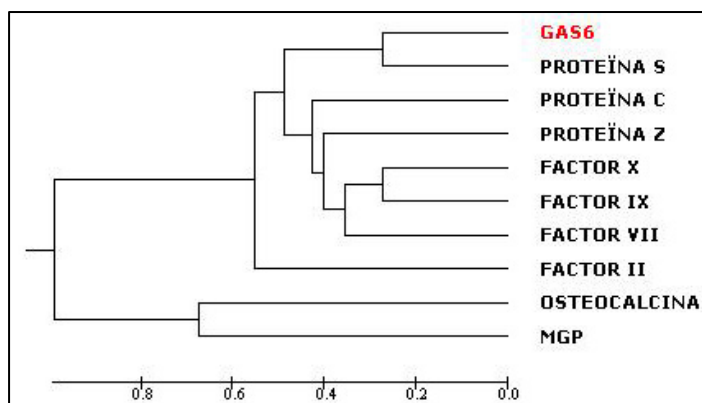
Alineament dels dominis Gla de les proteïnes dependents de la vitamina K.
(E: àcid glutàmic(Glu), -:espai sense aminoàcids, /: zona sense aminoàcids)

Gas6:	LAAECA-----/---LAALLPAREATQFLRPRQRRAPQVFFEEAKQ-GHLERECVVEELCSREEAREVFENDPETD
Proteïna S:	LVL PVS-----/---EAMLLSKQQAASQVL-VRKRRANSLLLEETKQ-GMLERECIEELCNKEAREVFENDPETD
Proteïna Z:	RVLEP-----/---SVFLPASKANDVLRWKRAQSYLLEELFE-GMLEKECYEEICVYEEAREVFENEVVTD
Proteïna C:	GTPAPL-----/---DSVFSSSERAHQVLRIRKRAWS-FLEELRH-SSLERECIEEICDFEEAKEIFQMVDLTL
Factor IX:	LLGYLLSAE--/---CTVFLDHEANANKILNRPKRYNSGKLEEFVQ-GMLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTT
Factor VII:	AAGGVAKASGGE-. . .RVFVTQEEAHGVLHRRRRANA-FLEELRP-GSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTK
Factor X:	LLG-----/---ESLFIIRREQANNILARVTRANS-FLEEMKK-GHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDKTN
Factor II:	CSLVHS-----/---QHVFLAPQQAARSLLRVRRANT-FLEEVVRK-GMLERECVEETCSYEEAFEALSSSTATD
Osteocalcina:	GOAGAKPSGAESSK-----GAAFVSKQEGSEVVKRPRLRYLYQWLGAPVP-YPDPLEPRREVCLELNPDCDELA
MGP:	CYESHESMES-----YELNPFINRRMANTFISFQQRWRRAKVQERIRERSKPVHELNRFEACDDYRLCERY

Hem realitzat l’anàlisi filogenètica de les proteïnes dependents de la vitamina K per observar quina és la similitud de seqüència entre aquestes proteïnes que contenen un domini Gla (**FIGURA 22**). Sobretot hi ha una gran semblança entre la proteïna S i la GAS6 que es manté tant a nivell del cDNA com amb la proteïna. Amb la resta de proteïnes dependents de la vitamina K aquesta similitud és principalment a nivell del domini Gla.

FIGURA 22

Comparació de les seqüències de les proteïnes dependents de la vitamina K.
Els valors indiquen distàncies d’evolució estimades en el nombre de substitucions (aminoàcid o nucleòtid) per lloc.



4.3. Identificació del *gas6* d'altres espècies

En el desenvolupament d'aquest estudi, també ha estat identificat el gen *gas6* de les espècies de rata i ratolí seguint el mateix procediment que per la identificació del gen humà. L'estructura dels gens *gas6* en ratolí i rata es va determinar mitjançant l'estratègia descrita anteriorment (vegeu l'**APARTAT 4.1.**), per BLAST dels seus cDNA contra els respectius genomes, va permetre identificar l'estructura genètica, és a dir, localitzar els exons i els introns, i observar-ne l'homologia quant a estructura. D'aquesta manera teníem una nova confirmació de l'estructura identificada.

El gen *gas6* de rata està localitzat a la regió 16q12.5 i el de ratolí a la regió A1.1 del cromosoma 8, presenten una estructura genètica molt similar al gen humà, amb també 15 exons i 14 introns (**TAULA 23**).

TAULA 23

Estructura genètica del gen *GAS6* en humà (Hs), ratolí (Mm) i rata (Rn) i el gen *PROS1* humà.

Exó	Hs (pb)	Mm (pb)	Rn (pb)	<i>PROS1</i>	Intró	Hs (Kb)	Mm (Kb)	Rn (Kb)
Ex-1 (ATG)	222 (88)	250 (83)	104 (79)	188	In-1	0.1	0.2	0.2
Ex-2	167	167	167	158	In-2	15.5	8.2	10.2
Ex-3	25	25	25	25	In-3	1.4	1.9	1.9
Ex-4	63	63	63	87	In-4	6.7	4.5	4.7
Ex-5	123	123	123	123	In-5	1.5	0.6	0.7
Ex-6	123	123	123	132	In-6	2.4	1.1	1.1
Ex-7	123	123	123	126	In-7	0.8	0.8	0.8
Ex-8	122	122	122	122	In-8	1.8	1.0	1.0
Ex-9	119	119	119	115	In-9	0.1	0.2	0.2
Ex-10	190	190	190	190	In-10	3.6	3.0	2.7
Ex-11	165	165	165	168	In-11	1.4	1.1	1.0
Ex-12	169	169	169	169	In-12	3.4	1.9	1.6
Ex-13	176	173	173	152	In-13	1.2	1.3	1.3
Ex-14	229	229	229	226	In-14	0.9	0.7	0.7
Ex-15*	155 (+290)	155 (+386)	155 (+523)	100(+1.132)				

* Fins al codó Stop, aquest inclòs. L'inici de tots els exons del *GAS6* a les diferents espècies es troben a la mateixa fase.

El gen *gas6* de ratolí (*Mus musculus* (Mm)) i de rata (*Rattus norvegicus* (Rn)) han estat analitzats en un procés similar al realitzat per la identificació del gen *GAS6* humà. Per ratolí s'ha utilitzat les bases de dades Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mvw.edu>) i la Celera Mouse Fragments (<http://cs.celera.com>) utilitzant les seqüències de cDNA com a motlle (NM_019521 a la rata i NM_057100 al ratolí) i s'ha

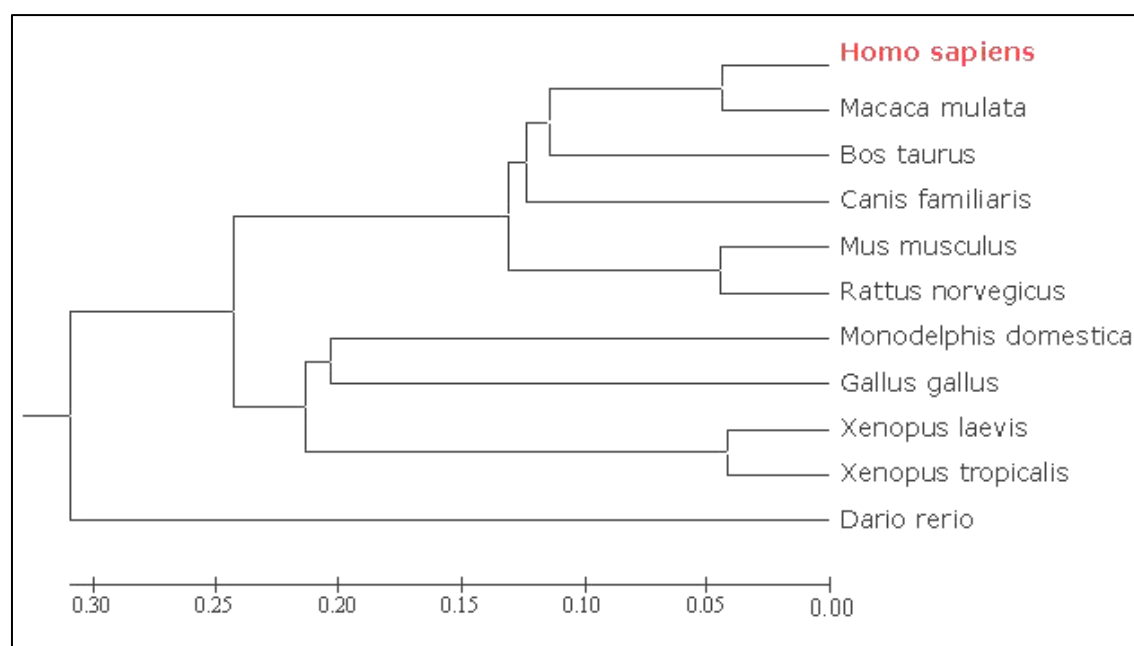
identificat els contigs NW_043053 i NT_039455 que contenen els gens per a rata i ratolí, respectivament.

Les recents publicacions dels genomes de les espècies *Homo sapiens* (home), *Mus musculus* (ratolí), *Rattus norvegicus* (rata), *Danio rerio* (peix zebra), *Xenopus laevis* i *Xenopus tropicalis* (granotes africanes), *Gallus gallus* (gall), *Bos taurus* (vaca) i *Canis familiaris* (gos), ha permès obtenir les seqüències dels seus respectius mRNA per tal de poder fer una anàlisi filogenètica de *gas6* (**FIGURA 23**). El resultat de l'anàlisi BLAST està descrit a la **TAULA 24**. La identificació d'exons en altres espècies usant el mRNA de *GAS6* humà (NM_000820) està descrit a l'**APÈNDIX 1**.

FIGURA 23

Arbre filogenètic de diferents espècies pel mRNA de *gas6*.

Els valors indiquen distàncies d'evolució estimades basades en el nombre de substitucions per lloc.



Actualment, a la base de dades pública, hi ha la seqüència de cDNA de *GAS6* de les espècies següents: *Homo sapiens* (home), *Mus musculus* (ratolí), *Rattus norvegicus* (rata), *Gallus gallus* (gall), *Xenopus laevis* i *Xenopus tropicalis* (granotes africanes) i *Danio rerio* (peix zebra), mentre que espècies com *Monodelphis domestica* (marsupial), *Rhesus mulata* (macaco), *Bos taurus* (vaca), *Canis familiaris* (gos), que se'n coneix la seqüència del genoma, s'ha d'estimar quin és el seu mRNA de *GAS6* més probable.

Atès que els mRNA de les diferents espècies contenen seqüències que no codifiquen per proteïna (les regions no transcrits dels exons 1 i 15) i, per tant, les divergències

evolutives són majors, les comparacions entre les diferents espècies que s'han realitzat només s'han portat a terme amb aquestes seqüències codificants per proteïna. L'anàlisi amb el programa ClustalW ha permès determinar que el gen *GAS6* humà presenta una identitat de seqüència del 80% amb la proteïna GAS6 de ratolí i del 81% amb la de rata.

TAULA 24

Valors obtinguts de la comparació amb BLASTX de la seqüència de la proteïna GAS6 contra la base de dades de proteïnes (^a: aminoàcids similars).

Referència	espècie	Identitat	similitud ^a
XM_844530	<i>Canis familiaris</i>	536/635 (84%)	582/635 (91%)
NM_057100	<i>Rattus norvegicus</i>	537/639 (84%)	575/639 (89%)
NM_019521	<i>Mus musculus</i>	528/637 (82%)	571/637 (89%)
XM_580667	<i>Bos taurus</i>	464/583 (79%)	511/583 (87%)
NM_001015965	<i>Xenopus tropicalis</i>	410/639 (64%)	508/639 (79%)
DQ324381	<i>Notophthalmus viridescens</i>	413/637 (64%)	498/637 (78%)
BC076835	<i>Xenopus laevis</i>	403/637 (63%)	504/637 (79%)
XM_416936	<i>Gallus gallus</i>	335/570 (58%)	408/570 (71%)
NM_199978	<i>Danio rerio</i>	327/636 (51%)	422/636 (66%)

4.4. Variabilitat al gen *GAS6*

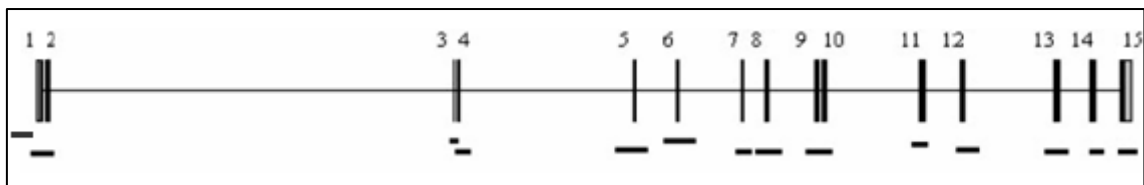
A mesura que vam anar identificant les diferents seqüències que corresponien als exons de *GAS6* es van dissenyar encebadors que permetessin l'amplificació d'aquests exons i les respectives seqüències intròniques flanquejants (**FIGURA 24**).

D'aquesta manera es va aconseguir amplificar 14 fragments que corresponien als 15 exons del gen *GAS6* i a la regió 5' del gen.

FIGURA 24

Localització dels fragments a *GAS6* amplificats per PCR.

Les línies verticals corresponen als exons i les horitzontals als introns.



4.4.1. Detecció i caracterització de variants

Les substitucions d'una sola base quan estan localitzades en zones codificadores poden comportar canvis d'aminoàcid o ser substitucions sinònimes (no es modifica l'aminoàcid). Si aquest canvi es produeix en una zona no codificadora, pot ser que no tinguin efecte, però també poden destruir les regions conservades de *splicing* (GT-AG), poden activar llocs de *splicing* críptics o produir algun altre efecte que pugui modificar l'expressió del gen.

La major part dels mètodes actuals de detecció de mutacions desconegudes es basen en la tecnologia per PCR. Si els gens són petits de mida es pot optar per seqüenciar directament de la mostra amplificada. Si el gen és gran, com és el cas del *GAS6*, de 44 Kb aproximadament, amb 15 exons i 14 introns, s'ha d'optar per alguna altra estratègia més ràpida i eficient, com pot ser l'anàlisi de SSCP.

4.4.2. Anàlisi dels SSCP per identificar variants

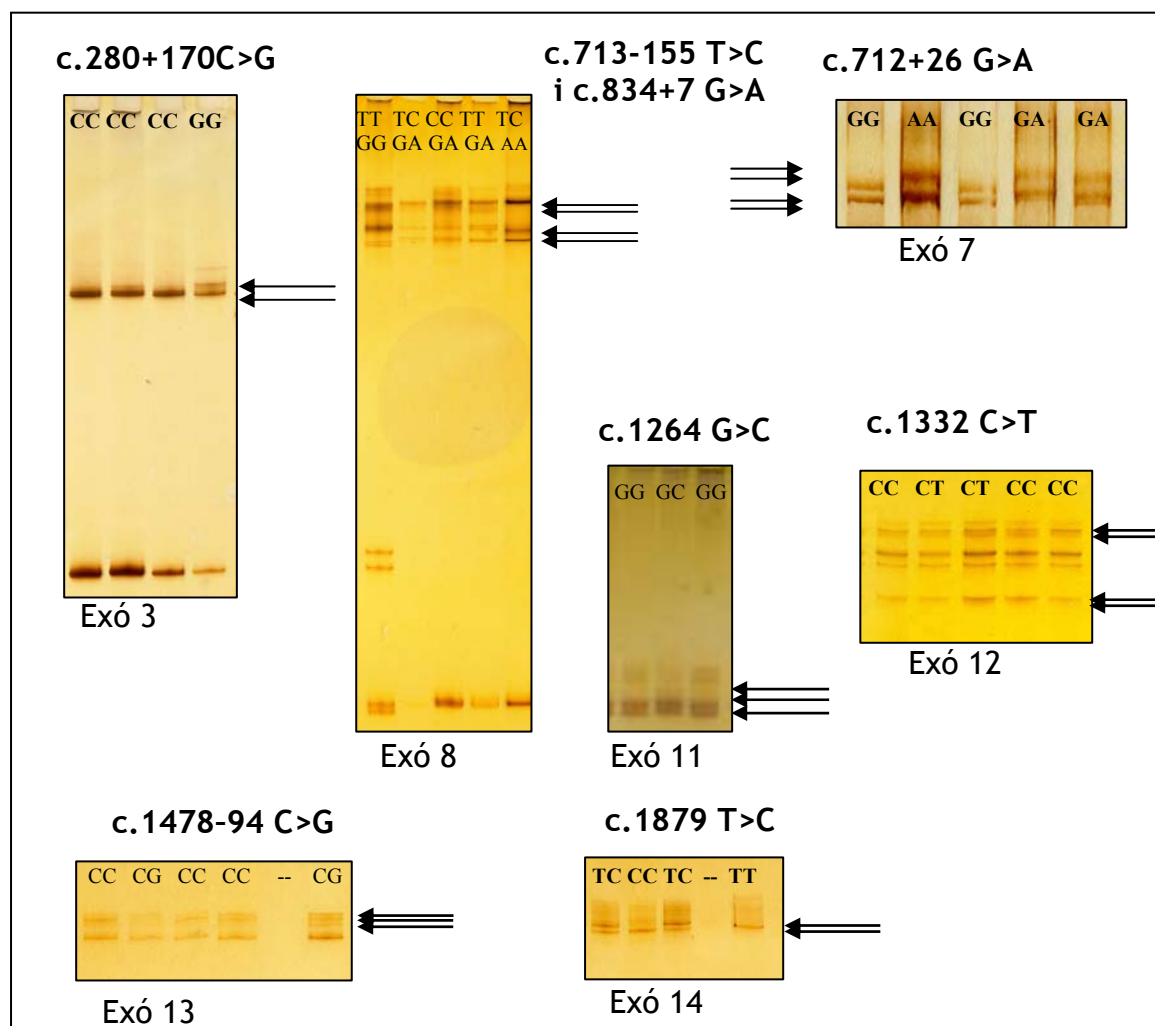
La tècnica de SSCP/HD (**APARTAT 3.7., PÀGINA 85**) ha estat utilitzada per cercar variants al gen *GAS6*. A partir del DNA genòmic extret es va amplificar en diferents fragments que contenien els exons i les seves regions intròniques flanquejants, utilitzant els oligonucleòtids específics que es mostren a la **TAULA 4**.

Amb la finalitat de trobar les variants que estan en un percentatge superior al 2,5%, els fragments que contenien els exons i les seqüències intròniques flanquejants de *GAS6* es van amplificar i analitzar pel mètode dels SSCP en un mínim de 20 mostres de DNA procedents d'individus controls sans.

L'anàlisi dels fragments corresponents als exons 3, 7, 8, 11, 12, 13 i 14 indicà la presència de variants (**FIGURA 25**) que foren confirmades per seqüenciació (**FIGURA 26**).

FIGURA 25

Anàlisi per SSCP dels fragments amplificats de *GAS6*, amb una variant identificada.



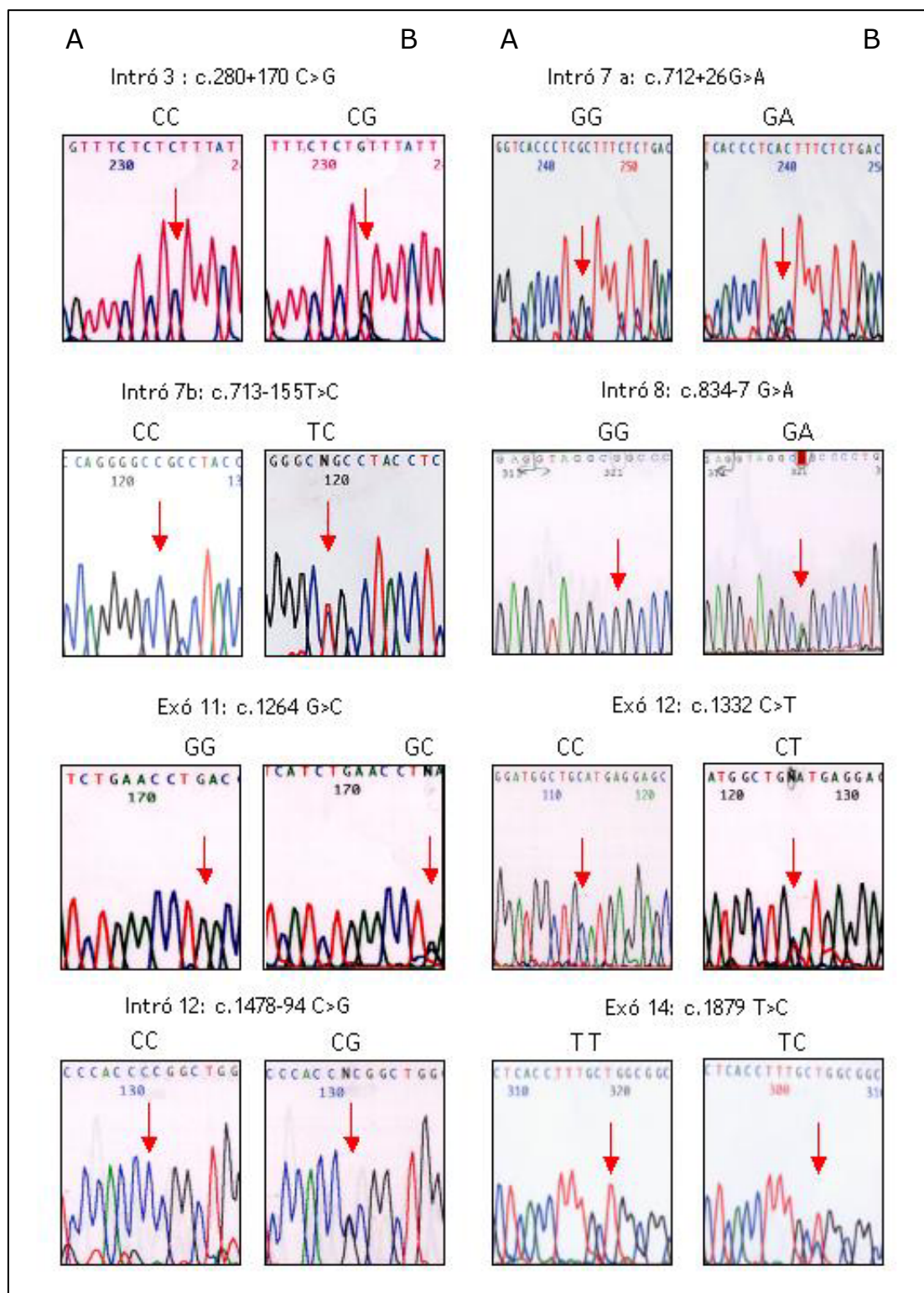
Als altres fragments amplificats (els corresponents a la zona 5' del gen i als exons 1, 2, 4, 6, 9, 10 i 15) no s'hi va identificar cap variant (**FIGURA 27**).

FIGURA 26

Seqüenciació de les variants de *GAS6* identificades per la tècnica dels SSCP.

A: seqüència d'individu homozigot per l'al·lel més freqüent.

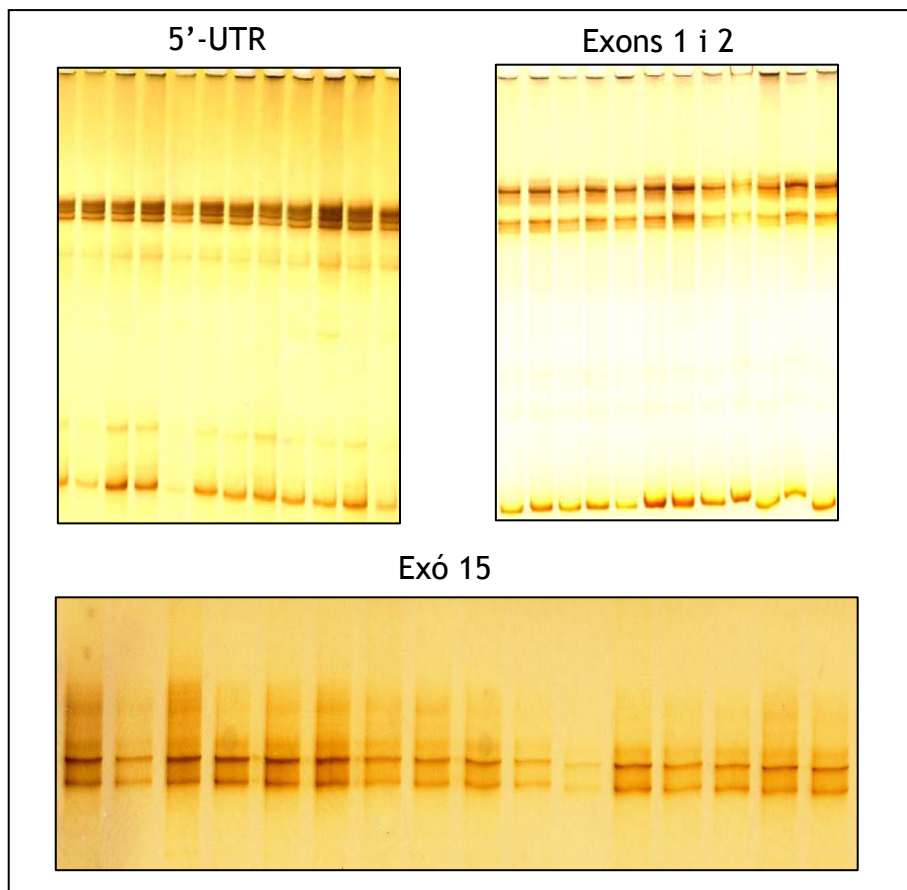
B: seqüència d'individu heterozigot.



L'amplificació de la regió 5' del gen que contenia 567 pb abans de l'inici de transcripció, així com la zona de l'exó 1 i 2 varen ser complicades d'analitzar atès que presenten un alt contingut amb seqüències de C i G que li confereixen una estructura secundària difícil de separar per permetre la unió dels oligonucleòtids i realitzar l'amplificació. Els exons 1 i 2 presenten el 83% i el 72 % de nucleòtids C i G, respectivament. Vàrem provar diferents solucions tamponants, DMSO a diferents concentracions, i finalment vam provar l'aminoàcid betaïna (N,N,N-trimetilglicina) en unes concentracions entre 1,3 M i 2 M que ens ha permès amplificar correctament el producte a analitzar (**FIGURA 27**).

FIGURA 27

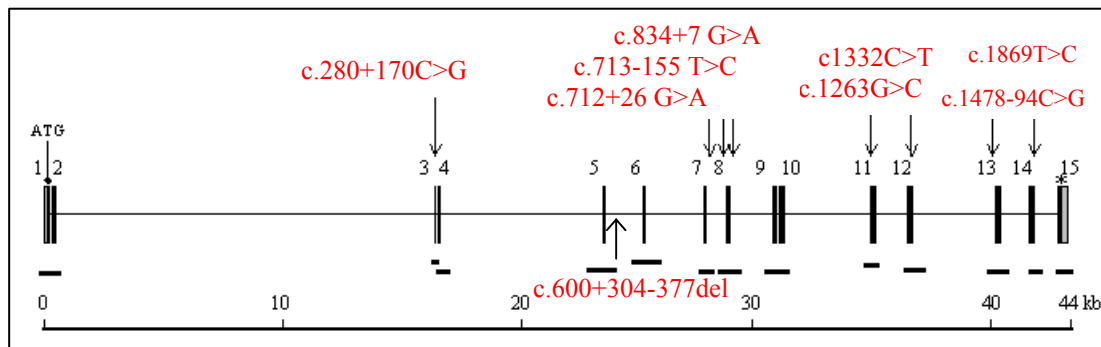
Anàlisi per SSCP dels altres fragments amplificats de *GAS6*, sense canvi identificat.



D'aquesta manera s'han pogut identificar i caracteritzar 5 variants en els introns 3, 7, 8 i 12, i 3 variants en la seqüència codificadora, en els exons 11, 12 i 14 (**FIGURA 28** i **TAULA 25**).

FIGURA 28

Localització de les variants identificades al gen *GAS6* humà.



Els polimorfismes identificats van ésser sotmesos a la dbSNP per assignar-li un nom identificatiu (**TAULA 25**).

TAULA 25

Variants (SNP) identificades a *GAS6*.

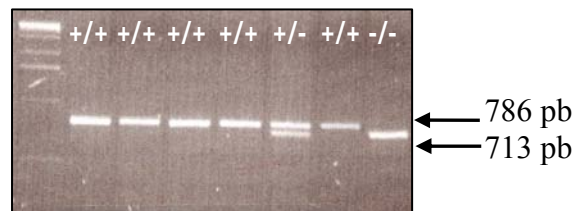
nd: no determinat

Polimorfisme	dbSNP	Localització	Efecte
c.280+170 C>G	rs8191973	intró 3	nd
c.712+26 G>A	rs7331124	intró 7	nd
c.713-155 T>C	rs7323932	intró 7	nd
c.834+7 G>A	rs8191974	intró 8	nd
c.1263 G>C	rs8191975	exó 11	Sinònim-L421
c.1332 C>T	rs1803628	exó 12	Sinònim-C444
c.1478-94 C>G	rs7987377	intró 12	nd
c.1869 T>C	rs7400002	exó 14	Sinònim-A623

L'anàlisi posterior del fragment que contenia l'exó 5 va permetre identificar un altre polimorfisme freqüent a la població: es tracta d'una deleció-inserció de 73 pb a l'intró 5 (c.600+304-377 del) la qual es pot analitzar fàcilment amplificant la zona delimitada pels encebadors corresponents (els oligonucleòtids E5F-E5R); l'al·lel normal del producte amplificat per PCR resulta en un fragment 786 pb de mida, mentre que si és present la deleció de 73 pb, la mida del fragment resultant és de 713 pb. Aquests dos al·lells són detectables i visualitzables per electroforesi en un gel d'agarosa al 2,5% (**FIGURA 29**).

FIGURA 29

Anàlisi del polimorfisme c.600+304-377 del a l'intró 5 (+:inserció; -:deleció)



Un cop identificats i caracteritzats els diferents polimorfismes, calia trobar el mètode d'anàlisi més senzill per la genotipació del màxim nombre de mostres de la nostra població atès que en els estudis d'associació, la significació estadística és proporcional al nombre de mostres analitzades i al risc associat. Per tant, amb nombres de mostres més grans seriem capaços de trobar efectes gènics més subtils.

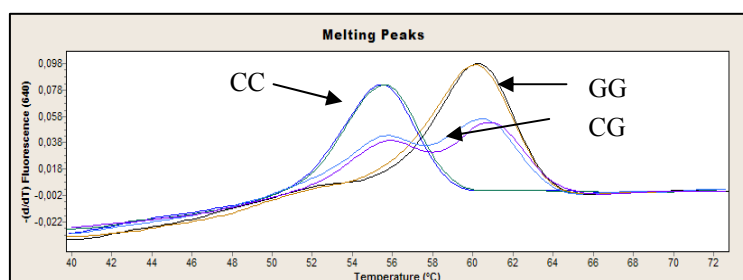
Amb l'objectiu de genotipar més ràpidament les variants identificades es van desenvolupar diferents mètodes d'anàlisi: la digestió amb enzims de restricció i la determinació de la temperatura de fusió amb una sonda *sensor* específica del fragment polimòrfic mitjançant la tecnologia QF-PCR en el LightCycler® (**FIGURA 30**).

FIGURA 30 (A-H)

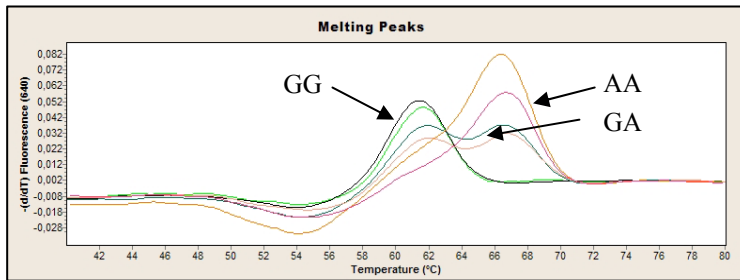
Anàlisi dels genotips dels diferents polimorfismes del *GAS6*.

Els encebadors, sondes i condicions d'amplificació corresponents a cada fragment es troben a l'**APARTAT 3.8.2. (TAULES 4 i 7)**.

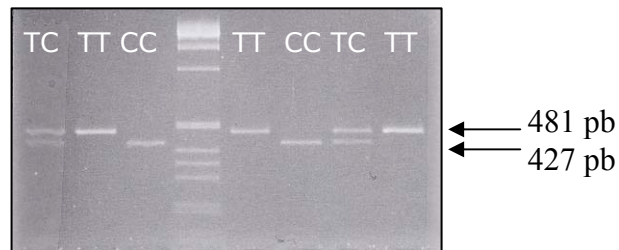
A. c.280+170 C>G: l'anàlisi d'aquest polimorfisme es va realitzar amb la tecnologia de QF-PCR amb el LightCycler® (al·lel C: 56°C; al·lel G: 61°C).



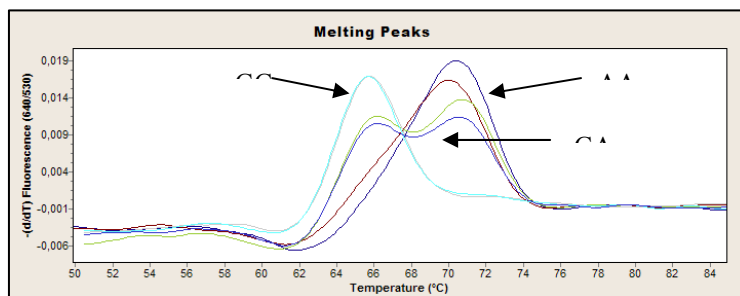
B. c.712+26 G>A: anàlisi per LightCycler® (al·lel G: 62°C; al·lel A: 67°C).



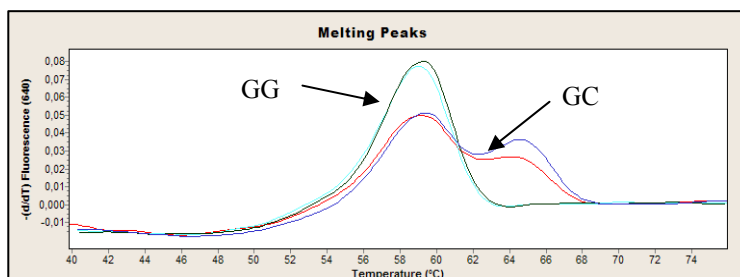
C. c.713-155 T>C: anàlisi per digestió enzimàtica amb l'enzim *Bsr* I (al·lel T: 481pb; al·lel C: 427 pb + 54 pb).



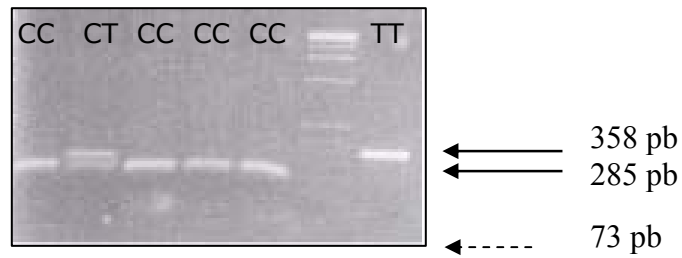
D. c.834+7 G>A: anàlisi mitjançant dos mètodes: per digestió amb enzim de restricció *AlwNI* (al·lel G: 481pb; al·lel A: 345pb + 146pb) i amb el LightCycler® (al·lel G: 65°C; al·lel A: 71°C).



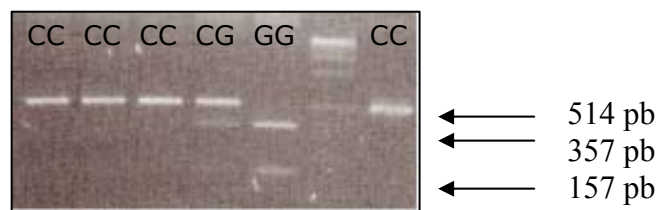
E. c.1263 G>C : analitzat amb tecnologia de LightCycler® (al·lel G: 59°C; al·lel C: 65°C).



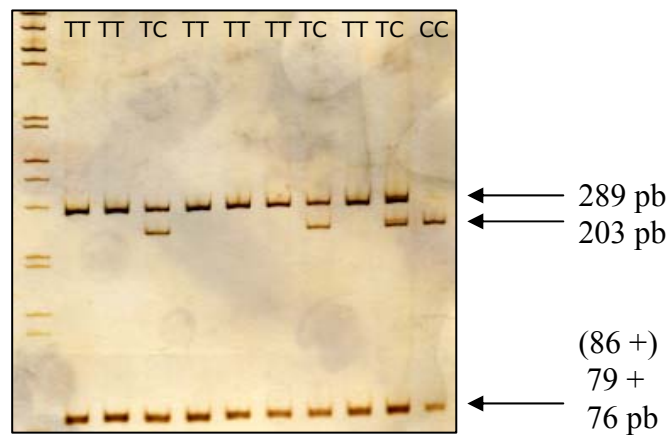
F. c.1332 C>T : analitzat per digestió enzimàtica amb l'enzim *Nla* III (al·lel C: 285 + 73 pb; al·lel T: 358 pb).



G. c.1478-94 C>G : analitzat per digestió enzimàtica amb l'enzim *Bst*UI (al·lel C: 514 pb + 57 pb; al·lel G: 357 pb + 157 pb + 57 pb).



H. c.1869 T>C : polimorfisme analitzat per digestió enzimàtica amb l'enzim *Msp* I. Visualització per electroforesi en gel d'acrilamida 29:1 al 12% i tinció amb nitrat de plata (vegeu l'**APARTAT 3.6.4.**) (al·lel T: 289 pb + 79 + 76 pb; al·lel C: 203 pb + 86 pb + 79 pb + 76 pb).



4.5. Associació entre polimorfismes del *GAS6* i la malaltia aterotrombòtica: estudis en diferents poblacions

Amb els polimorfismes identificats vam realitzar estudis cas-control en diferents poblacions a les quals el gen *GAS6* podia ser un gen candidat a estar associat amb les malalties analitzades.

4.5.1. Estudi en malaltia aterotrombòtica

A la **TAULA 26** es descriu que tots els polimorfismes que hem analitzat es troben en l'Equilibri de Hardy-Weinberg (HWE) en els diferents grups de pacients amb patologia aterotrombòtica i en el grup de controls, procedents de l'Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

TAULA 26

Valors P del test de χ^2 per l'estudi del HWE a la població de malalts amb malaltia aterotrombòtica (en parèntesi nombre de mostres).

		Controls (110)	ANGINA (68)	ICTUS (71)	IAM (49)
c.280+170	C>G	0,99	0,12	0,76	0,62
c.712+26	G>A	0,99	0,24	1,00	0,96
c. 713-155	T>C	0,91	0,31	0,99	0,83
c.834+7	G>A	0,71	0,52	0,51	0,91
c.1263	G>C	0,73	0,93	0,93	0,86
c.1332	C>T	0,99	0,75	0,88	0,99
c.1478-94	C>G	0,99	-	-	-
c.1869	T>C	0,38	-	-	-

A la **TAULA 27** hi ha una descripció dels resultats de la genotipació en aquesta població dels polimorfismes del *GAS6*, segons l'ordre de 5' a 3' del gen. Els polimorfismes c.1478-94C>G (localitzat a l'intró 12) i el c.1869T>C (localitzat a l'exó 14) que van ser els darrers en ésser caracteritzats no van poder ésser analitzats en aquesta població de pacients.

Cinc dels polimorfismes analitzats (c.280+170C>G, c.712+26G>A, c.713-155T>C, c.1263G>C i c.1322C>T) no revelen diferències estadísticament significatives ni a les

freqüències al·lèliques ni a les freqüències genotípiques dels pacients respecte a la població control.

Pel que fa al polimorfisme c.834+7G>A, al grup de pacients hi ha una freqüència al·lèlica i genotípica significativament més baixa respecte als individus control, sobretot en els pacients que han patit ictus. Als altres subgrups, pacients que han sofert un infart de miocardi o una angina de pit, tot i tenir unes freqüències del genotip AA i de l'al·lel A més baixes que a la població control no s'arriba a la significació estadística.

TAULA 27

Freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes del GAS6 en pacients amb diferents manifestacions de la malaltia aterotrombòtica.

^a1:al·lel més freqüent; 2: al·lel menys freqüent. ^b Valor P en el test de χ^2 de les freqüències al·lèliques i genotípiques esperades a la població de pacients amb les freqüències dels individus controls; Angina: angina de pit; Ictus: accident cerebrovascular; IAM: infart agut de miocardi.

Polimorfisme	n	freq.(2) ^a	p ^b	freq.(11)	freq.(12)	freq (22)	p ^b
c.280+170 C>G							
1>2 Controls	110	0,141		0,74	0,24	0,02	
Pacients	185	0,127	ns	0,78	0,20	0,01	ns
Angina	65	0,123	ns	0,78	0,19	0,03	ns
ICTUS	71	0,134	ns	0,76	0,21	0,3	ns
IAM	49	0,122	ns	0,75	0,25	0,00	ns
c.712+26 G>A							
Controls	106	0,189		0,66	0,30	0,04	
Pacients	186	0,175	ns	0,67	0,31	0,02	ns
Angina	68	0,169	ns	0,66	0,34	0,00	ns
ICTUS	70	0,171	ns	0,69	0,29	0,03	ns
IAM	48	0,188	ns	0,67	0,29	0,04	ns
c.713-155 T>C							
Controls	110	0,468		0,27	0,52	0,21	
Pacients	169	0,459	ns	0,28	0,51	0,21	ns
Angina	59	0,449	ns	0,26	0,59	0,15	ns
ICTUS	69	0,493	ns	0,26	0,49	0,5	ns
IAM	41	0,415	ns	0,37	0,44	0,19	ns
c.834+7 G>A							
Controls	104	0,404		0,44	0,38	0,18	
Pacients	185	0,303	0.02	0,46	0,47	0,07	0,03
Angina	68	0,346	ns	0,40	0,51	0,09	ns
ICTUS	69	0,232	0.005	0,57	0,40	0,03	0,008
IAM	48	0,344	ns	0,42	0,48	0,10	ns
c.1263 G>C							
Controls	104	0,072		0,86	0,14	0,00	
Pacients	185	0,051		0,90	0,10	0,00	
Angina	68	0,044		0,91	0,09	0,00	ns
ICTUS	70	0,043		0,91	0,09	0,00	
IAM	48	0,074	ns	0,85	0,15	0,00	ns
c.1322 C>T							
Controls	102	0,103		0,80	0,19	0,01	
Pacients	175	0,066		0,87	0,12	0,01	
Angina	63	0,087		0,83	0,17	0,00	ns
ICTUS	69	0,058		0,88	0,12	0,00	
IAM	42	0,024	ns	0,95	0,05	0,00	ns
c.1478-94 C>G	99	0,096		0,82	0,17	0,01	
c.1869 T>C	70	0,336		0,46	0,41	0,13	

L'anàlisi de desequilibri de lligament (LD) (amb el programa **2LD (PÀGINA 104)**) entre els diferents polimorfismes en el conjunt d'individus (controls i pacients) d'aquesta població ens assenyalava que no hi ha blocs clars de LD (**FIGURA 31**). Es pot observar com els polimorfismes de l'intró 12 i de l'exó 14 estan en LD amb molts altres polimorfismes però no és possible confirmar-ho a causa del baix nombre de mostres que han estat analitzades.

FIGURA 31

Anàlisi de desequilibri de lligament amb el programa **2ld**.

	intró 7-5'	intró 7-3'	intró 8	exó 11	exó 12	intró 12	exó14
intró 3	0,38	0,68	0,14	0,15	0,04	0,21	0,18
2LD	intró 7-5'	0,94	0,26	0,31	0,95	1	1
	intró 7-3'		0,12	0,07	0,3	0,34	0,27
	intró 8			0,36	0,03	0,23	0,17
	exó 11				0,59	0,99	1
	exó 12					0,05	0,74
	intró 12						0,65

L'estudi dels haplotips dels 4 polimorfismes situats més a 5' del gen *GAS6* (intró 3, els dos de l'intró 7 i el de l'intró 8) en aquesta població ens indica que no hi ha haplotips que presentin una diferència estadísticament significativa entre pacients amb malaltia aterotrombòtica respecte a la població control (**TAULA 28**).

Tampoc s'observa cap haplotip concret associat a cap dels tres subtipus de la malaltia estudiada (angina de pit, accident cerebrovascular (ictus) i infart de miocardi), tot i que l'haplotip **CACA** és el que presenta uns valors de l'*Odds ratio* més baixos (factor de protecció a patir la malaltia). No obstant, en el subgrup de malalts amb ictus, els valors d'OR més baixos corresponen a tots els haplotips amb presència de l'al·lel A en el polimorfisme de l'intró 8.

TAULA 28

Resultats de l'anàlisi dels haplotips amb el programa Thesias a la població amb malaltia aterotrombòtica.

Angina: angina de pit; ICTUS: accident cerebrovascular; IAM: infart agut de miocardi.

^a Haplotip de referència (c.280-170C>G; c.712+26G>A; c.713-155T>C; c.834+7G>A).

Haplotip	Controls		Pacients		Angina		ICTUS		IAM	
	N=	Freqüència d'haplotips	N=	OR (95%CI)	Freq.	OR (95%CI)	Freq.	OR (95%CI)	Freq.	OR(95%CI)
CGTG ^a	104	0,32	185	1	0,38	1	69	1	0,39	1
CGTA	0,18	0,13	0,61 [0,32-1,16]	0,13	0,62 [0,23-1,65]	0,09	0,38 [0,12-1-17]	0,16	0,75 [0,21-2,75]	
CACA	0,11	0,09	0,53 [0,24-1,15]	0,08	0,58 [0,21-1,59]	0,06	0,39 [0,12-1.26]	0,06	0,43 [0,08-2,26]	
GGCG	0,09	0,06	0,64 [0,27-1,51]	0,08	0,71 [0,24-2,06]	0,06	0,52 [0,16-1.75]	0,08	0,73 [0,24-2,19]	
CGCG	0,09	0,14	1,37 [0,70-2,67]	0,09	1,12 [0,45-2,77]	0,19	1,69 [0,77-3,73]	0,08	0,75 [0,21-2,75]	
CGCA	0,08	0,06	0,65 [0,28-1,50]	0,09	1,03 [0,39-2,72]	0,03	0,36 [0,08-1.59]	0,06	0,66 [0,19-2,30]	
CACG	0,07	0,09	1,06 [0,43-2,60]	0,08	0,92 [0,30-2,85]	0,10	1,15 [0,39-3,35]	0,10	1,17 [0,30-4,62]	

4.5.2. Estudi en malaltia cerebrovascular

Un cop identificat el polimorfisme de l'intró 8 que estava associat a malaltia aterotrombòtica i més concretament amb l'accident cerebrovascular (Munoz et al. 2004), (vegeu l'**APÈNDIX 2**) es va optar per confirmar aquests resultats amb un nou estudi cas-control de pacients amb malaltia cerebrovascular, procedents de l'Hospital Clínic i Provincial (HCP) de Barcelona, la població del qual podia subdividir-se en ictus hemorràgics i isquèemics i aquests darrers, segons el criteri de classificació TOAST (Adams et al. 1993), en grups de pacients que havien patit ictus d'origen aterotrombòtic, cardioembòlic, llacunar, desconegut o d'altres causes. (**APARTAT 1.4.5.**). En aquest nou estudi, doncs, s'hi inclou la malaltia cerebrovascular de tipus hemorràgic.

4.5.2.1. Anàlisi dels polimorfismes del gen *GAS6*

L'estudi de tots els polimorfismes identificats inicialment al gen *GAS6* (c.280+170C>G, c.712+26G>A, c.713-155T>C, c.834+7G>A, c.1263G>C, c.1322C>T, c.1478-94C>G, c.1869T>C) s'ha realitzat en el conjunt de mostres d'individus control (un màxim de 150 individus) i de pacients diagnosticats de diferents subtipus de malaltia cerebrovascular (**TAULES 29-32**). Tots els SNP analitzats es troben en l'Equilibri de Hardy Weinberg (HW) (**TAULA 29**).

TAULA 29

Valors P del test de χ^2 per l'estudi de l'equilibri de HW a la població de malalts amb malaltia cerebrovascular (en parèntesi nombre de mostres analitzades).

	<u>Controls (147)</u>	<u>I. Isquèmic (456)</u>	<u>I. Hemorràgic (197)</u>
c.280+170 C>G	0,54	0,97	0,91
c.600+304-377del	0,99	0,99	0,56
c.712+26 G>A	0,62	0,60	0,83
c.713-155 T>C	0,93	0,85	0,88
c.834+7 G>A	0,65	0,70	0,61
c.1263 G>C	0,44	0,18	0,56
c.1332 C>T	0,39	0,78	0,95
c.1478-94 C>G	0,72	0,99	0,75
c.1869 T>C	0,68	0,61	0,54
PROZ			
c.573+79 G>A	0,93	0,46	0,68

Els resultats obtinguts ens indiquen que el polimorfisme de l'intró 8 (c.834+7G>A) està associat amb la malaltia cerebrovascular, tant en els subtipus d'ictus isquèmics com amb ictus hemorràgics, perquè presenten una freqüència de l'al·lel A de 0,35, inferior a la 0,42 que s'observa en la població control (**TAULA 30**).

La resta de polimorfismes analitzats mostren unes distribucions de genotips similars entre pacients i controls, amb l'excepció del SNP de l'intró 3 (c.280+170C>G) i el de l'exó 12 (c.1332C>T) que, malgrat que presenten unes freqüències al·lèliques similars dels al·lells menys freqüents (molt baixes), el baix nombre d'homozigots per l'al·lel menys freqüent introdueix un biaix a l'anàlisi.

TAULA 30

Freqüències al·lèliques (de l'al·lel menys freqüent) dels polimorfismes del *GAS6* a la població amb malaltia cerebrovascular del HCP de Barcelona.

^a valor de p en el test χ^2 comparant pacients amb controls, entre parèntesi s'indica el nombre d'individus comptabilitzats.

	Controls (n)	Pacients (n)	Valor P ^a	I. Isq. (n)	Valor P ^a	I. Hemor.(n)	Valor P ^a
c.280+170C>G	0,15 (147)	0,12 (647)	0,08	0,12 (453)	0,01	0,12 (194)	0,06
c.712+26 G>A	0,20 (148)	0,20 (652)	0,41	0,20 (455)	0,65	0,19 (197)	0,63
c.713-155 T>C	0,48 (147)	0,50 (631)	0,24	0,50 (446)	0,20	0,49 (185)	0,87
c.834+7 G>A	0,42 (149)	0,35 (653)	<0,001	0,35 (456)	<0,001	0,34 (197)	0,002
c.1263 G>C	0,08 (150)	0,08 (653)	0,93	0,08 (455)	0,69	0,07 (198)	0,56
c.1332 C>T	0,10 (137)	0,08 (628)	0,05	0,09 (437)	0,41	0,09 (191)	0,23
c.1478-94C>G	0,06 (134)	0,07 (641)	0,06	0,07 (445)	0,22	0,08 (196)	0,11
c.1869 T>C	0,21 (144)	0,20 (642)	0,56	0,20 (451)	0,77	0,20 (191)	0,70

A la **TAULA 31** es pot observar una distribució dels genotips similar per a tots els polimorfismes de *GAS6* en els subtipus d'ictus isquèmic i hemorràgic excepte pel de l'intró 8, on la freqüència dels individus amb el genotip AA és inferior en pacients (13 % en ictus isquèmics i 10 % en ictus hemorràgics) que en controls (19 %).

TAULA 31

Freqüències genotípiques dels polimorfismes del GAS6 en els subtipus d'ictus isquèmic i hemorràgic.

^a1: al·lel més freqüent; 2: al·lel menys freqüent. ^b: Valor P en el test de χ^2 de les freqüències al·lel·liques i genotípiques als pacients respecte les esperades amb les freqüències al·lel·liques dels controls. Entre parèntesi s'indica el nombre d'individus comptabilitzats.

SNP	1 >2 ^a	Control		I. Isquèmic		I. Hemorràgic		Valor P ^b				
		11	12	22	11	12	22		Valor P ^b			
c.280+170	C>G	0,74 (108)	0,23 (34)	0,03 (5)	0,78 (352)	0,21 (94)	0,01 (7)	0,03	0,78 (151)	0,21 (41)	0,01 (2)	0,17
c.712+26	G>A	0,65 (96)	0,30 (44)	0,05 (8)	0,65 (297)	0,30 (137)	0,05 (21)	0,55	0,64 (127)	0,32 (64)	0,03(6)	0,75
c. 713-155	T>C	0,28 (41)	0,48 (71)	0,24 (35)	0,25 (114)	0,49 (217)	0,26 (115)	0,36	0,28 (51)	0,48 (89)	0,24(45)	0,87
c.834+7	G>A	0,36 (53)	0,45 (67)	0,19 (29)	0,43 (195)	0,44 (200)	0,13 (61)	<0,001	0,42 (82)	0,48 (95)	0,10 (20)	0,007
c.1263	G>C	0,86 (129)	0,13 (19)	0,01 (2)	0,84 (382)	0,16 (73)	0,00 (0)	0,14	0,86 (170)	0,14 (28)	0,00 (0)	0,65
c.1332	C>T	0,82 (112)	0,16 (22)	0,02 (3)	0,82 (356)	0,18 (80)	0,00 (1)	0,24	0,84 (160)	0,16 (30)	0,00 (1)	0,48
c.1478-94	C>G	0,89 (119)	0,10 (14)	0,01 (1)	0,87 (387)	0,13 (58)	0,00 (2)	0,47	0,85 (167)	0,14 (27)	0,01 (2)	0,15
c.1869	T>C	0,64 (92)	0,31 (44)	0,05 (8)	0,64 (290)	0,31 (139)	0,05 (22)	0,59	0,66 (125)	0,29 (56)	0,05 (10)	0,52

TAULA 32

Anàlisi per regressió logística dels polimorfismes del GAS6 (models recessiu i dominant), entre parèntesi s'indica el nombre d'individus comptabilitzats.

Polimorfisme	Model	OR [95% IC] No ajustat		OR [95% IC] Ajustat			
		Pacients	I. Isq.	I. Hem.	Pacients	I. Isq.	I. Hem.
c.280+170C>G	GG vs. CC/CG	0,40 [0,13-1,21]	0,45 [0,14-1,43]	0,30 [0,06-1,55]	0,51 [0,14-1,81]	0,55 [0,15-2,06]	0,94 [0,55-1,61]
	GG/CG vs. CC	0,79 [0,53-1,20]	0,79 [0,52-1,22]	0,79 [0,48-1,30]	0,89 [0,56-1,39]	0,88 [0,55-1,41]	0,53 [0,09-3,20]
c.712+26G>A	AA vs. GG/GA	0,76 [0,34-1,70]	0,85 [0,37-1,95]	0,55 [0,19-1,65]	0,69 [0,28-1,71]	0,75 [0,29-1,93]	0,54 [0,17-1,72]
	AA/GA vs. GG	1,00 [0,68-1,44]	0,98 [0,67-1,45]	1,02 [0,65-1,59]	0,84 [0,55-1,27]	0,81 [0,53-1,25]	0,86 [0,53-1,40]
c.713-155T>C	CC vs. TT/TC	1,09 [0,71-1,65]	1,11 [0,72-1,72]	1,03 [0,62-1,71]	1,06 [0,67-1,68]	1,09 [0,68-1,76]	0,97 [0,56-1,68]
	CC/TC vs. TT	1,09 [0,73-1,63]	1,13 [0,74-1,71]	1,02 [0,62-1,65]	0,93 [0,60-1,44]	0,93 [0,59-1,47]	0,90 [0,53-1,52]
c.834+7G>A	AA vs. GG/GA	0,58 [0,37-0,93]	0,64 [0,39-1,04]	0,47 [0,25-0,87]	0,68 [0,40-1,12]	0,71 [0,41-1,22]	0,56 [0,29-1,10]
	AA/GA vs. GG	0,75 [0,52-1,08]	0,74 [0,50-1,08]	0,77 [0,50-1,20]	0,68 [0,45-1,02]	0,65 [0,43-0,99]	0,73 [0,46-1,18]
c.1263G>C	CC vs. GG/CG	-	-	-	-	-	-
	CC/GC vs. GG	1,12 [0,68-1,87]	1,17 [0,69-1,98]	1,01 [0,55-1,86]	1,24 [0,71-2,16]	1,26 [0,71-2,24]	1,13 [0,59-2,19]
c.1332C>T	TT vs. CC/TC	0,14 [0,02-0,86]	0,10 [0,01-0,99]	0,23 [0,02-2,28]	0,21 [0,03-1,50]	0,16 [0,01-1,85]	0,28 [0,02-3,10]
	TT/TC vs. CC	0,97 [0,60-1,57]	1,02 [0,62-1,67]	0,87 [0,49-1,55]	1,15 [0,68-1,95]	1,25 [0,73-2,15]	1,00 [0,54-1,87]
c.1478-94C>G	GG vs. CC/CG	0,83 [0,09-7,71]	0,60 [0,05-6,64]	1,37 [0,12-15,3]	0,68 [0,05-9,08]	0,60 [0,04-9,26]	1,27 [0,07-22,4]
	GG/CG vs. CC	1,27 [0,71-2,28]	1,23 [0,67-2,25]	1,38 [0,71-2,68]	1,02 [0,55-1,91]	0,99 [0,52-1,89]	1,13 [0,56-2,30]
c.1869T>C	CC vs. TT/TC	0,89 [0,40-1,98]	0,87 [0,38-2,00]	0,94 [0,36-2,44]	0,81 [0,34-1,92]	0,78 [0,31-1,92]	0,86 [0,31-2,36]
	CC/TC vs. TT	0,97 [0,66-1,41]	0,98 [0,66-1,45]	0,93 [0,59-1,47]	1,01 [0,67-1,53]	1,04 [0,68-1,59]	0,95 [0,58-1,54]

A la **TAULA 32** es pot observar els resultats de l'anàlisi per regressió logística dels polimorfismes de *GAS6* per als dos principals tipus d'ictus seguint els models d'herència recessiu (efecte del polimorfisme en individus homozigots per la variant menys freqüent respecte els individus amb altres genotips (homozigots per la variant més comuna i heterozigots)) i model dominant (efecte en individus que tenen al menys un dels al·lells menys freqüents respecte els que no en tenen cap). A part del polimorfisme de l'intró 8, que l'estudi del qual està encara més desenvolupat a la **TAULA 34**, dels altres polimorfismes analitzats es pot veure que el c.1332C>T (a l'exó 12) presenta una associació molt forta amb els diferents subtipus d'ictus isquèmic. Aquesta associació però està esbiaixada pel sistema d'anàlisi utilitzat (regressió logística amb un model recessiu d'herència) pel baix nombre d'homozigots per l'al·lel T en la població de pacients.

Anàlisi del polimorfisme de l'intró 5, c.600+304-377del

L'anàlisi del polimorfisme de l'intró 5, c.600+304-377, identificat posteriorment, en una subpoblació de mostres, no mostra que hi hagi associació entre aquest polimorfisme i l'ictus isquèmic o ictus hemorràgic (**TAULA 33**).

TAULA 33

Anàlisi del polimorfisme c.600+304-377del de *GAS6*.

^a: + correspon a la seqüència normal que no presenta la deleció de 73 pb; del: deleció

Genotip ^a	N	+/+	+/del	del/del	freqüència del	valor P
		n (%)	n (%)	n (%)		
Control	94	68 (72,3)	24 (25,5)	2 (2,1)	0,15	
Total Ictus	90	64 (71,1)	23 (25,6)	3 (3,3)	0,16	ns
Isquèmic	75	53 (70,7)	20 (26,7)	2 (2,7)	0,17	ns
Hemorràgic	15	11 (73,3)	3 (20,0)	1 (6,7)	0,17	ns

Anàlisi del polimorfisme de l'intró 8 c.834+7 G>A

Atès que aquest polimorfisme ha estat descrit com a associat a patologia aterotrombòtica serà descrit separatament i detalladament a la població amb malaltia cerebrovascular.

L'anàlisi per regressió logística s'ha realitzat considerant diferents models d'herència: model codominant (els dos al·lells provoquen el mateix efecte, individus homozigots per l'al·lel menys freqüent (A) respecte a individus homozigots pel més

freqüent (G), vegeu **TAULES 34 i 35**) i models dominant (individus que tenen al menys un al·lel A respecte a individus sense, vegeu **TAULA 35**) i recessiu (individus homozigots per l'al·lel A respecte a la resta d'individus, vegeu **TAULA 35**), a la població amb malaltia cerebrovascular en un conjunt i en els diferents subtipus de la malaltia d'acord amb la classificació TOAST.

En tots els subtipus d'ictus isquèmics i ictus hemorràgics la freqüència de l'al·lel A del polimorfisme c.834+7G>A és inferior a la dels controls però aquest valor només és estadísticament significatiu en alguns subtipus (ictus isquèmics d'origen llacunar o de causa desconeguda, i ictus hemorràgics de localització lobar). Pel que fa a les freqüències del genotip AA en els pacients també és inferior a la del grup control (19,5%), malgrat que els subtipus d'ictus isquèmics de causes rares tenen una freqüència que s'hi apropa (17,6%) (**TAULA 34**). L'anàlisi per regressió logística amb els diferents models d'herència ens ofereix uns resultats similars entre els models recessiu i el codominant (**TAULA 35**). D'aquesta manera, el fet de ser homozigot AA confereix una protecció d'aproximadament dues vegades respecte tenir un altre genotip sobretot en els ictus isquèmics d'origen llacunar i els ictus amb hemorràgia profunda. Quan es realitza l'anàlisi multivariant aquesta associació es manté en l'agrupació de tots els subtipus d'ictus que tenen un origen ateroscleròtic (els ictus isquèmics llacunars i d'origen aterotrombòtic i l'ictus d'hemorràgia profunda) i els subtipus que afecten a la microvasculatura (ictus isquèmic llacunar i ictus d'hemorràgia profunda) (**TAULA 35**).

TAULA 34

Distribució de genotips del polimorfisme c.834+7 G>A en pacients i controls i anàlisi per regressió logística (model codominant) en els diferents subtipus d'ictus.

	n	al·lel A freqüència	valor P ^a	GG n (%)	GA n (%)	AA n (%)	OR no ajustada ^b [95%, CI]	OR ajustada ^c [95%, CI]
Controls	149	0,42		53 (35,6)	67 (45)	29 (19,5)		
ICTUS	653	0,35	<0,0001	277 (42,4)	295 (45,2)	81 (12,4)		
							AA vs. GG	0,53 [0,32-0,89]
							GA vs. GG	0,75 [0,47-1,12]
I. Isq.	456	0,35	<0,0001	195 (42,8)	200 (43,9)	61 (13,4)		
							AA vs. GG	0,54 [0,30-0,96]
							GA vs. GG	0,84 [0,54-1,30]
CMB	98	0,35	0,11	43 (43,9)	42 (42,9)	13 (13,3)		
							AA vs. GG	0,55 [0,26-1,19]
							GA vs. GG	0,77 [0,44-1,35]
ATER	109	0,37	0,12	44 (40,4)	50 (45,9)	15 (13,8)		
							AA vs. GG	0,62 [0,30-1,31]
							GA vs. GG	0,90 [0,52-1,55]
LAC	97	0,34	0,02	42 (43,3)	45 (46,4)	10 (10,3)		
							AA vs. GG	0,43 [0,19-0,99]
							GA vs. GG	0,79 [0,26-2,40]
DESC	135	0,36	0,03	59 (43,7)	56 (41,5)	20 (14,8)		
							AA vs. GG	0,62 [0,31-1,22]
							GA vs. GG	0,75 [0,50-1,25]
Altres	17	0,38	0,66	7 (41,2)	7 (41,2)	3 (17,6)	nd	nd
I. Hemor.	197	0,34	0,002	82 (41,6)	95 (48,2)	20 (10,2)		
							AA vs. GG	0,45 [0,23-0,87]
							GA vs. GG	0,92 [0,57-1,46]
Profonda	107	0,35	0,12	43 (40,2)	54 (50,5)	10 (9,3)		
							AA vs. GG	0,42 [0,19-0,97]
							GA vs. GG	0,99 [0,58-1,70]
Lobar	82	0,34	0,04	35 (42,7)	38 (46,3)	9 (11)		
							AA vs. GG	0,47 [0,20-1,11]
							GA vs. GG	0,86 [0,48-1,54]
Cerebel	8	0,31	nd	4 (50)	3 (37,5)	1 (12,5)	nd	nd

CEMB: ictus cardioembòlic; ATER: ictus ateroescleròtic; LLAC: ictus ilacunar; DESC: ictus de causa desconeguda. ^aP valor: valor de P del test de la χ^2 dels genotips observats en els pacients comparats amb els genotips esperats amb les freqüències dels controls. ^bModels de regressió logística (model d'herència recessiu). ^cModel de regressió logística ajustat pels factors de risc. nd: no determinat.

TAULA 35

Anàlisi per regressió logística dels genotips del polimorfisme de l'intró 8 amb model recessiu (AA vs. GG/GA), model dominant (AA/GA vs. GG) i codominant (AA vs. GG).

CEMB: ictus cardioembòlic; ATER: ictus ateroscleròtic; LLAC: ictus llacunar; DESC: ictus de causa desconeguda. ^aModels d'herència en la regressió logística. ^bModel en la regressió logística ajustat pels factors de risc. nd: no determinat.

Població	n	model ^a	OR no ajustada	OR ajustada ^b
Controls	149			
ICTUS	653	AA vs. GG/GA	0,59 [0,37-0,93]	0,67 [0,40-1,12]
		AA/GA vs. GG	0,75 [0,52-1,08]	0,68 [0,45-1,02]
		AA vs. GG	0,53 [0,32-0,89]	0,56 [0,32-1,00]
I. Isq.	456	AA vs. GG/GA	0,64 [0,39-1,04]	0,71 [0,41-1,22]
		AA/GA vs. GG	0,74 [0,50-1,08]	0,65 [0,43-0,99]
		AA vs. GG	0,54 [0,30-0,96]	0,58 [0,32-1,06]
CEMB	98	AA vs. GG/GA	0,63 [0,31-1,29]	0,77 [0,36-1,66]
		AA/GA vs. GG	0,71 [0,42-1,19]	0,61 [0,35-1,06]
		AA vs. GG	0,55 [0,26-1,19]	0,62 [0,27-1,42]
ATER	109	AA vs. GG/GA	0,66 [0,33-1,30]	0,75 [0,35-1,60]
		AA/GA vs. GG	0,82 [0,49-1,36]	0,69 [0,39-1,20]
		AA vs. GG	0,62 [0,30-1,31]	0,62 [0,27-1,41]
LLAC	97	AA vs. GG/GA	0,48 [0,22-1,02]	0,53 [0,23-1,20]
		AA/GA vs. GG	0,72 [0,43-1,22]	0,61 [0,35-1,06]
		AA vs. GG	0,43 [0,19-0,99]	0,43 [0,18-1,04]
DESC	135	AA vs. GG/GA	0,72 [0,38-1,34]	0,86 [0,43-1,69]
		AA/GA vs. GG	0,71 [0,44-1,15]	0,63 [0,38-1,05]
		AA vs. GG	0,62 [0,31-1,22]	0,66 [0,32-1,38]
Altres	17		nd	nd
I. Hemor.	197	AA vs. GG/GA	0,47 [0,25-0,87]	0,56 [0,29-1,10]
		AA/GA vs. GG	0,77 [0,50-1,20]	0,73 [0,46-1,18]
		AA vs. GG	0,45 [0,23-0,87]	0,49 [0,24-1,00]
Profonda	107	AA vs. GG/GA	0,43 [0,20-0,92]	0,53 [0,23-1,21]
		AA/GA vs. GG	0,82 [0,49-1,37]	0,71 [0,40-1,28]
		AA vs. GG	0,42 [0,19-0,97]	0,48 [0,20-1,16]
Lobar	82	AA vs. GG/GA	0,43 [0,20-1,14]	0,69 [0,29-1,61]
		AA/GA vs. GG	0,74 [0,43-1,29]	0,75 [0,43-1,30]
		AA vs. GG	0,47 [0,20-1,11]	0,48 [0,20-1,16]
Cerebel	8		nd	nd
Ater+Llac+ I.Hem.Prof.		AA vs. GG/GA	0,52 [0,30-0,89]	0,57 [0,31-1,05]
		AA/GA vs. GG	0,79 [0,53-1,18]	0,69 [0,44-1,07]
		AA vs. GG	0,50 [0,28-0,89]	0,50 [0,26-0,96]
Llac+ I.Hem.Prof		AA vs. GG/GA	0,45 [0,24-0,83]	0,61 [0,33-1,11]
		AA/GA vs. GG	0,77 [0,50-1,19]	0,69 [0,43-1,10]
		AA vs. GG	0,43 [0,22-0,84]	0,44 [0,21-0,90]

4.5.2.2. Anàlisi d'altres polimorfismes en gens candidats de la regió 13q34

Com ha estat explicat anteriorment (**APARTAT 1.1.**), a la mateixa regió cromosòmica on està localitzat el gen *GAS6* (13q34) hi ha altres gens candidats (els gens *F7*, *F10* i *PROZ*) a estar associats a la malaltia que hem estudiat.

El polimorfisme de *PROZ* que ha estat analitzat en aquesta població de pacients amb ICTUS de l'Hospital Clínic de Barcelona és el c.573+79G>A (o IVS6+79G>A) (**TAULA 36**).

Del total de genotips analitzats per aquest polimorfisme un terç els vam analitzar mitjançant la tècnica dels SSCP (**FIGURA 32**) fins que vam posar a punt l'anàlisi per digestió amb l'enzim *Hpa* I (**FIGURA 33**). El funcionament correcte de la tècnica dels SSCP va ser comprovat mitjançant la seqüenciació directa dels productes amplificats que donaven diferents patrons de mobilitat electroforètica (**FIGURA 34**).

FIGURA 32

Anàlisi per SSCP del polimorfisme c.573+79 G>A a *PROZ*. Fragment amplificat pels encebadors PROZF i PROZR.

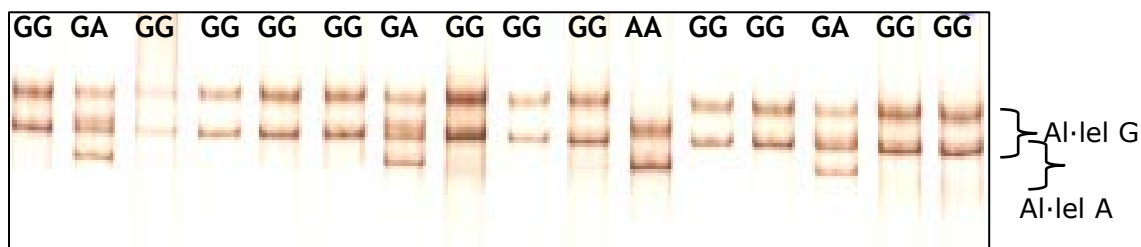


FIGURA 33

Anàlisi del polimorfisme c.573+79 G>A a *PROZ* amb l'enzim de restricció *Hpa* I.

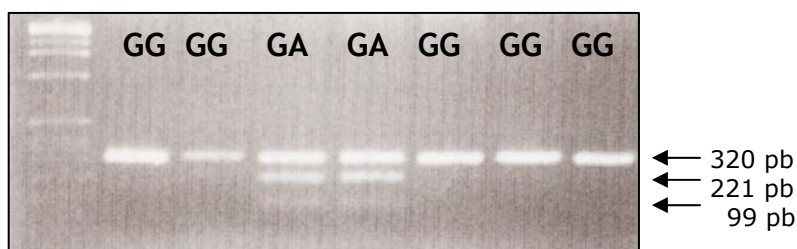
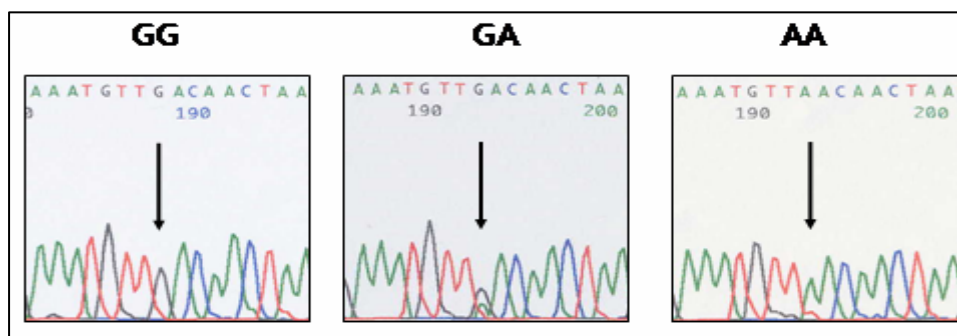


FIGURA 34

Anàlisi per seqüenciació dels diferents genotips del polimorfisme de *PROZ* estudiat.



Per comprovar que els dos mètodes d'anàlisi funcionaven correctament hem realitzat la reanàlisi per digestió enzimàtica de 101 mostres que havien estat analitzades per SSCP.

D'aquestes mostres 66 corresponien a homozigots per l'al·lel G (GG), 29 a heterozigots (GA) i 5 a homozigots per l'al·lel A (AA). Només s'hi observa un resultat discrepant que corresponia a l'assignació d'un homozigot GG (per digestió) a un individu genotipat per SSCP com a GA. Resultats que corresponen a més d'un 99% de consistència i, per tant, es poden acceptar. Com es pot comprovar a la **TAULA 36** la freqüència de l'al·lel menys freqüent (l'al·lel A) d'aquest polimorfisme de la PZ en població control és similar als grups control d'altres poblacions (Lichy et al. 2004; Rice et al. 2001; Santacroce et al. 2004; Staton et al. 2005).

TAULA 36

Percentatge de l'al·lel A del polimorfisme c.573+79G>A de *PROZ* en diferents estudis. (entre parèntesi el nombre de mostres analitzades). *Associació del polimorfisme amb la malaltia.

	Obach (2006)	Santacroce (2004)	Lichy (2004)	Staton (2005)	Rice (2001)
Controls	22,3%(147)	23,0%(100)	24,1%(199)	22,8%(164)	20,1%(150)
I. Isquèmic	20,3%(390)	-	15,7%(200)*	19,5%(151)*	-
I. Hemorràgic	14,7%(156)*	-	-	-	-

L'estudi cas-control entre el polimorfisme de l'intró 6 de *PROZ* c.573+79G>A amb la malaltia cerebrovascular no ens mostra l'associació amb l'ictus isquèmic com s'havia descrit anteriorment (Lichy et al. 2004; Staton et al. 2005). No obstant, el nostre estudi és el primer que descriu un efecte protector d'aquest polimorfisme en l'ictus hemorràgic, tot

i que aquest efecte no és independent d'altres factors de risc (Obach et al. 2006)(**TAULA 37**) (vegeu l'**APÈNDIX 3**).

TAULA 37

Distribució de l'al·lel A i dels genotips del SNP c.573+79G>A de *PROZ* a la població de pacients amb malaltia cerebrovascular.

^a regressió logística sense ajustar pels factors de risc. ^b regressió logística ajustat pels factors de risc.

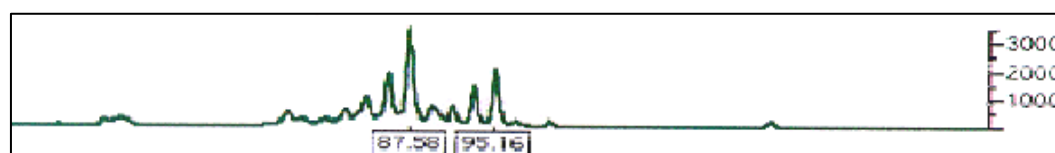
	<u>n</u>	<u>Al·lel A</u>	<u>GG (%)</u>	<u>GA (%)</u>	<u>AA (%)</u>	<u>OR [95%, CI]</u>
		<u>freqüència</u>				
Controls	147	0,22	90 (61)	49 (33)	8 (6)	
I. Isq.	390	0,20	252 (65)	118 (30)	20 (5)	AA vs.GG ^a 0,89 [0,38-2,10] AA vs.GG ^b 0,79 [0,31-2,10]
I. Hem.	156	0,15	112 (72)	42 (27)	2 (1)	AA vs.GG ^a 0,20 [0,04-0,97] AA vs.GG ^b 0,21 [0,04-1,10]

L'altre polimorfisme que ha estat analitzat és el marcador dels gens *F10* i *F7*, **D13S285**, en una subpoblació de 137 pacients seleccionats a l'atzar (79 amb ictus isquèmic i 58 amb ictus hemorràgic) i de 103 controls. Aquest marcador microsatèl·lit presenta una sèrie de repeticions del dinucleòtid CA. L'anàlisi s'ha realitzat per electroforesi capil·lar (*Applied Biosystems ABI 3.10*) seguint la metodologia descrita a l'**APARTAT 3.9.2**. i ens ofereix unes dades com les de la **FIGURA 35**.

Tal i com es pot observar a la **TAULA 38**, hi ha una distribució similar dels al·lells en la població de pacients respecte la dels controls.

FIGURA 35

Electroferograma del microsatèl·lit D13S285, corresponent a una mostra amb dos al·lells: de 88 pb i 96 pb (17 i 21 repeticions CA, respectivament).



TAULA 38

Distribució d'al·lels (nombre de repeticions) del microsatèl·lit D13S285 a la regió dels gens *F10/7*, en el grup de pacients amb malaltia cerebrovascular.

n: nombre de cromosomes analitzats; en parèntesi, la freqüència al·lèlica de cada al·lel a la població analitzada, que correspon a la població de l'Hospital Clínic de Barcelona

	Controls	Pacients	I. Isquèmics	I. Hemorràgics
	206	274	158	116
(CA) n	n (freq)	n (freq)	n (freq)	n (freq)
13	1 (0,005)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
14	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
15	2 (0,010)	1 (0,004)	1 (0,009)	0 (-)
16	6 (0,029)	5 (0,018)	2 (0,018)	3 (0,026)
17	22 (0,107)	38 (0,139)	24 (0,152)	14 (0,121)
18	15 (0,073)	21 (0,077)	7 (0,044)	14 (0,121)
19	17 (0,083)	32 (0,117)	16 (0,101)	16 (0,138)
20	34 (0,165)	38 (0,139)	27 (0,171)	11 (0,095)
21	73 (0,354)	89 (0,325)	53 (0,335)	36 (0,310)
22	24 (0,117)	37 (0,135)	21 (0,133)	16 (0,138)
23	6 (0,029)	5 (0,018)	1 (0,006)	4 (0,034)
24	4 (0,019)	7 (0,026)	5 (0,032)	2 (0,017)
25	2 (0,010)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
26	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
27	0 (-)	1 (0,004)	1 (0,006)	0 (-)
χ^2 (valor P)		0,59	0,52	0,56

El resultat del test de la χ^2 (amb 12 graus de llibertat) ens indica que no hi ha cap associació d'aquest marcador analitzat (D13S285) i la malaltia cerebrovascular a la nostra població.

4.5.2.3. Anàlisi del LD entre polimorfismes de *GAS6*, *PROZ* i F10/F7

L'anàlisi de desequilibri de lligament (LD) entre els polimorfismes bial·lèlics de *GAS6* ha estat realitzat amb el programa **THESIAS** utilitzant el conjunt de mostres de l'estudi, de controls i de pacients amb malaltia cerebrovascular, de l'HCP de Barcelona. La comparació en paral·lel amb dos altres programes (**LDtest** i **2ld**) ens mostra que el resultat dels tres programes és molt similar (**FIGURA 36**). Per analitzar el LD hem simplificat la nomenclatura dels polimorfismes (i3: c.290+170C>G, i7-5': c.712+26G>A; i7-3': c.713-155T>C; i8: c.834+7G>A; E11: c.1263G>C; E12: c.1332C>T; i12: 1478-94C>G; E14: c.1869T>C).

FIGURA 36

Comparació dels valors de LD entre els polimorfismes bial·lèlics de *GAS6* en els 3 programaris diferents utilitzant el conjunt d'individus de la població de l'HCP.

Valors D'																											
	a			b			c			a			b			c			a			b			c		
i3	i7-5'			i7-5'	i7-3'			i8				E11				E12				i12				E14			
	0,89	0,88	0,89	0,71	0,75	0,71	0,15	0,08	0,15	0,43	0,55	0,3	0,51	0,68	0,51	0,27	0,22	0,27	0,42	0,39	0,42						
				i7-5'	0,9	0,91	0,9	0,35	0,35	0,34	0,72	0,76	0,73	0,71	0,81	0,71	0,85	0,8	0,85	0,88	0,85	0,85					
							i7-3'	0,15	0,15	0,15	0,37	0,43	0,37	0,47	0,46	0,47	0,65	0,68	0,65	0,28	0,2	0,29					
									i8	0,38	0,28	0,38	0,18	0,15	0,17	0,93	0,93	0,93	0,01	0,01	0,01						
													E11	0,56	0,5	0,56	1	1	1	0,52	0,5	0,56					
																E12	0,67	0,74	0,67	0,75	0,73	0,75					
																				i12	0,36	0,36	0,36				

a: LDtest; b: THESIAS; c: 2ld.

Aquesta anàlisi ens mostra una sèrie de polimorfismes que presenten un fort LD entre ells. Els polimorfismes que estan localitzats més cap a la zona 5' del gen (corresponents a l'intró 3 i intró 7) estan en fort LD, així com els polimorfismes en seqüència codificant de la zona més a 3' del gen (els situats als exons 11, 12 i 14). D'altra banda, el polimorfisme c.712+26G>A (i7-5') presenta un fort LD amb els altres SNP analitzats del gen excepte amb el c.834+7G>A. Cal destacar que aquest polimorfisme de l'intró 8 (c.834+7 G>A) només mostra un fort LD amb el SNP de l'intró 12.

A la **TAULA 39** s'exposa l'anàlisi de LD entre el polimorfisme de l'intró 5 (c.600+304-377del), realitzat en un subgrup de mostres a l'atzar, i la resta de SNP que han estat identificats. S'hi pot observar que presenta LD amb els polimorfismes de l'intró 3, intró 7-5' i el de l'exó 12.

TAULA 39

Valors de LD entre el polimorfisme de l'intró 5 i la resta de polimorfismes de *GAS6*.

D' =	<i>GAS6</i>							
	i3	i7-5'	i7-3'	i8	E11	E12	i12	E14
i5	0,88	0,74	0,39	0,10	0,55	1,00	0,24	0,43

A la **FIGURA 37** s'exposa una representació gràfica del LD entre els polimorfismes de *GAS6* així com també amb el polimorfisme de *PROZ*, analitzat on s'hi observa clarament que el polimorfisme a l'intró 8 (c.834+7G>A) només presenta fort LD amb el polimorfisme de l'intró 12 que és molt poc freqüent.

També s'hi observa que el polimorfisme de l'intró 5 del gen *PROZ* no presenta LD amb cap SNP de *GAS6*. Per tant, podríem afirmar que els resultats obtinguts per l'anàlisi dels SNP a *GAS6* no són deguts al polimorfisme de *PROZ* (**TAULA 40**).

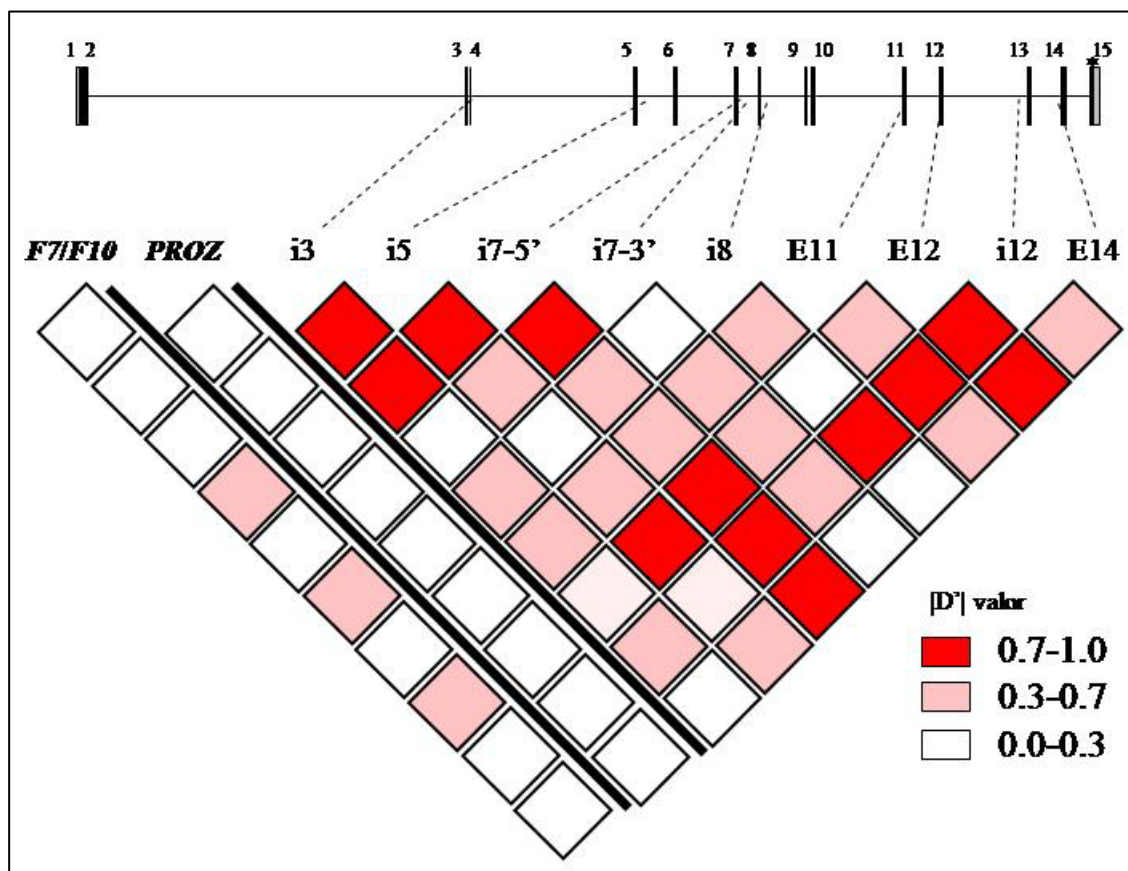
TAULA 40

Anàlisi de LD entre el polimorfisme del *PROZ* analitzat i els polimorfismes del *GAS6*.

$ D' =$	<i>GAS6</i>								
<i>PROZ</i>	i3	i5	i7-5'	i7-3'	i8	E11	E12	i12	E14
c.573+79G>A	0,12	0,17	0,26	0,07	0,03	0,10	0,22	0,07	0,11

FIGURA 37

Anàlisi de LD entre els polimorfismes del *GAS6*, del *PROZ* i del marcador D13S285.



Pel que fa a l'anàlisi del marcador D13S285 dels gens *F7* i *F10*, no s'hi observa LD amb cap dels polimorfismes de *GAS6* estudiats. Atès que aquest marcador no és bial·lèlic s'ha utilitzat un altre programa d'anàlisi de LD (EH+) que permet la incorporació de locus multial·lèlics. Considerant la hipòtesi d'associació al·lèlica entre els polimorfismes (13 al·lels de D13S285 i 3 genotips als polimorfismes bial·lèlics de *GAS6*; correspon a 24 graus de llibertat per al test de χ^2), no hi ha LD en cap cas (**TAULA 41**).

TAULA 41

Anàlisi del LD entre el marcador D13S285 i els SNP de *GAS6*, amb el programa EH+.

Marcador	Polimorfismes de <i>GAS6</i>								
	i3	i5	i7-5'	i7-3'	i8	E11	E12	i12	E14
D13S285									
(χ^2)	21,4	16,3	15,6	20,9	19,0	15,1	11,8	12,8	13,0
Valor P	0,61	0,88	0,90	0,64	0,75	0,92	0,98	0,96	0,97
Valor de χ^2	de 36,42 per P=0,05 amb 24 graus de llibertat								

4.5.2.4. Anàlisi d'haplotips del gen GAS6

Un cop realitzada la genotipació dels polimorfismes de GAS6 a la població amb malaltia cerebrovascular del HCP de Barcelona hem realitzat l'estudi d'haplotips.

En realitzar l'estudi d'haplotips considerant els 8 SNP de GAS6 inicialment identificats (sense tenir en compte el polimorfisme de l'intró 5 perquè l'anàlisi d'aquest només s'ha realitzat en una subpoblació de mostres), s'hi observa que hi ha una associació entre un dels haplotips analitzats (**C A C A G C C T**) i la malaltia cerebrovascular, més concretament l'ictus isquèmic (**TAULA 42**). La presència d'aquest haplotip, doncs, sembla ser un factor de protecció davant la malaltia cerebrovascular.

Atès que els 6 haplotips més freqüents (a la població control i a la de pacients) mostren la presència dels mateixos al·lels dels 4 polimorfismes de l'extrem 3' del gen (**G C C T**), i atès que l'anàlisi dels 8 SNP fa perdre potencialitat a l'estudi perquè les dades es van disgregant i hi ha menys quantitat d'individus que puguin posseir un mateix haplotip, s'ha repetit l'anàlisi incloent-hi només els 4 polimorfismes que estan situats a la zona més 5' del gen (c.280+170C>G, c.712+26G>A, c.713-155T>C i c.834+7G>A).

TAULA 42

Freqüència i Odds ratio d'haplotips dels 8 SNP de GAS6. ^a: haplotip corresponent a c.280+170C>G, c.712+26G>A, c.713-155T>C, c.834+7G>A, c.1263G>C, c.1332C>T, c.1478-94C>G i c.1869T>C. ^b: anàlisi per regressió logística ajustat per factors de risc. A: L'haplotip més freqüent (CGTGGCCT) és l'haplotip de referència. B: Efecte del fons de l'haplotip sobre les variants dels introns 7 i 8. En cada cas la variant menys comuna () és comparada amb la més comuna amb el mateix fons haplotípic.

Haplotip ^a	Control	pacients	OR ^b	I. Isq.	OR ^b	I.Hemor.	OR ^b
	n=						
	150	653		456		197	
	Freq.	Freq.		Freq.		Freq.	
CGTGGCCT	0,24	0,26	-	0,23	-	0,30	-
CACAGCCT	0,13	0,10	0,56 [0,34-0,93]	0,09	0,51 [0,29-0,90]	0,12	0,59 [0,31-1,11]
CGTAGCCT	0,12	0,11	1,39 [0,75-2,57]	0,12	1,19 [0,65-2,18]	0,09	1,39 [0,60-3,22]
CGCGGCCT	0,07	0,08	1,42 [0,72-2,80]	0,10	1,30 [0,69-2,44]	0,07	1,11 [0,50-2,49]
CACGGCCT	0,05	0,07	2,00 [0,94-4,24]	0,08	2,07 [0,93-4,58]	0,05	-
CGCAGCCT	0,02	0,03	1,16 [0,42-3,17]	0,03	0,99 [0,32-3,11]	0,04	-
CGTGCTCC	0,02	0,02	1,01 [0,37-2,74]	0,03	1,27 [0,48-3,40]	0,03	-
B							
C_CGGCCT			1,40 [0,54-3,70]		1,59 [0,62-4,09]		4,7 [0,73-30,6]
C_CAGCCT			0,48 [0,16-1,44]		0,52 [0,15-1,74]		-
C_GGCCT			0,70 [0,36-1,39]		1,30 [0,69-2,44]		0,41 [0,11-1,49]
C_GAGCCT			1,20 [0,35-4,11]		0,84 [0,22-3,15]		-
CG_CGCCT			0,82 [0,23-2,93]		0,77 [0,20-2,96]		-
CGT_GCCT			1,39 [0,75-2,57]		1,19 [0,65-2,18]		0,76 [0,25-2,27]
CAC_GCCT			0,28 [0,11-0,71]		0,25 [0,09-0,68]		0,12 [0,02-0,73]

A la **TAULA 43** es poden observar els resultats obtinguts amb el programa THESIAS, els quals confirmen els anteriors. També indica que l'haplotip CACA és un factor de protecció d'aquells ictus que tenen un component ateroescleròtic (I. ateroescleròtic, I. Ilacunar, IH. profunda) i els que afecten a la microvasculatura (I. Ilacunars i IH. profunda).

TAULA 43

Freqüència i Odds Ratio dels haplotips més freqüents a la població estudiada. ^a: c.280-170C>G, c.712+26G>A, c.713-155T>C i c.834+7G>A.

A: L'haplotip més freqüent (CGTG) és l'haplotip de referència. B: Efecte del fons de l'haplotip sobre les variants dels introns 7 i 8. En cada cas la variant menys comuna () és comparada amb la més comuna amb el mateix fons haplotípic.

Haplotip ^a :	Controls Pacients OR [95%IC]		I. Isquèmic n=399		I. Hemorràgic n=199		ATER+LLAC+ IH Prof n=313.		LLAC+ IH Prof n=204		
	n=150	n=656	OR [95%IC]	n=399	OR [95%IC]	n=199	OR [95%IC]	n=313.	OR [95%IC]	n=204	
C G T G	0,35	0,33	1	0,32	-	0,36	-	0,35	1,0	0,33	1,0
C G T A	0,14	0,14	1,19 [0,71-2,03]	0,15	1,01 [0,57-1,79]	0,15	1,60 [0,79-3,24]	0,16	1,70 [0,84-3,44]	0,16	1,70 [0,84-3,44]
C G C G	0,10	0,14	1,26 [0,76-2,07]	0,14	1,14 [0,67-1,98]	0,12	1,06 [0,57-1,98]	0,13	1,43 [0,61-2,00]	0,15	1,56 [0,86-2,95]
C A C A	0,15	0,10	0,55 [0,34-0,90]	0,10	0,48 [0,28-0,83]	0,12	0,54 [0,28-1,04]	0,10	0,43 [0,24-0,79]	0,10	0,48 [0,25-0,93]
C A C G	0,05	0,08	1,81 [0,87-3,77]	0,09	1,87 [0,86-4,06]	0,08	1,34 [0,54-3,31]	0,05	1,74 [0,76-4,03]	0,08	1,68 [0,65-4,34]
G G C G	0,06	0,08	1,55 [0,70-3,41]	0,07	1,37 [0,56-3,38]	0,10	2,58 [0,98-6,82]	0,06	1,33 [0,55-3,22]	0,07	1,46 [0,51-4,14]
C G C A	0,06	0,07	1,27 [0,62-2,61]	0,07	1,46 [0,67-3,17]	0,06	1,06 [0,41-2,74]		ND	ND	ND
B:											
C G T -			1,20 [0,71-2,03]		1,01 [0,57-1,79]		1,60 [0,79-3,24]		1,43 [0,77-2,66]		1,70 [0,84-3,44]
C G C -			1,00 [0,42-2,44]		1,26 [0,48-3,32]		1,00 [0,31-3,23]		0,83 [0,33-2,10]		0,40 [0,10-1,60]
C A C -			0,30 [0,12-0,73]		0,25 [0,10-0,66]		0,40 [0,13-1,23]		0,25 [0,09-0,71]		0,28 [0,09-0,90]
C - C G			1,43 [0,66-3,14]		1,63 [0,72-3,72]		1,26 [0,48-3,31]		1,57 [0,62-3,94]		1,08 [0,39-2,97]
C - C A			0,43 [0,18-1,02]		0,33 [0,13-0,84]		0,51 [0,16-1,52]		0,63 [0,26-1,53]		0,76 [0,21-2,76]
C G - G			0,79 [0,48-1,30]		1,15 [0,67-1,98]		1,06 [0,57-1,98]		1,11 [0,62-2,00]		0,64 [0,33-1,21]
C G - A			0,94 [0,38-2,32]		1,44 [0,54-3,81]		0,66 [0,21-2,06]		nd		nd

4.5.3. Estudi en altres poblacions

El polimorfisme c.834+7G>A també ha estat analitzat en altres malalties que, per les seves característiques podien estar associades a l'activitat de la GAS6.

Tal i com s'observa a la **TAULES 44, 46 i 47** la freqüència de l'al·lel A en els controls de les diferents malalties és al voltant de 0,32 (0,29 a la població d'ictus isquèmic en pacients joves (**TAULA 44**) i el 0,32 a les altres poblacions), inferior a la freqüència en individus control que havíem obtingut anteriorment a controls de la malaltia aterotrombòtica (Sevilla) i cerebrovascular (Barcelona), que presentaven unes freqüències de 0,40 i 0,42 respectivament.

TAULA 44

Freqüències al·lèliques, genotípiques, i Odds Ratio pel c.834+7G>A en població de pacients joves amb ictus isquèmic. *test χ^2 per l'estudi de l'equilibri Hardy-Weinberg. CEMB: ictus cardioembòlic; ATER: ictus ateroscleròtic; LLAC: ictus llacunar; DESC: ictus de causa desconeguda; AIT: accident isquèmic transitori.

	N	Edat (0)	freq. al·lel A	GG n (%)	GA n (%)	AA n (%)	HWE* χ^2 (Pvalor)	OR (95%, IC)
Controls	196	35	0,29	97 (50)	85 (43)	14 (7)	0,73	
I. isq.	126	40	0,31	54 (43)	65 (52)	7 (5)	0,08	AA vs.GG 0,97 [0,36-2,57] AA/GA vs.GG 1,29 [0,82-2,03] AA vs.GA/GG 0,83 [0,32-2,15]
AIT:	50	40	0,48	10 (20)	32 (64)	8 (16)	0,14	AA vs.GG 5,97 [0,32-2,15] AA/GA vs.GG 3,88 [1,84-8,19] AA vs.GA/GG 2,70 [1,05-6,92]
Per subtipus de malaltia:								
ATER	32		0,33	12 (38)	19 (59)	1 (3)	0,15	AA vs.GG 0,62 [0,07-5,18] AA/GA vs.GG 1,62 [0,75-3,49] AA vs.GA/GG 0,46 [0,60-3,62]
CEMB	42		0,42	12 (29)	25 (59)	5 (12)	0,35	AA vs.GG 3,11 [0,94-10,2] AA/GA vs.GG 2,42 [1,17-5,00] AA vs.GA/GG 1,91 [0,64-5,69]
LLAC	39		0,37	13 (33)	23 (59)	3 (8)	0,26	AA vs.GG 1,72 [0,43-6,86] AA/GA vs.GG 1,94 [0,94-3,99] AA vs.GA/GG 1,18 [0,32-4,35]
DESC	49		0,31	21 (43)	26 (53)	2 (4)	0,22	AA vs.GG 0,71 [0,15-3,39] AA/GA vs.GG 1,29 [0,69-2,43] AA vs.GA/GG 0,60 [0,13-2,76]
Altres	14		0,43	6 (43)	4 (29)	4 (29)		-

En la població de pacients joves amb ictus hi ha alguns grups de pacients que presenten una freqüència de l'al·lel A molt més elevada que a la població control de la malaltia (**TAULA 44**). En el cas de l'AIT (0,48), el dels subtipus cardioembòlic (0,42) i

els que han patit un I. llacunar (0,37), a diferència del observat a les poblacions anteriors l'al·lel A sembla ser un factor de risc per a la malaltia.

Al grup de pacients tractats amb anticoagulants orals no hi ha associació del polimorfisme amb el fenotip d'individus que han patit complicacions hemorràgiques (pacients) respecte els que no ha patit cap complicació (**TAULA 45**).

TAULA 45

Freqüències al·lèliques, genotípiques, i OR pel c.834+7G>A en pacients tractats amb anticoagulants orals. (edat: en mitjana d'anys)

	N	Edat (anys)	al·lel A freq.	GG (%)	GA (%)	AA (%)	HWE* χ^2 (Pvalor)	OR (95%, IC)
Controls	108	68	0,30	53 (49)	45 (42)	10 (9)	0,99	
Pacients	68	70	0,36	26 (38)	35 (52)	7 (10)	0,63	AA vs.GG 1,47 [0,49-4,18] AA/GA vs.GG 1,52 [0,82-2,82] AA vs.GA/GG 1,14 [0,41-3,16]

El grup de pacients que han sofert un infart de miocardi també presenten una major freqüència de l'al·lel A (0,39) respecte la freqüència del grup control (0,32), tot i que la diferència no és significativa (**TAULA 46**).

TAULA 46

Freqüències al·lèliques. genotípiques i OR pel c.834+7G>A en pacients amb infart de miocardi.

	N	Edat (anys)	al·lel A freq.	GG (%)	GA (%)	AA (%)	HWE* χ^2 (Pvalor)	OR (95%, IC)
Controls	147	43	0,32	67 (46)	66 (45)	14 (9)	0,93	
Pacients	138	45	0,39	50 (36)	69 (50)	19 (14)	0,82	AA vs.GG 1,67 [0,79-3,51] AA/GA vs.GG 1,51 [0,93-2,43] AA vs.GA/GG 1,66 [0,79-3,51]

La darrera patologia que hem analitzat és la nefropatia diabètica. A la **TAULA 47** es pot observar que tant pacients com controls presenten unes freqüències al·lèliques i genotípiques molt similars.

TAULA 47

Freqüències al·lèliques, genotípiques, i OR pel c.834+7G>A en pacients amb nefropatia diabètica.

	N	Edat (anys)	al·lel A freq.	GG (%)	GA (%)	AA (%)	HWE* χ^2 (Pvalor)	OR (95%, IC)
Controls	95	32	0,32	44 (46)	41 (43)	10 (11)	0,99	
Pacients	99	64	0,32	45 (46)	44 (44)	10 (10)	0,99	AA vs.GG 0,98 [0,37-2,58] AA/GA vs.GG 1,03 [0,59-1,82] AA vs.GA/GG 0,95 [0,38-2,41]

4.6. SNP i haplotips al projecte HapMap

Les bases de dades de polimorfismes (dbSNP i HapMap) indiquen la presència d'altres polimorfismes al *GAS6* que podien ser útils per l'estudi del gen. Pel que fa a dbSNP, es descriu la presència de 2 polimorfismes no validats en seqüència del cDNA que no hem trobat al conjunt de mostres (50 cromosomes) que hem analitzat de la nostra població (rs1131093 a l'exó 1 i rs7992146 a l'exó 13). Al projecte HapMap hi ha descrits només dos polimorfismes que han estat genotipats també per nosaltres (rs81911973 a l'intró 3 amb una freqüència de l'al·lel menys comú (G) de 0,11 per 0,15 en el nostre estudi; i el rs7323932 (i7-3') però que a HapMap no n'indica la freqüència a població caucasoide) (**TAULA 48**).

TAULA 48

Polimorfismes descrits a HapMap i a dbSNP (^a: els 2 analitzats a la nostra població sense trobar-ne cap variant a *GAS6*).

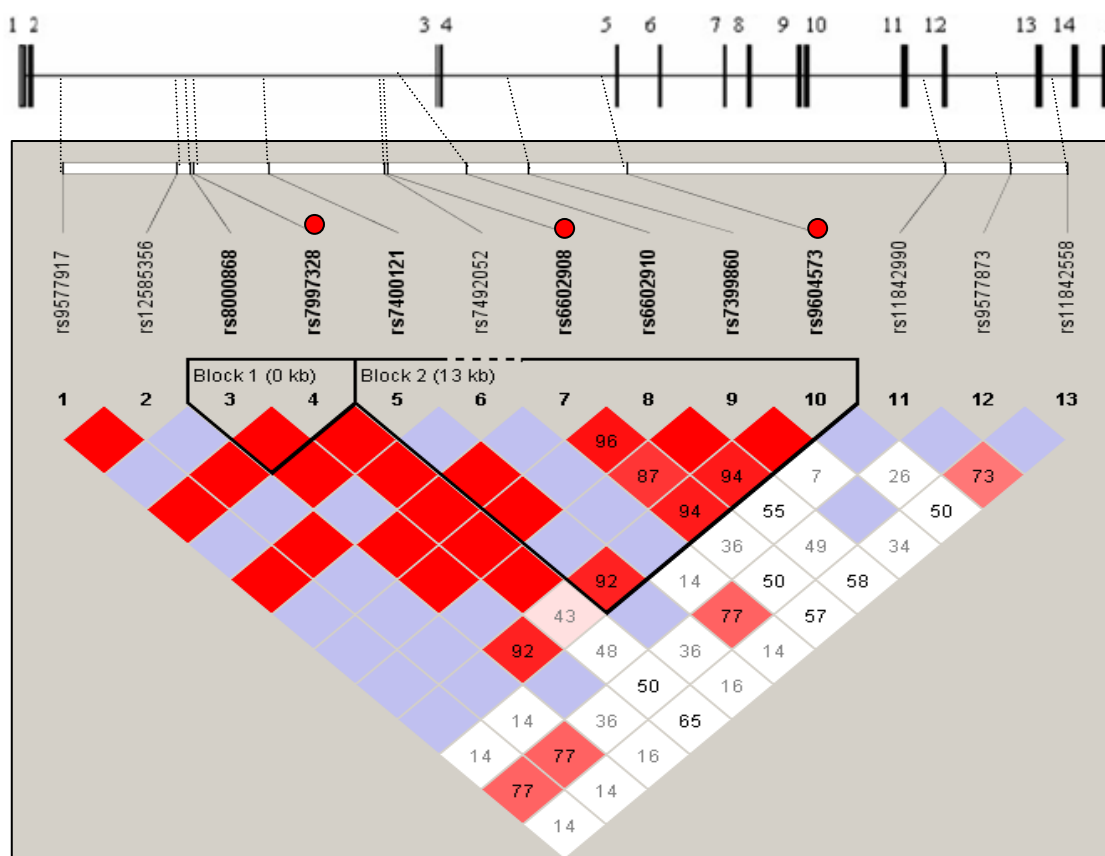
Polimorfisme	localització	variant	freqüència al·lel menor	individus
rs1131093 ^a	Exó 1	A>C	no validat	-
rs8181793	a 1,6 Kb a 5' del gen	T>C	0,05	120
rs9577917	intró 2	C>A	0,04	120
rs7490435	“	G>T	0,04	120
rs7322220	“	A>G	0,08	120
rs7994900	“	G>A	0,36	120
rs12585356	“	T>C	0,04	120
rs8000868	“	G>A	0,15	120
rs7997328	“	T>C	0,27	120
rs7400121	“	T>C	0,15	120
rs7492052	“	G>A	0,04	120
rs6602908	“	A>G	0,40	120
rs6602909	“	A>G	0,45	71
rs7400614	“	G>T	0,38	42
rs6602910	“	A>G	0,39	120
rs81911973	intró 3	C>G	0,11	100
rs7399860	intró 4	A>C	0,19	120
rs9577923	“	C>G	0,26	116
rs7319547	“	A>G	0,14	108
rs6602912	“	A>C	0,48	48
rs9604573	“	C>T	0,25	120
rs7333857	intró 7	C>T	0,09	120
rs7323932	“	T>C	0,31	88 (no europea)
rs11842990	intró 11	T>C	0,07	120
rs9577873	intró 12	T>C	0,09	118
rs7992146 ^a	Exó 13	G>A(R500G)	no validat	-
rs11842558	intró 13	T>C	0,07	120

La resta de polimorfismes descrits al HapMap són a seqüències intròniques allunyades dels introns i no han estat analitzats en aquest estudi.

A la **FIGURA 38** es pot veure la representació gràfica del LD entre els polimorfismes del gen *GAS6* descrits i genotipats al projecte HapMap, obtinguda amb el programa Haploview. Només s'observa una zona amb clar LD en la regió 5' del gen (els polimorfismes situats entre l'intró 2 i l'intró 4). A la resta del gen no hi ha cap bloc d'haplotips. Aquest resultat és similar al que trobem nosaltres en l'estudi d'haplotips a la població de Barcelona (**APARTAT 4.5.2.3.**), tot i que el nostre estudi incloïa menys polimorfismes en aquesta zona i, per tant, no es podia fer un mapa tan detallat.

FIGURA 38

SNP a *GAS6* genotipats pel projecte HAPMAP i desequilibri de lligament descrit amb l'Haploview. En vermell, llocs amb gran LD entre els SNP. ● : tagSNP



El HapMap detecta els polimorfismes rs7997328, rs6602908 i rs9604573 com els tagSNP que cobreixen els dos blocs detectats.

En el HapMap tampoc s'ha trobat desequilibri de lligament entre els diferents polimorfismes genotipats al gen *GAS6* i els polimorfismes dels gens propers a la regió cromosòmica 13q34 (*F7*, *F10* i *PROZ*).

4.7. Estudis funcionals

4.7.1. Prediccions *online*

L'anàlisi dels polimorfismes identificats amb el programa *online* SpliceView no va detectar cap diferència important en les seqüències *consensus* de *splicing* en els al·lels menys freqüents respecte els més freqüents. A la **TAULA 49** es mostra els valors obtinguts (màxim de 1 per a una seqüència donadora o acceptora *consensus* de *splicing* perfecte) per les seqüències de *splicing* natural (*wild type*) i l'efecte de les variants més properes a cadascuna d'aquestes seqüències. S'hi observa que cap de les variants crea noves dianes ni modifica les existents (tabulat com s.e., de "sense efecte"), amb l'excepció dels polimorfismes de l'intró 7, els quals podrien crear una seqüència acceptora de *splicing* alternatiu, si bé amb un valor inferior a les naturals pels introns 6 i 7.

TAULA 49

Resultats de l'anàlisi dels SNP a *GAS6* amb el programa SpliceView.

s.e.: sense efecte; ^a: el nucleòtid +1 és el primer del gen *GAS6*.

A: Seqüències donadores de *splicing*

B: Seqüències acceptores de *splicing*.

A

<u>POSICIÓ <i>GAS6</i>^a</u>	<u>SEQÜÈNCIA</u>	<u>Puntuació</u> (màxim=1)	<u>localització</u>	<u>efete</u> <u>variant</u>
<u>DONADORS <i>SPLICING</i>:</u>				
	EXÓ_INTRÓ			
225	TTG_GTGAGT	0,88	IVS 1	s.e.
483	ACG_GTGAGC	0,88	IVS 2	s.e.
16.032	TAG_GTAAGT	0,89	IVS 3	s.e.
17.531	AAA_GTAAGT	0,89	IVS 4	s.e.
24.330	AAG_GTACGT	0,90	IVS 5	s.e.
25.989	AAG_GTAAGG	0,92	IVS 6	s.e.
28.545	GAG_GTACCC	0,77	IVS 7	s.e.
29.507	GAG_GTAGGC	0,85	IVS 8	s.e.
31.424	CAG_GTGAGG	0,94	IVS 9	s.e.
31.759	ACA_GTGAGT	0,84	IVS 10	s.e.
35.511	CCT_GTGAGT	0,85	IVS 11	s.e.
37.062	ACA_GTAAGT	0,84	IVS 12	s.e.
40.683	CAG_GTAGGG	0,87	IVS 13	s.e.
42.100	CAG_GTAGGT	0,92	IVS 14	s.e.

B

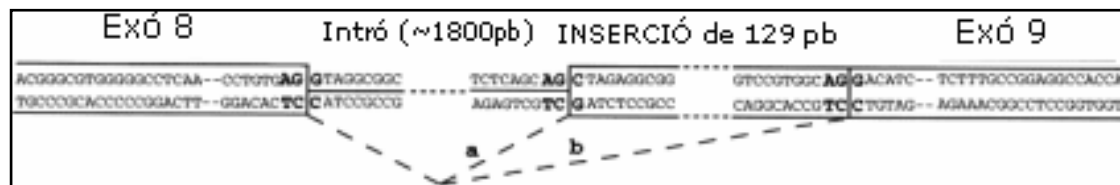
<u>POSICIÓ GAS6^a</u>	<u>SEQÜÈNCIA</u>	<u>Puntuació</u> (màxim=1)	<u>localització</u>	<u>efete</u> <u>variant</u>
<u>ACCEPTORS SPLICING:</u>				
	INTRÓ EXÓ			
317	TCCGGGCAG_CCGC	0,85	IVS 1	s.e.
16.008	TTTCCACAG_GATT	0,97	IVS 2	s.e.
17.469	TTCCTGCAG_ACTG	0,93	IVS 3	s.e.
24.208	CCCAATCAG_ACCT	0,80	IVS 4	s.e.
25.867	TGTTCCCAG_ATGT	0,84	IVS 5	s.e.
28.423	TGCTTGCAG_ACAT	0,90	IVS 6	s.e.
28.590	ACGCCCAAG_TCTA	0,77	IVS 7	c.712+26 A < 0,70
29.231	GCTTCCAG_TGGG	0,78	IVS 7	c.713-155 C 0,79
29.386	GGCTGGCAG_ATGT	0,84	IVS 7	s.e.
31.306	CCGTGGCAG_GACA	0,81	IVS 8	s.e.
31.570	GGTGCCCGAG_GCTG	0,83	IVS 9	s.e.
35.347	TCTCTTCAG_ATCT	0,86	IVS 10	s.e.
36.894	CCTTTCAG_ATAA	0,89	IVS 11	s.e.
40.508	TCATTGCAG_TGCG	0,83	IVS 12	s.e.
41.872	CTCCTGCAG_CTGG	0,84	IVS 13	s.e.
43.040	GCGGCCCGAG_ATGT	0,84	IVS 14	s.e.

4.7.2. Anàlisi de variants de *splicing*

El grup de Goruppi i Marcandalli (Goruppi et al. 1997b; Marcandalli et al. 1997) va descriure una nova variant de la proteïna GAS6 que consistia en la incorporació de 43 aminoàcids a la zona que uneix el quart domini EGF i la zona del domini D. Aquesta variant correspon a una inserció de 129 pb a l'inici de l'intró 9, perquè es produeix el reconeixement d'un acceptor de *splicing* diferent (**FIGURA 39**).

FIGURA 39

Variant de *splicing* de GAS6. (figura modificada de (Marcandalli et al. 1997)).



Hem realitzat l'anàlisi de 26 mostres de mRNA d'artèries coronàries de persones sanes (16 mostres) i de malalts amb l'artèria aterosclerosada (10 mostres), amb diferents genotips pel polimorfisme de l'intró 8 i no hem trobat cap diferència del patró normal (fragment de 233 pb) que s'obté de l'amplificació per PCR amb els oligonucleòtids E8RTF-E8RTR que amplifiquen la zona de RNA compresa entre l'intró 8 i 10 (**FIGURA 40**).

4.7.3. Estudis del mRNA

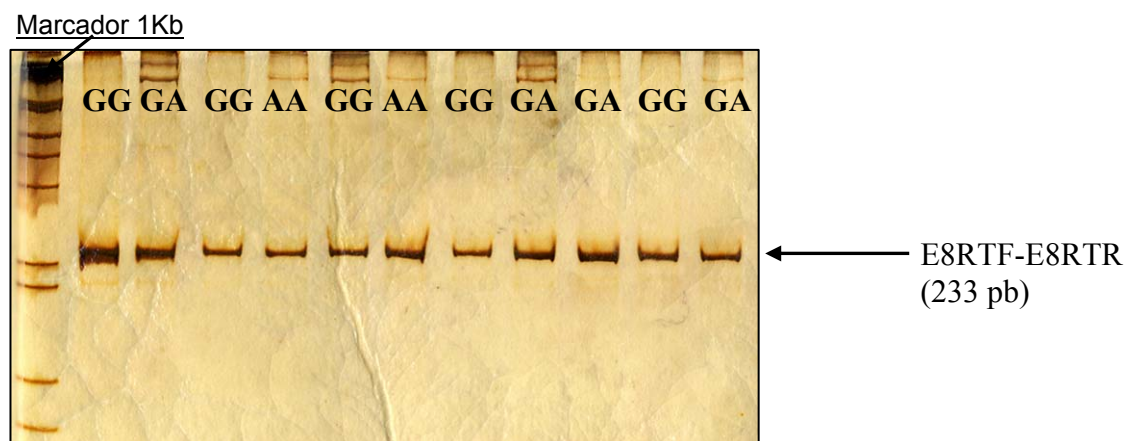
La preparació de les mostres és un dels aspectes més crítics per tal d'evitar la seva degradació i que els resultats siguin erronis.

S'ha amplificat la regió compresa entre els encebadors E8RTF-E8RTR (una part de l'èxon 8, l'èxon 9 i una part de l'èxon 10) per observar quina mida té el producte amplificat. Aquesta amplificació donava un producte de PCR de 233 pb que era exactament la mida que esperàvem que donés en cas que hi hagués un procés normal de processament del mRNA (**FIGURA 40**). La inserció de 129 pb descrita a l'intró 8 de *GAS6*, que dona lloc a una isoforma de la proteïna amb 43 aminoàcids extra (Goruppi et al. 1997b), no la trobem a les mostres de teixit d'artèria coronària analitzades. Aquesta isoforma podia ser interessant pel fet que el polimorfisme identificat per nosaltres c.834+7G>A associat a ictus està al mateix intró 8. No obstant, l'anàlisi del mRNA de mostres amb diferents genotips per aquest polimorfisme (tant en mostres sanes com en mostres amb placa

ateroscleròtica) no ens ha mostrat cap diferència en quant a la mida del fragment amplificat per PCR (**FIGURA 40**).

FIGURA 40

cDNA de *GAS6* corresponents als exons de 8 a 10, amplificats amb els encebadors E8RTF i E8RTR, segons el genotip pel SNP c.834+7G>A.



Atès que el producte amplificat qualitativament era el mateix en totes les mostres estudiades (**FIGURA 40**), vam analitzar-ho quantitativament per observar si aquest polimorfisme tenia algun paper en l'expressió del gen.

Per realitzar aquest estudi quantitatiu a temps real calia escollir el gen de referència control que tingués un patró d'expressió constant al teixit a analitzar i que tingués una eficiència d'amplificació de la PCR similar a la del fragment diana (*GAS6* amplificat amb els encebadors D1 i Cb2). El fragment del gen diana *GAS6* amplificat té una eficiència d'amplificació de 1,80 molt similar a les eficiències dels gens que hem utilitzat com a referència (*GAPDH*, *B2M* i *ciclofilina A*) (**TAULA 50**). El fragment amplificat del gen del RNA ribosòmic 18S (Rodríguez-Santiago et al. 2005) no es va poder utilitzar com a gen de referència a causa de la baixa eficiència d'amplificació que vam obtenir (eficiència del 1,492 i error del 0,030).

TAULA 50

Eficiències de la PCR dels fragments de cDNA amplificats per l'estudi d'expressió.

Gen	Eficiència	punts recta	error	CP (dilució 1/5)
<i>GAS6</i>	1,80	4	<0,01	23,7 ±0,1
<i>GAPDH</i>	1,85	4	<0,01	19,4 ±0,1
<i>B2M</i>	1,85	4	0,01	16,8 ±0,2
<i>Ciclofilina A</i>	1,87	3	0,03	22,3 ±0,3
<i>18S</i>	1,49	4	0,03	15,3 ±0,3

Els controls interns (el nostre cas és la dilució 1/10 d'una nova RT de 1,5 µg del pool de mRNA de diferents genotips) utilitzats en cada carrera de PCR ens ha permès observar que hi ha una bona reproductibilitat tant a nivell de cada carrera del LigthCycler® (desviació estàndard (DE) intracarrera o intrasèrie, rèplica a cada rotor (carrera)), com a nivell de diferents rotors (DE externa o intersèrie) (**TAULA 51**). En el cas que hi hagués DE de la reacció importants ens indicaria que hi ha un error en la preparació de les mostres.

Com es pot observar a la **TAULA 51** quan la CP és més elevada l'error és major. Per tant, cal treballar amb la dilució idònia del producte de la RT perquè l'error no sigui gaire elevat. Hem utilitzat les dilucions 1/10 en els fragments amplificats dels cDNA dels gens *GAS6*, *B2M*, *GAPDH* i de 1/100 al gen *Ciclofilina A*: aquestes dilucions estan situades en la linealitat de la corba d'eficiència realitzada pels diferents fragments (**FIGURES 41-44**).

TAULA 51

CP i desviacions estàndard de la mostra control en diferents anàlisis.
La mostra control és la dilució 1/10 de la barreja RTpool. ^a s'ha utilitzat també la dilució 1/75.
^b: per aquest gen la mostra control és la dilució 1/100

Gen	carreres (n)	CP (mitjana)	DE (intersèrie)	DE (intrasèrie, n=2)
<i>GAPDH</i>	5	19,81	±0,12	±0,03
<i>GAS6</i>	8	23,04	±0,18	±0,14
<i>B2M</i>	2 i 3 ^a	19,75 i 23,18	±0,06 i ±0,18	±0,00 i ±0,11
<i>Ciclofilina A</i> ^b	5	25,45	±0,36	±0,12

A les **FIGURES 41-44** es pot observar les corbes d'amplificació (A) a les corresponents dilucions seriades (1/5, 1/25, 1/125, 1/625) per calcular l'eficiència (amb 4 punts a la recta) de la reacció, (C) i la corba de fusió que és característica per a cada fragment amplificat (B): el de *GAS6* té una temperatura de fusió de 83°C, el de *GAPDH* de 89°C, el de *B2M* de 83°C i el de la *ciclofilina A* de 86°C.

Els productes amplificats per PCR han estat seqüenciats per veure que el que s'amplifica és exactament la seqüència que esperem. També es realitza la carrera per electroforesi en gel d'agarosa per observar que l'amplificat té la mida esperada (**FIGURES 41-44** (D)). Un cop identifiquem quina temperatura de fusió té cada fragment amplificat per uns encebadors determinats, aquesta temperatura ens servirà per identificar l'especificitat del producte.

FIGURA 41

Imatge de les corbes d'amplificació (A), de fusió (B) i d'eficiència (C) i gel d'agarosa (D) del fragment de cDNA del gen *GAS6*.

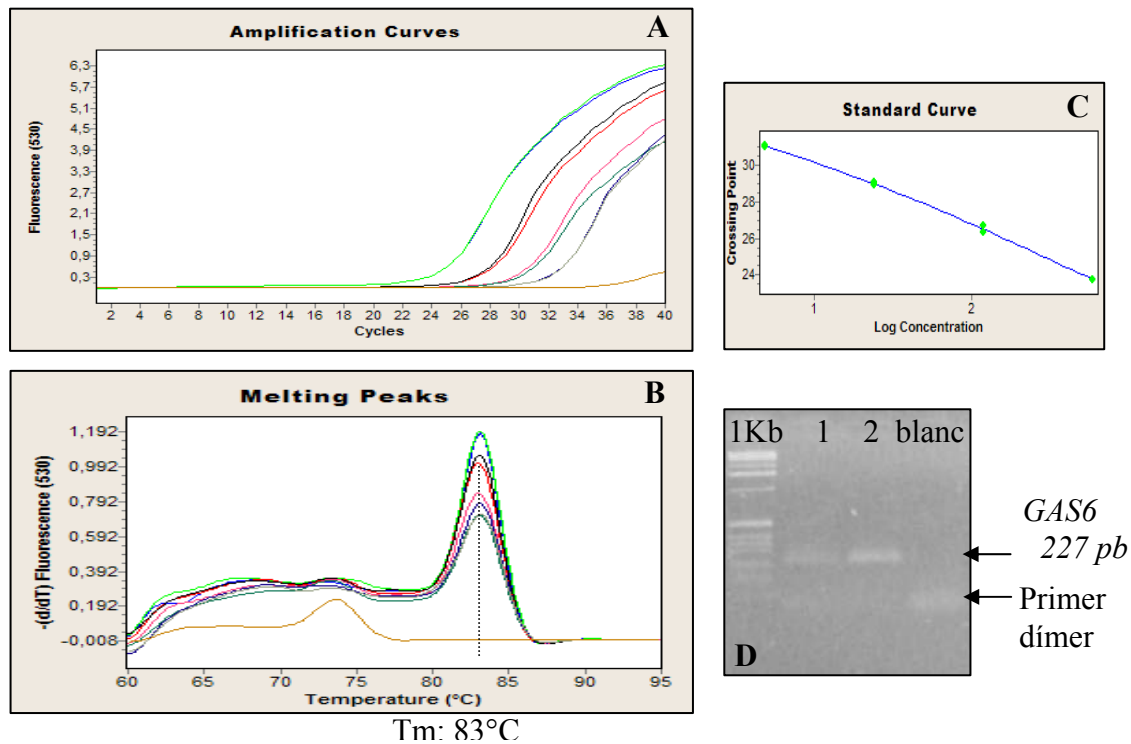


FIGURA 42

Imatge de les corbes d'amplificació (A), de fusió (B) i d'eficiència (C) i gel d'agarosa (D) del fragment de cDNA del gen *GAPDH*.

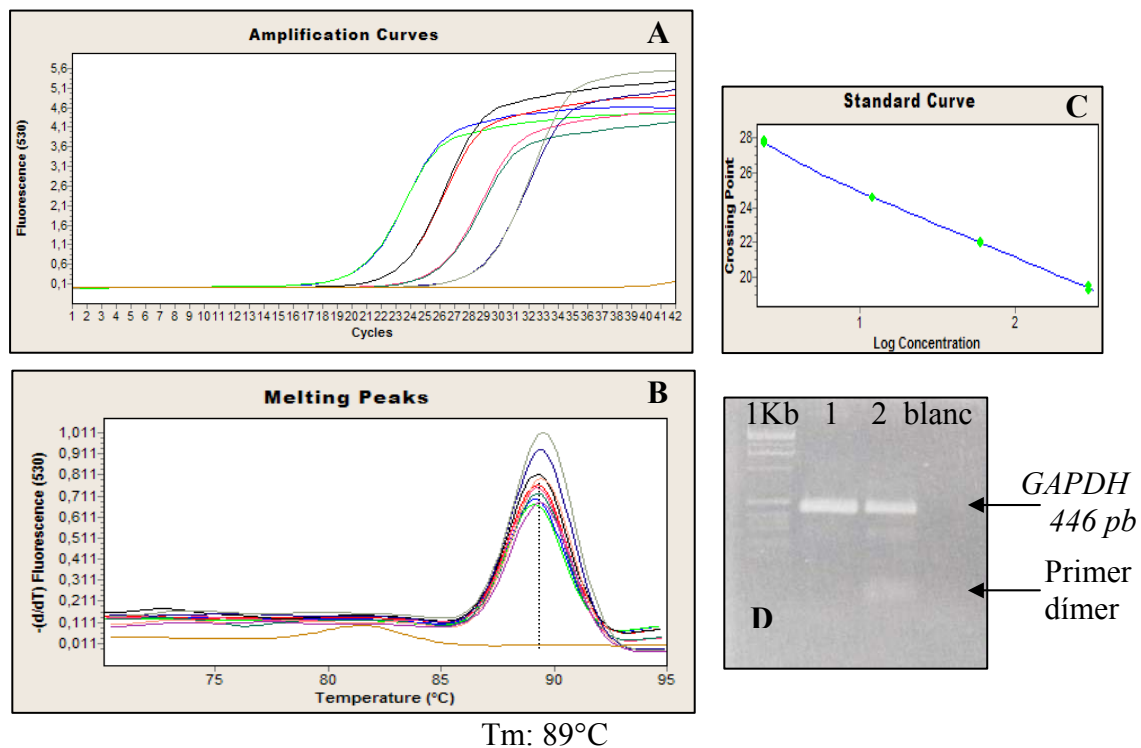


FIGURA 43

Imatge de les corbes d'amplificació (A), de fusió (B) i d'eficiència (C) i gel d'agarosa (D) del fragment de cDNA del gen *B2M*.

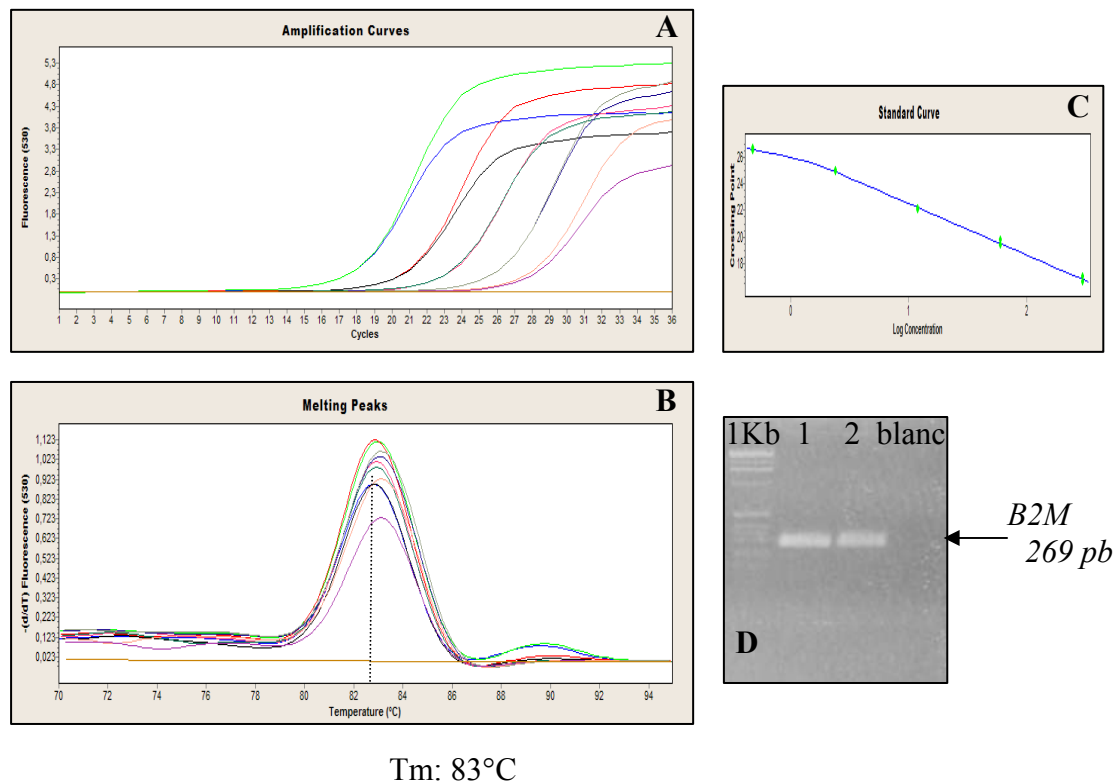
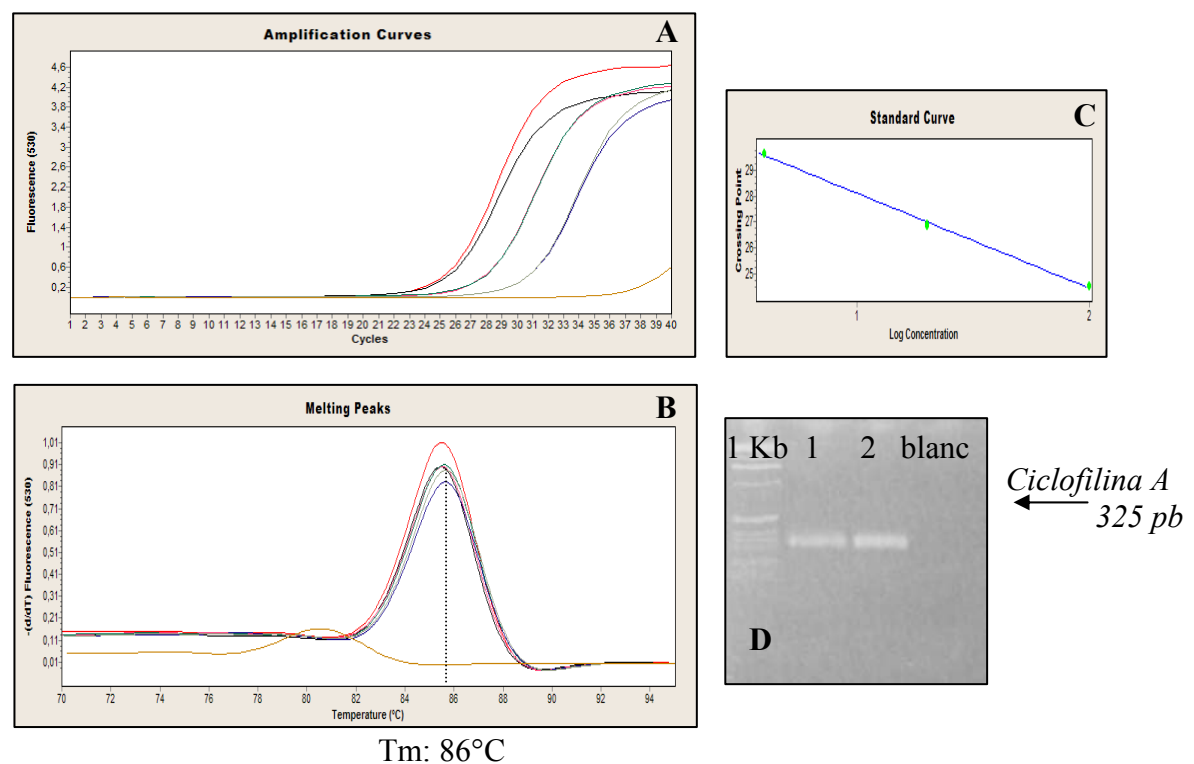


FIGURA 44

Imatge de les corbes d'amplificació (A), de fusió (B) i d'eficiència (C) i gel d'agarosa (D) del fragment de cDNA de *ciclofilina A*.



A la **TAULA 52** es mostren els resultats de l'amplificació per RT-PCR del mRNA de *GAS6* i els gens de referència, procedents de diferents mostres d'artèries coronàries. Es pot observar que a la rèplica de la transcripció inversa (RT2) el nombre de mostres és inferior a les de primera transcripció perquè no hi havia prou RNA per fer una nova RT-PCR o no hi havia prou quantitat de teixit per fer una nova extracció de RNA. Totes les mostres de la RT2 corresponen a mostres que ja havien estat analitzades a la RT1 i, per tant, corresponen a rèpliques de la primera transcripció inversa (RT1).

TAULA 52

RT-PCR al LightCycler® del mRNA de *GAS6* de mostres sanes d'artèria coronària (controls) i mostres d'artèria aterosclerosada (pacients).

Gen	n	controls		n	pacients	
		CP	DE		CP	DE
<i>GAS6</i>	RT1	16	25,6 ±1,0	10	25,16 ±1,6	
	RT2	10	24,6 ±0,7	6	24,92 ±1,0	
<i>GAPDH</i>	RT1	14	22,0 ±1,4	10	22,4 ±1,6	
	RT2	10	21,9 ±1,4	6	22,2 ±1,1	
<i>B2M</i>	RT1	16	22,9 ±3,4	9	21,9 ±1,1	
	RT2	10	22,4 ±3,3	6	22,0 ±1,9	
<i>Ciclofilina-A</i>	RT1	12	27,1 ±1,7	9	27,1 ±1,3	
	RT2	9	26,7 ±0,5	8	27,2 ±1,2	

Com es pot veure a la **TAULA 52** els 4 gens estudiats tenen uns valors de mitjana d'expressió molt similars en pacients i controls, no observant-se diferències aparents en l'expressió de *GAS6*.

La quantificació relativa permet donar els resultats en termes d'augment o disminució de l'expressió del gen diana respecte del gen de referència. Aquesta anàlisi l'hem realitzat amb el programa REST® que compara la ratio d'expressió de les mostres problema (expressió del gen *GAS6* respecte el gen de referència a les mostres problema) amb les mostres control (expressió del gen *GAS6* respecte el gen de referència a les mostres control), normalitzat per l'eficiència d'amplificació de la PCR.

L'anàlisi per comprovar el possible efecte que podia tenir el genotip pel SNP de l'intró 8 (c.834+7G>A) sobre els nivells d'expressió de *GAS6*, s'observa que les mostres amb el genotip AA tenen una mitjana de CP al gen *GAS6* més baixa que les mostres amb un altre genotip, una semblança però també en els gens de referència i, per tant, un cop

feta la normalització pels gens control, aquesta diferència no és significativa (**TAULA 53**).

Després de fer duplicats de cada amplificació, la comparació de les mostres considerades com a casos (extretes de teixit d'artèria coronària amb placa ateroscleròtica) s'ha realitzat amb les mostres considerades com a control, extretes d'artèria coronària sense placa ateroscleròtica. Els valors sense normalitzar pels gens de referència, ja mostren que no hi ha diferències en les mitjanes dels valors $CP \pm DE$ (desviació estàndard) dels dos tipus de mostres (**TAULA 54**).

A la **TAULA 54** es pot observar com les mostres problema presenten una lleugera sobreexpressió del gen *GAS6* quan són comparades amb les mostres control i són normalitzades amb els gens *GAPDH* i *ciclofilina A*. Aquest augment, però, no és significatiu. Quan es realitza la comparació amb el gen de la *B2M*, s'observa que el *GAS6* està menys expressat que el de referència. De fet la *B2M* ja presenta una expressió elevada en individus pacients respecte als seus controls quan es compara amb els gens controls, tot i que no és un valor de sobreexpressió significatiu.

TAULA 53

Anàlisi d'expressió relativa entre els diferents genotips del polimorfisme c.834+7G>A a GAS6.

^a: mitjana de CP i desviació estàndard, en parèntesi el nombre de mostres analitzades. ^b: ratio d'expressió del gen GAS6 (mostres amb genotip AA respecte mostres amb genotip no AA) normalitzat amb el gen control corresponent, en parèntesi el valor P.

GAS6 (n)	GAPDH (n)		B2M (n)		Ciclof.A (n)	
	RT1	RT2	RT1	RT2	RT1	RT2
No AA ^a : 25,5 ±1,2 (12)	24,7 ±1,0 (12)	21,9 ±2,4 (24)	22,2 ±1,8 (15)	22,4 ±2,2 (28)	22,3 ±2,4 (18)	27,2 ±1,9 (21) 26,9 ±1,1 (13)
AA ^a : 24,5 ±3,1 (12)	24,1 ±0,9 (12)	21,5 ±1,3 (9)	21,7 ±0,5 (7)	21,0 ±1,9 (8)	21,3 ±1,7 (7)	26,4 ±0,5 (9) 26,0 ±0,9 (6)
Expressió ^b :		1,28 (0,42)	1,21 (0,54)	0,59 (0,14)	0,91 (0,78)	0,93 (0,84) 0,83 (0,67)

TAULA 54

Anàlisi d'expressió relativa per PCR a temps real entre mostres amb i sense placa d'ateroma.

^a: mitjana de CP i desviació estàndard, en parèntesi el nombre de mostres analitzades. ^b: ratio d'expressió del gen GAS6 (mostres d'artèria amb placa d'ateroma respecte mostres d'artèries sense placa) normalitzat amb el gen control corresponent, en parèntesi el valor P.

GAS6 (n)	GAPDH (n)		B2M (n)		Ciclof.A (n)	
	RT1	RT2	RT1	RT2	RT1	RT2
Control ^a : 25,6 ±1,0 (16)	24,6 ±0,7 (10)	21,7 ±1,8 (14)	21,7 ±1,9 (10)	22,9 ±3,4 (16)	22,4 ±1,8 (11)	27,1 ±1,7 (12) 26,7 ±0,5 (7)
Cas ^a : 25,2 ±1,6 (10)	24,9 ±1,0 (6)	22,4 ±2,7 (8)	22,4 ±1,3 (6)	21,8 ±1,2 (8)	22,2 ±5,4 (6)	27,5 ±2,3 (8) 27,2 ±0,8 (5)
Expressió ^b :		1,38 (0,29)	1,21 (0,52)	0,60 (0,22)	0,68 (0,37)	1,39 (0,41) 1,02 (0,95)

5. DISCUSSIÓ

El nostre grup de recerca ha estat tradicionalment estudiant els factors genètics de risc trombòtic, concretament els dèficits hereditaris de les proteïnes anticoagulants i dependents de la vitamina K, proteïna C i proteïna S (PS). El fet que la proteïna GAS6 sigui estructuralment molt semblant a la PS i que el ratolí deficient en GAS6 (*gas6* *-/-*) estigués protegit contra la trombosi presentant una disminució de l'agregació i secreció plaquetars (Angelillo-Scherrer et al. 2001), suggeria que la GAS6 podia tenir una funció fisiològica en els mecanismes que determinen una trombosi com són l'hemostàsia i la inflamació. Per això, vam decidir començar a estudiar els aspectes genètics del gen que codifica aquesta proteïna.

L'aportació d'aquest treball s'ha centrat primer en l'anàlisi estructural del gen *GAS6* i després en l'estudi de variabilitat d'aquest gen per identificar possibles variants que puguin estar associades amb malalties humanes. En el moment d'iniciar la tesi només es coneixia la localització cromosòmica del gen que codifica per a la proteïna GAS6 (13q34) i la seva seqüència del mRNA, però no se'n coneixia l'estructura. En els següents anys, el Projecte Genoma Humà i l'empresa Celera Genomics van anar publicant simultàniament esbossos del genoma humà que han permès la caracterització de la seva estructura global i dels seus gens. No obstant, la regió on està situat el gen *GAS6*, molt propera al telòmer, presentava zones de seqüència sense identificar, ambigüitats i moltes repeticions (un 19% del gen) i va ser de les darreres seqüències en ésser incorporades a la base de dades pública. Cap a finals de 2003, Celera Genomics va publicar la seqüència hCG1811217 que descriurien com al gen *GAS6* però amb només 12 exons, mentre que nosaltres hem constatat que n'hi ha 15.

La cerca a partir del mRNA (NM_000820) ens va permetre obtenir diferents contigs que corresponien als fragments que cobrien la totalitat del gen. Els diferents exons de *GAS6* varen ser identificats *in silico* mitjançant el mètode d'alineament de seqüències BLAST i es van validar de forma experimental al laboratori (per seqüenciació directa dels fragments que contenien les seqüències identificades). Paral·lelament, també s'han incorporat els genomes d'altres espècies a les bases de dades públiques i utilitzant el mateix mètode, a partir de les respectives seqüències de mRNA, també es va obtenir l'estructura genètica del gen *gas6* de la rata i del ratolí.

El gen *GAS6* a l'espècie humana ocupa 43,5 Kb repartides en 15 exons (de diverses mides entre les 25 pb de l'exó 3 fins a les 445 pb de l'exó 15) i aquests estan separats per

14 introns. Aquesta és la mateixa estructura que la del gen *PROSI*, de 101 Kb a la regió pericèntrica del cromosoma 3 (Schmidel et al. 1990), el cDNA del qual té un 42% d'identitat de seqüència amb el de *GAS6*. Els gens *gas6* de rata i ratolí, amb 30,5 Kb i 29 Kb, també tenen la mateixa estructura que *GAS6* humana, els seus 15 exons són exactament de la mateixa mida i els cDNA dels 3 gens tenen una identitat de seqüència d'aproximadament el 80%, la qual cosa indica que aquests gens són autèntics ortòlegs (és a dir, gens que descendeixen d'un gen ancestral comú i tendeixen a tenir la mateixa funció en diferents espècies) i que *GAS6* és un gen paràleg a *PROSI* (és a dir, prové d'un gen ancestral comú que s'ha diversificat de forma independent i tenen funcions diferents en una mateixa espècie). Les principals diferències es troben en les mides dels introns que són més grans en els gens humans, sobretot a *PROSI*.

A les tres espècies analitzades els quatre gens de proteïnes dependents de la vitamina K, *F7*, *F10*, *PROZ* i *GAS6* es troben, en aquest mateix ordre, en un mateix cromosoma. A l'espècie humana les distàncies entre el *GAS6* i el gen més allunyat dels altres, el *F7*, són majors que a la rata i al ratolí (745 Kb en humana per 448 Kb en rata i 468 Kb en ratolí). El fet que l'estructura genètica de *GAS6* d'aquestes tres espècies fos molt semblant i que la identitat de seqüència fos elevada ens indicava una alta fiabilitat del resultat obtingut.

Pel que fa a l'estudi de la regió promotora del *GAS6*, i tenint en compte la semblança quant a l'estructura genètica amb *PROSI*, s'ha realitzat l'anàlisi *in silico* per observar si el *GAS6* té un promotor semblant al del gen de la PS que a la zona 5'UTR (del nucleòtid +13 al +120) té una zona potenciadora de la regulació de l'expressió i entre la regió -110 i -62 s'hi detecta una zona com a illa CpG, al voltant de l'exó 1, que presenta seqüències *consensus* per a la unió de factors de transcripció (Tatewaki et al. 2003). En el cas del *GAS6*, l'anàlisi de predicció *online* de les regions promotores suggereixen que no hi ha caixes TATA però sí que hi ha seqüències properes a l'exó 1 susceptibles de tenir funció promotora (zona rica en residus CpG). Pel que fa a aquestes illes CpG, l'anàlisi de predicció *online* de regions promotores, detecta que hi ha dues zones (localitzades entre 200 pb a 5' del gen i 1.200 pb a 3' de l'intró 1) CpG que són reconegudes com a illes CpG i que poden desenvolupar una important funció promotora a aquest gen. Atès que més del 50% dels promotors identificats en mamífers estan associats a les illes CpG (Robertson 2005) i que no hem trobat caixes TATA podem considerar que aquestes illes CpG poden tenir la funció reguladora del *GAS6*, la qual cosa, però, necessitaria confirmació experimental.

Un cop caracteritzada l'estructura genètica de *GAS6* es va procedir a la identificació de possibles variants a les seqüències funcionals (5' i 3' UTR, exons i seqüències intròniques flanquejants) mitjançant la tècnica dels SSCP que és un procediment molt més ràpid que la seqüenciació de tot el gen però del qual es pot escapar algun polimorfisme.

Es van caracteritzar 9 variants (c.280+170C>G, c.600+304-377del, c.712+26G>A, c.713-155T>C, c.834+7G>A, c.1263G>C, c.1322C>T, c.1478-94C>G i c.1869T>C) que es troben en unes freqüències entre el 6% a la variant c.1263G>C a l'exó 11 i el 48% a la variant c.713-155T>C a l'intró 7. Per tant, com que es troben en un percentatge superior al 1% a la població control, es poden considerar com a polimorfismes o SNP. D'aquests polimorfismes, 6 són intrònics (c.280+170C>G, c.600+304-377del, c.712+26G>A, c.713-155T>C, c.834+7G>A i c.1478-94C>G) i 3 (c.1263G>C, c.1322C>T, i c.1869T>C) es troben en seqüència codificant tot i que no modifiquen l'aminoàcid codificat. En cap cas l'anàlisi *in silico* de les seqüències polimòrfiques com a possibles seqüències de *splicing* no revelà cap diferència respecte les variants més comunes. Els polimorfismes estudiats mostren unes freqüències al·lèliques en els individus de les poblacions control analitzades (de Sevilla i de Barcelona) molt similars.

La genotipació dels diferents polimorfismes de *GAS6* a la població de pacients amb malaltia aterotrombòtica ens va permetre determinar que la freqüència de l'al·lel A del polimorfisme de l'intró 8 (c.834+7G>A) és inferior en la població de pacients que al grup control, i aquesta diferència és estadísticament significativa en el subgrups de pacients amb malaltia cerebrovascular (ictus no hemorràgics). Aquest fet suggeria un paper protector d'aquesta variant a patir la malaltia cerebrovascular i d'origen aterotrombòtic. La resta dels SNP genotipats presentaven unes freqüències similars en els dos grups estudiats i, per tant, no semblava que tinguessin un efecte clar sobre aquesta malaltia.

Així, vam intentar confirmar aquests resultats en un altre grup de pacients amb malaltia cerebrovascular, més ampli i molt ben definits. Aquest següent estudi va confirmar una freqüència menor de l'al·lel A del polimorfisme c.834+7G>A en la població de pacients amb malaltia cerebrovascular respecte la població control. Atesa la possible implicació de *GAS6* en processos aterotrombòtics (Lutgens et al. 2000) hem realitzat aquesta anàlisi en el conjunt de pacients amb malaltia cerebrovascular d'origen aterotrombòtic (s'exclouen, per tant, els subtipus d'ictus isquèmic de causes cardioembòlica, desconegudes o d'altres causes) i en el grup de pacients amb malaltia

d'origen aterotrombòtic que tenen els vasos petits afectats (microateromatosis, subtipus d'ictus isquèmic llacunar i ictus hemorràgic profund). En aquests dues agrupacions segons l'aspecte fisiopatològic de d'ictus (Tanaka et al. 1999, Fazekas et al. 1999), s'observava una diferència estadísticament significativa a l'anàlisi univariant amb un model d'herència codominant o recessiu, i fins i tot, en l'anàlisi multivariant (tenint en compte els factors de risc coneguts) utilitzant el model codominant, fet que apunta que la presència del genotip AA podria ser un factor protector independent d'altres factors de risc (**APÈNDIX 4**). La resta dels SNP de *GAS6* no mostraren cap associació amb la malaltia en aquesta població.

L'associació al·lèlica que hem trobat entre aquest polimorfisme i la malaltia cerebrovascular pot ser produïda per un efecte biològic directe del mateix al·lel (o polimorfisme) sobre el fenotip, o bé a causa de la presència d'un *locus* proper que causa la predisposició a tenir aquest mateix fenotip, el qual es troba en desequilibri de lligament (LD) amb el SNP analitzat. D'una banda, l'anàlisi *in silico* no indicava que el polimorfisme c.834+7G>A pogués afectar al *splicing* de l'intró 8. A més, no hi havia diferències qualitatives en els fragments amplificats de mRNA entre les mostres que tenien els diferents genotips per aquest polimorfisme. D'altra banda, l'anàlisi per RT-PCR a temps real del mRNA de *GAS6* d'artèria coronària d'individus amb diferents genotips per aquest polimorfisme no mostrà diferències significatives entre genotips. Hi ha diferents programes matemàtics disponibles per a calcular la mitjana normalitzada de l'expressió gènica, entre ells el REST® que ja era utilitzat al nostre laboratori. Hem utilitzat diferents gens de referència (*GAPDH*, *ciclofilina A* i *B2M*) que a priori tenen una expressió estable en diferents teixits. El fet d'utilitzar-ne més d'un ens permet observar algun possible biaix en l'anàlisi i fer més acurat l'experiment (Wong et al. 2005). Aquests estudis ens indiquen que no hi ha diferències d'expressió del mRNA de *GAS6* entre mostres d'individus que tenen diferents genotips pel polimorfisme c.834+7G>A i, per tant, el possible efecte de *GAS6* no sembla degut a un efecte d'aquest polimorfisme en l'expressió del gen.

En el cas de l'anàlisi d'expressió de *GAS6* en les mostres amb placa d'ateroma i sense, s'hi observa un lleuger augment en les mostres d'artèria coronària amb placa d'ateroma respecte les mostres que no en tenen, però en cap cas aquest augment és significatiu, el que no coincideix amb el descrit en estudis en placa ateroscleròtica

(Lutgens et al. 2000). Una possible explicació podria ser que el baix nombre de mostres analitzades en el nostre estudi no permet obtenir les mateixes conclusions.

Vam analitzar la presència a les nostres mostres de la variant proteica descrita, la *GAS6SV* (Goruppi et al. 1997), una proteïna amb 43 aminoàcids extra (que esdevé una proteïna de 721 aminoàcids) que pot ser proteolíticament tallada per la zona inserida donant dos pèptids de 36 i de 50 kDa. Segons els autors, és present predominantment a la melsa, mentre que en altres teixits el seu patró d'expressió no és gaire elevat (placenta, còlon, fetge, cervell i ronyó). Aquesta variant és el resultat de la incorporació de 129 pb entre l'intró 8 i l'exó 9 i està altament conservada en alguns mamífers (humà, ximpanzé i macaco). No obstant, a les mostres d'artèries coronàries que hem analitzat nosaltres no hem observat la presència d'aquesta isoforma al mRNA. Per tant, possiblement aquesta isoforma té una regulació de l'expressió específica de teixit. Fóra interessant també realitzar l'anàlisi d'expressió de *GAS6* a les artèries caròtides atès que sí estan clarament implicades en els processos d'ictus, però quan vam realitzar aquest treball no disposàvem del material necessari.

L'estudi d'associació del polimorfisme de l'intró 8 en una població de pacients joves (menors de 50 anys) amb ictus isquèmic, mostra que la freqüència de l'al·lel A del c.834+7G>A a la població control és més baixa que a la població de pacients amb ictus isquèmic. Aquesta diferència podria indicar un possible efecte de l'edat en aquesta associació, és a dir, que les persones que arriben a una certa edat (>70 anys) lliures de la malaltia tenen més probabilitat de ser portadores de l'al·lel A, i, per tant, aquest al·lel indicaria una protecció a patir la malaltia. En aquesta mateixa població, la freqüència de l'al·lel A (0,48) en els individus que havien estat diagnosticats com a pacients que havien sofert un accident isquèmic transitori (AIT), és a dir, que havien tingut una ràpida resolució de l'isquèmia, era molt més elevada que en els individus control. Tot i que el nombre de mostres no era gaire elevat (50 pacients amb AIT), aquest resultat suggereix que el polimorfisme podria estar afectant a la resolució de l'ictus; així ser portador de l'al·lel A tindria un efecte protector i evitaria el progrés de l'ictus.

La presència dels gens *F7*, *F10* i *PROZ*, a la mateixa regió cromosòmica que el *GAS6* (13q34) i que els dèficits de les proteïnes codificades per aquests presentessin problemes en la coagulació i en l'hemostàsia en general, va fer que iniciéssim l'anàlisi d'algun polimorfisme d'aquests gens per detectar una possible associació al·lèlica entre aquests i els SNP identificats de *GAS6*, per descartar que l'associació observada de la malaltia amb

el polimorfisme de *GAS6* era en realitat l'efecte de l'associació d'un altre polimorfisme en un altre gen en desequilibri de lligament amb el de *GAS6*. El polimorfisme escollit a *PROZ* va ser el IVS6+79G>A, l'al·lel A del qual havia estat associat a nivells baixos de proteïna Z en sang (Santacroce et al. 2004; Staton et al. 2005) i a un efecte protector per a la isquèmia cerebral (Lichy et al. 2004).

D'una banda, semblava interessant estudiar aquest polimorfisme de *PROZ* i, d'una altra, analitzar el marcador D13S285 que està lligat als gens *F7* i *F10* per veure si estaven emmascarant les dades obtingudes, però els resultats van indicar que no es troben en LD amb cap dels polimorfismes del *GAS6*, és a dir, que l'efecte que es troba en els SNP de *GAS6* no està determinat pels polimorfismes analitzats en aquests altres *loci*. L'anàlisi del marcador D13S285 no presenta diferències en freqüència entre la població de malaltia cerebrovascular i el grup control. Al polimorfisme de *PROZ*, en canvi, sí que s'hi observa una freqüència de l'al·lel A inferior en pacients amb ictus hemorràgics (IH) respecte els individus control. La freqüència que trobem en individus control és similar a la que troben en població control altres estudis (Lichy et al. 2004; Santacroce et al. 2004; Staton et al. 2005); l'estudi que hem realitzat, no obstant, és el primer que analitza l'efecte d'aquest polimorfisme a *PROZ* en l'ictus hemorràgic i ens ha permès detectar que hi ha una associació amb la tendència a sagnar la qual, no obstant, no és independent de la resta de factors de risc per ictus hemorràgic (Obach et al. 2006). Això es podria explicar per un efecte combinat de l'al·lel A amb altres factors de risc per l'IH, tal i com havia estat descrita anteriorment pel que fa a l'associació entre nivells baixos de PZ i el tromboembolisme venós (Martinelli et al. 2005). Altres estudis han confirmat l'associació de l'al·lel A amb els nivells baixos de PZ (Lichy et al. 2004; Santacroce et al. 2004; Staton et al. 2005). Aquests resultats suggereixen que el fet de tenir els nivells baixos de PZ podria evitar les hemorràgies cerebrals en disminuir la capacitat anticoagulant de la PZ (Kemkes-Matthes et al. 2002).

Atès que la proteïna *GAS6* es mostrava com un factor implicat en el desenvolupament de l'aterosclerosi i de la isquèmia, vam realitzar l'anàlisi del polimorfisme de l'intró 8 en una població amb pacients joves (>50 anys) que havien patit un infart de miocardi ja que el seu origen isquèmic podria indicar que la *GAS6* hi tingués algun efecte. No obstant, no s'observà una diferència significativa en els pacients respecte als individus control, els quals també eren majoritàriament joves (43 anys de mitjana), motiu pel qual ens fa descartar l'efecte d'aquest polimorfisme en aquesta

malaltia. Aquests resultats són similars als obtinguts a l'anàlisi inicial de la població amb malaltia ateroscleròtica de Sevilla amb el subtipus de pacients amb infart agut de miocardi. A diferència d'aquest grup, però, l'anàlisi de les freqüències del polimorfisme de l'intró 8 respecte la població d'individus control, mostraven que els pacients presentaven la freqüència del polimorfisme més elevada que en controls als quals es trobà una freqüència de l'al·lel A similar a la dels controls joves de la població amb infart de miocardi i amb nefropatia diabètica.

Els resultats en les diferents malalties estudiades ens indiquen, doncs, que hi ha associació del polimorfisme de l'intró 8 de *GAS6* amb la malaltia cerebrovascular aterotrombòtica en pacients majors de 60 anys, però en la resta de patologies no s'ha confirmat aquesta associació.

Atès que havíem genotipat els diferents SNP identificats per nosaltres a *GAS6* vam procedir a realitzar l'estudi de desequilibri de lligament (LD) entre aquests i s'hi observà que hi havia alguns polimorfismes en un alt LD entre ells (a la regió 5' i alguns a la zona 3' del gen) i altres que no en mostraven. Aquestes dades són similars a les que es troben en el HapMap (amb diferents SNP dels que hem analitzat nosaltres) quan es realitza l'anàlisi LD *pair-wise* (entre 2 SNP) amb la mostra CEPH (d'avantpassats europeus).

Per realitzar la identificació dels possibles haplotips dels SNP al *GAS6* vam optar per estimar-ne la freqüència mitjançant una inferència estadística a partir de les dades dels genotips ja que, com que no es disposava de familiars, no era possible obtenir directament els haplotips. El programa que hem utilitzat per identificar els diferents haplotips presents a la població és el THESIAS (Tregouet et al. 2004). Aquest programa permet inferir els haplotips de diferents poblacions (pacients i controls) i comparar-les entre elles amb la possibilitat d'ajustar per covariables i també permet conèixer l'efecte sobre el risc de cadascun dels polimorfismes en diferents fons genètics.

De tots els possibles haplotips entre els 8 SNP de *GAS6* només 7 han estat identificats amb el programa THESIAS amb una freqüència superior al 2% i d'aquests els 6 més freqüents tenen la mateixa combinació pels darrers 4 SNP (dels exons 11, 12, intró 12 i exó 14) atès que hi ha LD entre aquests SNP i que la freqüència d'algun d'ells és molt baixa. Així a l'anàlisi dels 8 SNP s'ha identificat un determinat haplotip (**CACAGCCT**) que està associat amb la malaltia cerebrovascular (població de l'Hospital Clínic) (OR (95% IC): 0,56 (0,34-0,93)). L'anàlisi d'haplotips dels 4 SNP a l'extrem 5' del gen (dels

introns 3, 7 i 8) permet tenir més mostres amb els diferents haplotips necessaris per a fer l'anàlisi per regressió logística ajustada. Aquesta anàlisi confirma l'haplotip CACA, que conté l'al·lel A del polimorfisme c.834+7G>A, com a factor protector per la malaltia amb una significació estadística superior a l'anàlisi individual del polimorfisme, oferint una OR (95% IC) de 0,55 (0,34-0,90) en malaltia cerebrovascular i més concretament en ictus isquèmic (0,48 (0,28-0,83)). Quan es realitza l'anàlisi amb l'agrupació dels pacients que han sofert un ictus d'origen ateroescleròtic, és a dir, els subtipus d'ictus isquèmic aterotrombòtic, llacunar i ictus hemorràgic profund, la freqüència de l'haplotip CACA és significativament inferior que a la població control. Quan s'agrupa segons l'origen ateroescleròtic de l'ictus (ictus isquèmic ateroescleròtic, llacunar i ictus hemorràgic profund) i la mida petita dels vasos (ictus isquèmic llacunar i l'ictus hemorràgic profund) s'observa l'associació amb la malaltia encara molt més forta, el que suggereix que l'efecte d'aquest haplotip és més evident en els vasos petits que en els grans vasos.

L'anàlisi dels haplotips en la població amb malaltia ateroescleròtica de Sevilla ens indica que l'haplotip CACA també està menys representat en pacients que en controls, sobretot en pacients amb malaltia cerebrovascular, però la diferència no és significativa probablement pel baix nombre de mostres analitzat.

Aquests resultats suggereixen que algun polimorfisme en LD amb el de l'intró 8 i, més concretament, amb l'haplotip CACA pot ser el responsable de l'efecte observat a les poblacions analitzades. Malgrat que nosaltres no hem trobat cap polimorfisme a la regió immediatament a 5' del gen *GAS6*, no podem descartar l'existència d'un polimorfisme a la zona no analitzada del promotor essencial o d'alguna regió reguladora (*enhancer* (potenciador) o silenciador) una mica més allunyada de l'inici del gen, el qual podria variar els nivells d'expressió del mRNA de *GAS6*.

L'anàlisi que hem realitzat de la regió de mitja Kb abans de l'inici de l'exó 1 no ha permès trobar a la nostra població cap variant situada a la regió susceptible de ser promotora essencial, la regió més propera a l'inici de l'exó 1 i 2. Així, potser altres polimorfismes més allunyats d'aquesta zona però en altres regions de control de l'expressió (com poden ser reguladores (*enhancers* (potenciadors de l'expressió) o silenciadors (repressors de l'expressió)) poden tenir importància en la regulació dels nivells d'expressió de la proteïna GAS6. El projecte HapMap ha descrit i genotipat el polimorfisme rs8181793 (situat a 1,5 Kb a 5' de l'inici del gen *GAS6*, fora de les illes CpG) que a la població CEPH l'al·lel menys freqüent (T) té una freqüència inferior al

5%. Aquest polimorfisme no ha pogut ésser analitzat en aquest treball, atesa la seva recent incorporació a les bases públiques.

Pel que fa a les bases de dades de polimorfismes, d'una banda, els SNP identificats al *GAS6* darrerament pel projecte HapMap són en seqüència intrònica molt lluny dels llocs acceptors i donadors de *splicing*, que possiblement no són funcionals, o són els mateixos identificats per nosaltres en la seqüència codificant. D'altra banda, hi ha molts polimorfismes que estan introduïts a la base de dades dbSNP (tant en seqüència codificant com en seqüència intrònica) que no han estat comprovats i validats posteriorment per algun altre estudi i, per tant, no són fiables. Així, les bases de dades públiques (dbSNP) són una font útil sobre els polimorfismes en gens candidats però cal confirmar la informació que s'ofereix i demostrar que no són falsos positius (Janosikova et al. 2005). Per exemple, dels polimorfismes descrits per dbSNP a la regió 5' del gen *GAS6* no els hem detectat a la nostra població ni tampoc el polimorfisme rs7992146 a l'exó 13, que descrivia un canvi d'aminoàcid d'Arg a Gly.

La forta associació que es troba entre els grups on l'ictus té un important component aterotrombòtic (subgrups amb ictus ateroscleròtic, llacunar i hemorràgic profund) i encara més especialment en el subtipus d'ictus que afecten la microvasculatura (ictus llacunars i hemorràgics profunds) suggereix que la *GAS6* pot estar implicada en mecanismes causants de l'ictus ateroscleròtic, com la formació de la placa d'ateroma o l'activació de cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises i que aquesta implicació pot ser més evident a la microvasculatura on la *ratio* superfície endotelial / llum és superior que als grans vasos.

La formació de la placa d'ateroma té diferents fases i en moltes d'elles la proteïna *GAS6* o la seva via de senyalització mitjançant els receptors TAM hi poden intervenir. Un dels primers episodis on la *GAS6* té importància és a les cèl·lules endotelials activades que tenen una expressió de *GAS6* i dels seus receptors i una capacitat antiapoptòtica augmentades respecte les cèl·lules no activades (Melaragno et al. 1998) (Hasanbasic et al. 2004). Aquestes cèl·lules endotelials a través de la producció de quimioquines i citoquines i de l'activació de factors de transcripció com el NFκB (Berk et al. 2001) participen en el reclutament i migració de leucòcits i cèl·lules musculars llises cap a la zona danyada (Fridell et al. 1998). Aquesta lesió si no és degudament corregida produeix una resposta inflammatòria continuada que estimula la migració i proliferació de les cèl·lules musculars llises, acumula limfòcits i macròfags, fet que permet la formació

d'un teixit fibrós, amb cor lipídic i necròtic (Ross 1999). La GAS6 afavoreix que les cèl·lules fagocítiques (macròfags) que expressen AXL puguin reconèixer les cèl·lules que exposen fosfatidilserina a la membrana i inicien l'eliminació de la zona d'aquestes cèl·lules apoptòtiques (Fadok et al. 2000; Ishimoto et al. 2000; Scott et al. 2001). Si aquest sistema amb la GAS6 no està correctament equilibrat es poden acumular les cèl·lules apoptòtiques i pot afectar el desenvolupament de la placa d'ateroma.

Recentment, s'ha observat que la interacció GAS6 amb els seus receptors inhibeix la diferenciació osteogènica dels perícits a la microvasculatura, segurament a través la seva capacitat antiapoptòtica, un procés que podria provocar la calcificació i la fragilitat dels vasos (Collett et al. 2003; Son et al. 2006), important en la tendència a patir hemorràgies.

Un cop desenvolupada la placa d'ateroma, si l'artèria no pot compensar la dilatació produïda per l'engruiximent, aquesta dilatació pot, o bé, introduir l'artèria a la llum del vas i alterar el flux sanguini, o bé, provocar el trencament de la placa i els factors procoagulants són exposats a la sang circulant i generen l'inici dels mecanismes de coagulació. Llavors, les cèl·lules endotelials lesionades i les cèl·lules apoptòtiques esdevenen proadhesives i procoagulants activant les plaquetes i així, es pot contribuir a la progressió i complicació trombòtica de l'aterosclerosi (Bombeli et al. 1997).

Una de les funcions més importants de la proteïna GAS6 és ser un potent amplificador de la resposta d'activació plaquetar, amb efectes sobre l'estabilització del trombe (Angelillo-Scherrer et al. 2005; Saller et al. 2006) i sobre l'agregació (Angelillo-Scherrer et al. 2001) i la secreció plaquetars (Gould et al. 2005). Segons el model recentment descrit per Prevost (Prevost et al. 2003) sobre el mecanisme de l'agregació plaquetar, la unió del fibrinogen al seu receptor (molècules d'integrina) genera una cadena d'activació plaquetar que està regulada posteriorment per la via GAS6/AXL i via AKT /PI3K (Chen et al. 2004), que permet que les plaquetes s'uneixin entre elles més fortament i que s'alliberi el contingut dels grànuls de secreció correctament.

No obstant, malgrat que en el model murí s'ha demostrat l'expressió de la proteïna GAS6 a plaquetes (Angelillo-Scherrer et al. 2001; Ishimoto et al. 2000), en humans, la presència no és clara (Balogh et al. 2005); així, sembla que la funció de GAS6 en humans seria donada, o bé, en el desenvolupament de la placa ateroscleròtica, o bé, en la capacitat d'agregant plaquetar per la unió de la GAS6 alliberada de l'endoteli sobre els seus receptors plaquetars.

Un altre mecanisme per explicar l'associació entre GAS6 i ictus aterotrombòtic és el paper important d'aquesta proteïna en la funció inflamatòria en diferents malalties en humans, com la patologia ateroscleròtica, les malalties autoimmunes i algunes malalties neurodegeneratives (Nathan 2002). En el cas d'una immunoactivitat augmentada produïda a l'artritis reumatoide (O'Donnell et al. 1999) s'ha demostrat que la GAS6 és capaç d'estimular la reabsorció osteoclàstica de l'os, el que contribueix a la destrucció de l'articulació (Katagiri et al. 2001).

La proteïna GAS6 té una expressió augmentada en tumors (Sun et al. 2003; Wimmel et al. 2001; Wu et al. 2002) indicant que la seva capacitat mitogènica i antiapoptòtica actua afavorint el creixement d'aquestes cèl·lules transformades. En altres malalties on el creixement i proliferació cel·lulars desmesurat causa la patologia, com a la nefritis nefrotòxica (Yanagita et al. 2002) i la hipertròfia glomerular a la nefropatia diabètica relacionada amb l'acció de Gas6 a través de la via AKT/mTOR (Nagai et al. 2003; Nagai et al. 2005), també s'ha descrit una sobreexpressió de Gas6 i dels seus receptors. Per això, vam realitzar l'estudi cas-control amb individus que havien patit nefropatia diabètica (casos) respecte als individus diabètics sense nefropatia (controls) però no va observar-se cap diferència significativa.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el fet que la proteïna GAS6 participi en molts mecanismes que són importants en la inflamació, la trombosi i les malalties aterotrombòtiques en general, l'artritis reumatoide, la nefropatia diabètica, la nefritis nefrotòxica i el càncer, entre d'altres (O'Donnell et al. 1999; Nagai et al. 2005; Sun et al. 2003; Yanagita et al. 2002), fa de *GAS6* un gen candidat a tenir un paper en aquestes malalties, funció que pot ser analitzada mitjançant els estudis d'associació al·lèlica. No obstant, i dins del marc de les malalties complexes, el gen *GAS6* pot representar només un modest efecte en el fenotip observat. La combinació d'aquests efectes modestos en diferents gens candidats juntament amb la interacció amb els factors ambientals pot definir la susceptibilitat a patir una malaltia comuna. Aquesta debilitat de l'efecte biològic dels polimorfismes en aquests tipus de malalties i les interaccions gen/gen o gen/ambient dificulten el seu estudi. Tanmateix, l'anàlisi d'aquestes malalties es realitza essencialment mitjançant estudis d'associació on les freqüències al·lèliques i de genotips de les variants identificades són determinades en individus afectes i són comparades amb els controls. Aquesta anàlisi és una interessant aproximació per detectar els efectes de variants comunes amb efectes dèbils (Newton-Cheh et al. 2005) però necessiten incloure

un gran nombre de mostres per detectar el petit efecte d'alguns polimorfismes (Hirschhorn et al. 2005).

Aquests estudis d'associació, actualment, es poden realitzar a gran escala gràcies a la millora tecnològica en la genotipació, tot que l'anàlisi i la interpretació dels resultats encara és complicada. La posada al punt dels models matemàtics que permetin analitzar tot aquesta gran quantitat d'informació (interaccions entre gens, entre polimorfismes o entre els polimorfismes i els factors ambientals i en diferents models d'herència) permetrà tenir unes dades més consistents que amb l'anàlisi individual de cada polimorfisme (Marchini et al. 2005) que moltes vegades no dona resultats reproduïbles perquè hi ha falsos resultats positius o negatius atès que l'efecte dèbil que produeix una variant determinada roman emmascarada per la interacció amb altres gens o amb factors ambientals (Zondervan et al 2004).

Una aproximació alternativa i que cada cop agafa més força en l'estudi de les malalties complexes és estudiar les variacions més importants d'una regió d'un gen d'interès mitjançant l'ús de la selecció de marcadors que estan en desequilibri de lligament. Malgrat que en el nostre estudi no ha estat possible determinar a *GAS6* diferents blocs de polimorfismes que es troben en un fort desequilibri de lligament, l'existència dels mateixos pot ser de gran utilitat per l'estudi de malalties complexes ja que la selecció de només alguns polimorfismes marcadors (tagSNP) permet capturar les variants més freqüents i alleugereix la càrrega de la genotipació de molts SNP poc informatius, sobretot en el cas de voler fer un escombrat per tot el genoma per detectar polimorfismes o haplotips associats amb un fenotip concret.

El projecte HapMap permet seleccionar aquests tagSNP que se suposa que defineixen la variabilitat de la zona analitzada, encara que té algunes limitacions atès que la població CEPH analitzada no és gaire gran (menys de 100 individus) i el desequilibri de lligament (r^2) de les variants rares té una alta variació (Barret et al. 2006). Un cop s'han genotipat els polimorfismes més interessants (funcionals, tagSNP, entre d'altres), l'anàlisi d'associació entre els diferents haplotips definits per aquests polimorfismes i la malaltia permet guanyar poder estadístic respecte els estudis individuals ja que es podria mesurar l'efecte de variants desconegudes que es troben en un mateix bloc de desequilibri de lligament, o es podria observar l'efecte combinat de diferents variants en un mateix haplotip. No obstant, en aquestes anàlisis es necessita fer una inferència estadística per determinar els haplotips d'una població donat que no en coneixem la fase a cadascun dels

polimorfismes en els individus que la formen (Clark et al. 2004). D'altra banda, mentre no es tinguin més dades sobre la utilitat de la informació recollida al projecte HapMap en l'estudi de les malalties complexes, caldria confirmar experimentalment en la població d'estudi que les dades del HapMap hi són aplicables i també seria interessant de veure de quina manera s'inclouen els polimorfismes d'interès per la funció del gen i proteïna en estudi, en els haplotips i blocs de LD definits per HapMap, ja que molts d'aquests polimorfismes no estan inclosos a l'estudi HapMap. No obstant, un estudi recent en població espanyola (Ribas et al. 2005) indica que els blocs de LD i els tagSNP descrits en el projecte HapMap (població CEPH) per una sèrie de gens de susceptibilitat al càncer són essencialment els mateixos que els de la població analitzada, el que permet als autors concloure que els resultats observats a HapMap serien majoritàriament aplicables a les poblacions d'estudi. Pel que fa a la nostra experiència en l'ús d'aquesta base de dades, recomanaríem validar les dades a la nostra població, realitzant l'anàlisi i els estudis de LD dels polimorfismes, especialment els que puguin tenir un interès funcional, en un subgrup de mostres, per tal d'observar que es segueix un patró similar al descrit per HapMap i si és així, escollir els SNP d'interès i els tagSNP necessaris per a realitzar l'estudi. El projecte HapMap, actualment, només ofereix la possibilitat de detectar tres tagSNP (rs7997328, rs6602908 i rs9604573) que permetrien cobrir tots els possibles haplotips presents en una regió concreta (situada entre els introns 2 i 5) del gen *GAS6* en la població CEPH, d'avantpassats europeus, però deixarien molta zona del gen sense ser analitzada.

Malgrat aquests avenços tècnics en l'aportació d'informació respecte als polimorfismes en malalties complexes, l'emascament dels factors genètics a les malalties complexes és una càrrega que només és salvable quan es realitza una bona classificació dels fenotips analitzats i es realitzen estudis epidemiològics amb un gran nombre de mostres d'una població molt ben definida y caracteritzada. Si l'efecte del polimorfisme és especialment dèbil, l'agrupació de diferents poblacions en una mateixa anàlisi (metaanàlisi) podria oferir una major potència estadística a l'anàlisi (Ioannidis JP et al. 2003). Però aquí també cal tenir en compte les diferències existents en les poblacions analitzades.

Finalment i com a resum, en aquest treball els estudis d'associació dels polimorfismes estudiats del gen *GAS6* en pacients amb malaltia cerebrovascular mostren l'associació entre el polimorfisme de l'intró 8, i més concretament d'un haplotip determinat (CACA),

amb aquesta malaltia. El fet de no conèixer quin és l'efecte d'aquest polimorfisme o haplotip sobre l'expressió del gen o de la proteïna, però, fa difícil entendre quin resultat té sobre la malaltia. No obstant, l'associació observada amb la malaltia, juntament amb els resultats dels estudis en models animals i cel·lulars que indiquen una implicació de la proteïna GAS6 en el desenvolupament i la progressió de la placa ateroscleròtica, fa que aquesta proteïna pugui tenir un paper fisiopatològic important en la proliferació cel·lular.

Actualment, es coneixen fàrmacs inhibidors de les proteïnes procoagulants dependents de la vitamina K a través de la inhibició de la γ -carboxilació dels residus d'àcid glutàmic, però és una teràpia antitrombòtica inespecífica, que també afecta a proteïnes anticoagulants dependents de la vitamina K i té nombrosos efectes secundaris. La possibilitat de desenvolupar inhibidors d'alta afinitat específics per aquest sistema GAS6-receptors TAM podria permetre el tractament de pacients amb aquestes malalties on GAS6 és un factor de risc, amb una disminució dels efectes secundaris actuals.

6. CONCLUSIONS

Conclusions:

- El gen *GAS6* humà conté 15 exons i 14 introns que ocupen 43,5 Kb de DNA genòmic a la regió 13q34.
- L'alt grau de conservació en l'estructura d'exons i introns i en la seqüència primària indica que el gen humà *GAS6* i els gens *gas6* de rata i ratolí són autèntics ortòlegs i paràlegs de gen *PROS1*.
- S'ha identificat un total de 9 polimorfismes al *GAS6*, 6 d'aquests en seqüències intròniques i 3 en seqüències codificants però que no modifiquen l'aminoàcid codificat.
- L'al·lel A del polimorfisme de l'intró 8 c.834+7G>A és un factor protector per la malaltia cerebrovascular, més concretament a l'ictus isquèmic d'origen ateroscleròtic i el que afecta a la microvasculatura.
- L'haplotip **CACA**, corresponent als polimorfismes c.280+170C>G, c.712+26G>A, c.713-155T>C, c.834+7G>A de *GAS6*, és comporta com un factor protector que disminueix en més de dues vegades el risc a patir un accident cerebrovascular d'origen ateroscleròtic o el que afecta a la microvasculatura.
- No s'ha observat associació entre els polimorfismes de *GAS6* i l'infart agut de miocardi, la nefropatia diabètica i les complicacions hemorràgiques associades als tractaments amb anticoagulants orals.
- L'absència de desequilibri de lligament entre els polimorfismes de *GAS6* i els polimorfismes (c.573+76G>A) de *PROZ* i D13S285 als gens *F7* i *F10* exclou aquests darrers gens com a responsables de l'associació observada.
- El polimorfisme del gen *PROZ* c.573+76G>A està associat a l'ictus hemorràgic a la nostra població.
- No s'observen diferències significatives en l'expressió del mRNA de *GAS6* segons el genotip pel polimorfisme c.834+7G>A, ni tampoc segons la presència o no de placa ateroscleròtica a l'artèria coronària.

7. BIBLIOGRAFIA

La major part d'informació (bibliografia) que hem utilitzat per realitzar aquesta tesi ha estat extreta de la base de dades pública Entrez de la National Library of Medicine (NLM) i de les revistes subscrietes per la nostra institució.



- ABI.Prism (2001) Relative quantification of gene expression. 7700 Sequence Detection System User Bulletin 2
- Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 24: 35-41
- Alberts MJ (2004) Genetics of cerebrovascular disease. Stroke 35: 342-4
- Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E (2003) Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. Nat Immunol 4: 87-91
- Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, Demol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Vesin C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P (2005) Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. J Clin Invest 115 (20):237-46.
- Angelillo-Scherrer A, García de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P (2001) Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. Nat Med 7: 215-21.
- Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C (1998) GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. Blood 91: 2334-40.
- Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B (2005) Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1280-6
- Barret JC, Cardon LR. (2006)Evaluating coverage of genome-wide association studies.Nat Genet. 38(6):659-62.
- Bauer KA, Rosenberg RD (1991) Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. Semin Hematol 28: 10-8
- Beguin S, Kumar R, Keularts I, Seligsohn U, Coller BS, Hemker HC (1999) Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. Blood 93: 564-70
- Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilio C (1997) Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. Oncogene 15: 2387-97.
- Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C (2001) Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. Ann N Y Acad Sci 947: 93-109; discussion 109-11
- Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM (1997) Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 89: 2429-42
- Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Jr., Mensah GA, Lenfant C (2002) World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. Circulation 106: 1602-5
- Bouchard BA, Furie B, Furie BC (1999) Glutamyl substrate-induced exposure of a free cysteine residue in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase is critical for vitamin K epoxidation. Biochemistry 38: 9517-23
- Broze GJ, Jr. (2001) Protein-Z and thrombosis. Lancet 357: 900-1.
- Cambien F, Tiret L (2005) Atherosclerosis: from genetic polymorphisms to system genetics. Cardiovasc Toxicol 5: 143-52

- Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK (1999) A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF- α production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol* 162: 3498-503
- Castori L, Taliani MR, Agnelli G, Boschetti E, Gresele P (2005) Interactions between thrombophilic genetic mutations and clinical bleeding in patients on chronic oral anticoagulant treatment. *Haematologica* 90: 1720-2
- Dept. Sanitat Generalitat Catalunya (2005) Incidència de l'ictus a Catalunya. Nota de Premsa del Departament de Sanitat de la Generalitat de Catalunya. 18/11/2005.
- Catto AJ (2001) Genetic aspects of the hemostatic system in cerebrovascular disease. *Neurology* 57: S24-30.
- Chamorro A, Revilla M, Obach V, Vargas M, Planas AM (2005) The -174G/C polymorphism of the interleukin 6 gene is a hallmark of lacunar stroke and not other ischemic stroke phenotypes. *Cerebrovasc Dis* 19: 91-5
- Chen C, Li Q, Darrow AL, Wang Y, Derian CK, Yang J, De Garavilla L, Andrade-Gordon P, Damiano BP (2004a) Mer Receptor Tyrosine Kinase Signaling Participates in Platelet Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (6): 1118-23.
- Chen J, De S, Damron DS, Chen WS, Hay N, Byzova TV (2004b) Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood* 104: 1703-10
- Chen J, Fang Y (2002) A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem Pharmacol* 64: 1071-7
- Choudhury RP, Fuster V, Fayad ZA (2004) Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nat Rev Drug Discov* 3: 913-25
- Clark AG. (2004) The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol* 27(4):321-33.
- Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA (2002) Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* 196: 135-40
- Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, Ohanian J, Fridell YW, Canfield AE (2003) Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 92: 1123-9
- Coto E, Reguero JR, Alvarez V, Morales B, Batalla A, Gonzalez P, Martin M, Garcia-Castro M, Iglesias-Cubero G, Cortina A (2003) 5-Hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptor and 5-hydroxytryptamine transporter polymorphisms in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 104: 241-5
- Crosier KE, Crosier PS (1997) New insights into the control of cell growth; the role of the Axl family. *Pathology* 29: 131-5.
- Dahlback B (2000) Blood coagulation. *Lancet* 355: 1627-32
- Dahlback B, Villoutreix BO (2005) The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 579: 3310-6
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30: 10363-70
- Devlin B, Risch N (1995) A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 29: 311-22
- Drouet L (2002) Atherothrombosis as a systemic disease. *Cerebrovasc Dis* 13 Suppl 1: 1-6
- Emanuelli C, Salis MB, Van Linthout S, Meloni M, Desortes E, Silvestre JS, Clergue M, Figueroa CD, Gadau S, Condorelli G, Madeddu P (2004) Akt/protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer. *Circulation* 110: 1638-44
- Endler G, Mannhalter C (2003) Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta* 330: 31-55

- Departamento de Salud Pública de la Comisión Europea (2005) Incidencia de la cardiopatía isquémica en Europa. Fichas informativas sobre enfermedades y afecciones. Enfermedades cardiovasculares (http://ec.europa.eu/health/ph_information/dissemination/diseases/cardiovascular_es.htm)
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85-90
- Fair DS, Marlar RA, Levin EG (1986) Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* 67: 1168-71
- Fazekas F, Kleinert R, Roob G, Kleinert G, Kapeller P, Schmidt R, Hartung HP. Histopathologic analysis of foci of signal loss on gradient-echo T2*-weighted MR images in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: evidence of microangiopathy-related microbleeds. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999 Apr;20(4):637-42.
- Fisher PW, Brigham-Burke M, Wu SJ, Luo J, Carton J, Staquet K, Gao W, Jackson S, Bethea D, Chen C, Hu B, Giles-Komar J, Yang J (2005) A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody. *Biochem J* 387: 727-35
- Fridell YW, Villa J, Attar EC, Liu ET (1998) GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 7123-6.
- Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T (2002) Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 68: 150-60.
- Furie B, Bouchard BA, Furie BC (1999) Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 93: 1798-808
- Furie B, Furie BC (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53: 505-18
- Gaffney PJ LC (1994) An overview of fibrinolysis. In: Bloom AL FC, Thomas DP, Tuddenham EGD. (ed) *Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, pp 549-73
- Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C (1997a) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 17: 4442-53.
- Goruppi S, Yamane H, Marcandalli P, Garcia A, Clogston C, Gostissa M, Varnum B, Schneider C (1997b) The product of a gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation. *FEBS Lett* 415: 59-63.
- Gould WR, Baxi SM, Schroeder R, Peng YW, Leadley RJ, Peterson JT, Perrin LA (2005) Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses. *J Thromb Haemost* 3: 733-41
- Graham DK, Bowman GW, Dawson TL, Stanford WL, Earp HS, Snodgrass HR (1995) Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene* 10: 2349-59.
- Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS (1994) Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ* 5: 647-57
- Grant PJ (2003) The genetics of atherothrombotic disorders: a clinician's view. *J Thromb Haemost* 1: 1381-90
- Greten J, Kreis I, Liliensiek B, Allenberg J, Amiral J, Ziegler R, Nawroth PP (1998) Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis. *Vasa* 27: 144-8
- Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA (2005) Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 81: 581-91
- Hall MO, Prieto AL, Obin MS, Abrams TA, Burgess BL, Heeb MJ, Agnew BJ (2001) Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp Eye Res* 73: 509-20.
- Handford PA, Baron M, Mayhew M, Willis A, Beesley T, Brownlee GG, Campbell ID (1990) The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site. *Embo J* 9: 475-80
- Hansson K, Stenflo J (2005) Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 3: 2633-48

- Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD (2004) Intracellular signalling pathways involved in gas6-Axl mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1207-1213
- He X, Dahlback B (1994) Rabbit plasma, unlike its human counterpart, contains no complex between protein S and C4b-binding protein. *Thromb Haemost* 71: 446-51
- He X, Shen L, Malmborg AC, Smith KJ, Dahlback B, Linse S (1997) Binding site for C4b-binding protein in vitamin K-dependent protein S fully contained in carboxy-terminal laminin-G-type repeats. A study using recombinant factor IX-protein S chimeras and surface plasmon resonance. *Biochemistry* 36: 3745-54
- Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH (1994) Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2728-32
- Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6: 95-108
- Holmsen H (1994) Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest* 24 Suppl 1: 3-8
- Hooper WC, Phillips DJ, Ribeiro M, Benson J, Evatt BL (1995) IL-6 upregulates protein S expression in the HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Haemost* 73: 819-24
- Huang M, Rigby AC, Morelli X, Grant MA, Huang G, Furie B, Seaton B, Furie BC (2003) Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat Struct Biol* 10: 751-6
- Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. (2003) Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet*. 15;361(9357):567-71.
- Ishimoto Y, Nakano T (2000) Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets. *FEBS Lett* 466: 197-9.
- Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T (2000) Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem (Tokyo)* 127: 411-7.
- Janosikova B, Zavadakova P, Kozich V (2005) Single-nucleotide polymorphisms in genes relating to homocysteine metabolism: how applicable are public SNP databases to a typical European population? *Eur J Hum Genet* 13: 86-95
- Kalafatis M, Egan JO, van 't Veer C, Cawthern KM, Mann KG (1997) The regulation of clotting factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7: 241-80
- Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, Ogasawara T, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H (2001) Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem* 276: 7376-82.
- Kemkes-Matthes B, Matthes KJ (1995) Protein Z deficiency: a new cause of bleeding tendency. *Thromb Res* 79: 49-55
- Kemkes-Matthes B, Nees M, Kuhnel G, Matzdorff A, Matthes KJ (2002) Protein Z influences the prothrombotic phenotype in Factor V Leiden patients. *Thromb Res* 106: 183-5
- Kimura K, Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Yokouchi Y, Takeda K, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Hamaguchi H (1999) Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population. *Hum Mol Genet* 8: 1487-90
- Kumar S, Tamura K, Nei M et al. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-63
- Lee WP, Liao Y, Robinson D, Kung HJ, Liu ET, Hung MC (1999) Axl-gas6 interaction counteracts E1A-mediated cell growth suppression and proapoptotic activity. *Mol Cell Biol* 19: 8075-82.
- Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP (1996) Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* 16: 2012-9.
- Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-4
- Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-43

- Lichy C, Kropp S, Dong-Si T, Genius J, Dolan T, Hampe T, Stoll F, Reuner K, Grond-Ginsbach C, Grau A (2004) A common polymorphism of the protein Z gene is associated with protein Z plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young. *Stroke* 35: 40-5
- Lu D, Kalafatis M, Mann KG, Long GL (1996) Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood* 87: 4708-17
- Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G (1999) Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 398: 723-8.
- Lu Q, Lemke G (2001) Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 293: 306-11.
- Lundwall A, Dackowski W, Cohen E, Shaffer M, Mahr A, Dahlback B, Stenflo J, Wydro R (1986) Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6716-20
- Luskis AJ, Mar R, Pajukanta P (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 189-218
- Lutgens E, Garcia de Frutos P, Aparicio C, Moons L, Daemen M, Collen D, Carmeliet P (2000) Gas6^{-/-}/apoE^{-/-} mice develop a collagen-rich, disorganized plaque phenotype, prone to intraplaque hemorrhage. *Circulation* 102 (suppl II). Abstract.: 38-38
- Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 13: 4976-85.
- Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S (1988) Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* 57: 915-56
- Mann KG, Lorand L (1993) Introduction: blood coagulation. *Methods Enzymol* 222: 1-10
- Marcandalli P, Gostissa M, Varnum B, Goruppi S, Schneider C (1997) Identification and tissue expression of a splice variant for the growth arrest-specific gene gas6. *FEBS Lett* 415: 56-8.
- Marchini J, Donnelly P, Cardon LR. (2005) Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet.* ;37(4):413-7.
- Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowsk PJ (1996) Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain- containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* 271: 9785-9.
- Markus HS, Alberts MJ (2006) Update on genetics of stroke and cerebrovascular disease 2005. *Stroke* 37: 288-90
- Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM (2005) Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 3: 2817-9
- McDonald JF, Shah AM, Schwalbe RA, Kisiel W, Dahlback B, Nelsestuen GL (1997) Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site. *Biochemistry* 36: 5120-7
- McQuillan AM, Eikelboom JW, Hankey GJ, Baker R, Thom J, Staton J, Yi Q, Cole V (2003) Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke* 34: 2415-9
- Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, Corson MA (1998) Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res* 83: 697-704.
- Millar DS, Kembell-Cook G, McVey JH, Tuddenham EG, Mumford AD, Attock GB, Reverter JC, Lanir N, Parapia LA, Reynaud J, Meili E, von Felton A, Martinowitz U, Prangnell DR, Krawczak M, Cooper DN (2000) Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Hum Genet* 107: 327-42
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-8, 960, 962

- Munoz X, Sumoy L, Ramirez-Lorca R, Villar J, de Frutos PG, Sala N (2004) Human vitamin K-dependent GAS6: gene structure, allelic variation, and association with stroke. *Hum Mutat* 23: 506-12
- Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Kanamori H, Nakano T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T (2003) Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem* 278: 18229-34.
- Nagai K, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Kanamori H, Iehara N, Fukatsu A, Yanagita M, Nakano T, Ishimoto Y, Kita T, Doi T, Arai H (2005) Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 68: 552-61
- Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K (1996) Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271: 30022-7.
- Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, Ohashi K, Mizuno K, Arita H (1997) Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272: 29411-4.
- Nakano T, Kishino J, Arita H (1996) Characterization of a high-affinity and specific binding site for Gas6. *FEBS Lett* 387: 75-7.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846-52
- Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, Serke S, Siegert W, Snodgrass HR, Huhn D, et al. (1994) Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84: 1931-41.
- Newton-Cheh C, Hirschhorn JN (2005) Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res* 573: 54-69
- Nyberg P, Dahlback B, Garcia de Frutos P (1998) The SHBG-like region of protein S is crucial for factor V-dependent APC- cofactor function. *FEBS Lett* 433: 28-32
- Obach V, Munoz X, Sala N, Garcia de Frutos P, Chamorro A (2006) Intronic c.573 + 79G > A polymorphism of protein Z gene in haemorrhagic and ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 95: 1040-1
- O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET (1991) axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 11: 5016-31
- O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP (1999) Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol* 154: 1171-80.
- Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K (1995) Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 270: 22681-4.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766-70
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36
- Plescia J, Altieri DC (1996) Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation. *Biochem J* 319 (Pt 3): 873-9
- Prevost N, Woulfe D, Tognolini M, Brass LF (2003) Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *J Thromb Haemost* 1: 1613-27

- Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C (1999) Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 816: 646-61.
- Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S (1991) Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67: 687-99
- Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA (2004) Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 103: 1192-201
- Ribas G, Gonzalez-Neira A, Salas A, Milne RL, Vega A, Carracedo B, Gonzalez E, Barroso E, Fernandez LP, Yankilevich P, Robledo M, Carracedo A, Benitez J. (2006) Evaluating HapMap SNP data transferability in a large-scale genotyping project involving 175 cancer-associated genes. *Hum Genet.* 118(6):669-79.
- Rice GI, Futers TS, Grant PJ (2001) Identification of novel polymorphisms within the protein Z gene, haplotype distribution and linkage analysis. *Thromb Haemost* 85: 1123-4
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6: 597-610
- Rodriguez-Santiago B, Nunes V (2005) Expression of mitochondrial genes and transcription estimation in different brain areas in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Dis* 18: 296-304
- Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138: S419-20
- Sabater-Lleal M, Soria JM, Bertranpetit J, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Calafell F (2006) Human F7 sequence is split into three deep clades that are related to FVII plasma levels. *Hum Genet* 118: 741-751
- Saccone S, Marcandalli P, Gostissa M, Schneider C, Della Valle G (1995) Assignment of the human GAS6 gene to chromosome 13q34 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 30: 129-31.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Saller F, Burnier L, Schapira M, Angelillo-Scherrer A (2006) Role of the growth arrest-specific gene 6 (gas6) product in thrombus stabilization. *Blood Cells Mol Dis* 36: 373-8.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Santacroce R, Cappucci F, Di Perna P, Sessa F, Margaglione M (2004) Protein Z gene polymorphisms are associated with protein Z plasma levels. *J Thromb Haemost* 2: 1197-9
- Sasaki T, Knyazev PG, Cheburkin Y, Gohring W, Tisi D, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E (2002) Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains. *J Biol Chem* 277: 44164-70
- Schmidel DK, Tatro AV, Phelps LG, Tomczak JA, Long GL (1990) Organization of the human protein S genes. *Biochemistry* 29: 7845-52
- Schwarz HP, Heeb MJ, Wencel-Drake JD, Griffin JH (1985) Identification and quantitation of protein S in human platelets. *Blood* 66: 1452-5
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411: 207-11.
- Shankar SL, O'Guin K, Cammer M, McMorris FA, Stitt TN, Basch RS, Varnum B, Shafit-Zagardo B (2003) The growth arrest-specific gene product Gas6 promotes the survival of human oligodendrocytes via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Neurosci* 23: 4208-18.
- Shen L DB (1994) Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 269: 18735-8
- Slatkin M, Excoffier L (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* 76 (Pt 4): 377-83
- Smiley ST, Boyer SN, Heeb MJ, Griffin JH, Grusby MJ (1997) Protein S is inducible by interleukin 4 in T cells and inhibits lymphoid cell procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11484-9

- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*
- Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, Senda Y, Maemura K, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y (2006) Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ Res* 98: 1024-31
- Soria JM, Almasy L, Souto JC, Sabater-Lleal M, Fontcuberta J, Blangero J (2005) The F7 gene and clotting factor VII levels: dissection of a human quantitative trait locus. *Hum Biol* 77: 561-75
- Staton J, Sayer M, Hankey GJ, Cole V, Thom J, Eikelboom JW (2005) Protein Z gene polymorphisms, protein Z concentrations, and ischemic stroke. *Stroke* 36: 1123-7
- Stenflo J, Stenberg Y, Muranyi A (2000) Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochim Biophys Acta* 1477: 51-63
- Stenhoff J, Dahlback B, Hafizi S (2004) Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 871-8
- Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P (1986) Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol* 102: 1971-8
- Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, et al. (1995a) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 80: 661-70.
- Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T (2003) Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 14: 898-906.
- Tanaka A, Ueno Y, Nakayama Y, Takano K, Takebayashi S. Small chronic hemorrhages and ischemic lesions in association with spontaneous intracerebral hematomas. *Stroke*. 1999;30:1637-42.
- Tatewaki H, Tsuda H, Kanaji T, Yokoyama K, Hamasaki N (2003) Characterization of the human protein S gene promoter: a possible role of transcription factors Sp1 and HNF3 in liver. *Thromb Haemost* 90: 1029-39
- Todt JC, Hu B, Curtis JL (2004) The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. *J Leukoc Biol* 75: 705-13
- Tregouet DA, Tiret L (2004) Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. *Eur J Hum Genet* 12: 971-4
- Varadi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz HP (1996) Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC- mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost* 76: 208-14
- Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, et al. (1995) Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373: 623-6.
- Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C (2001) Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 357: 933-4.
- Villoutreix BO, Hardig Y, Wallqvist A, Covell DG, Garcia de Frutos P, Dahlback B (1998) Structural investigation of C4b-binding protein by molecular modeling: localization of putative binding sites. *Proteins* 31: 391-405
- Watkins H, Farrall M (2006) Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet* 7: 163-73
- White JG, Gerrard JM (1978) Recent advances in platelet structural physiology. *Suppl Thromb Haemost* 63: 49-60
- Wimmel A, Glitz D, Kraus A, Roeder J, Schuermann M (2001) Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *Eur J Cancer* 37: 2264-74.
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85

- Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, Lui WY, Lin WC (2002) Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res* 22: 1071-8.
- Yanagita M, Ishii K, Ozaki H, Arai H, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Kita T, Doi T. (1999) Mechanism of inhibitory effect of warfarin on mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. Dec; 10(12):2503-9.
- Yanagita M, Arai H, Ishii K, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Varnum B, Fukatsu A, Doi T, Kita T (2001a) Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 158: 1423-32.
- Yanagita M, Arai H, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Fukatsu A, Doi T, Kita T (2001b) Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J Biol Chem* 276: 42364-9.
- Yanagita M, Ishimoto Y, Arai H, Nagai K, Ito T, Nakano T, Salant DJ, Fukatsu A, Doi T, Kita T (2002) Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 110: 239-46.
- Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D, Broze GJ, Jr. (2000) Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6734-8
- Zapata C, Visedo G (1995) Gametic disequilibrium and physical distance. *Am J Hum Genet* 57: 190-3
- Zhao JH (2004) 2LD, GENECOUNTING and HAP: Computer programs for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics* 20: 1325-6
- Zondervan KT, Cardon LR. (2004) The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet*. 5(2):89-100.

Índex de Figures

Índex de FIGURES	pàg.
FIGURA 1. Família de proteïnes dependents de la vitamina K a l'hemostàsia	15
FIGURA 2. γ -carboxilació de l'àcid glutàmic	16
FIGURA 3. Cicle de la vitamina K i enzims que hi intervenen	17
FIGURA 4. Estructura de la proteïna GAS6.....	24
FIGURA 5. Localització del gen <i>GAS6</i> i d'altres gens de proteïnes dependents de la vitamina K	25
FIGURA 6. Estructura dels RTK	27
FIGURA 7. Via de trasducció del senyal mediada pels receptors TAM	29
FIGURA 8. Interacció de GAS6 amb els RTK	31
FIGURA 9. Característiques de les malalties complexes	37
FIGURA 10. La cascada de la coagulació i les seves vies d'inhibició	42
FIGURA 11. Procés de la fibrinòlisi i el seu control	44
FIGURA 12. Classificació dels accidents cerebrovasculars segons TOAST	51
FIGURA 13. Electroforesi de mRNA d'artèria coronària	71
FIGURA 14. Distribució dels encebadors dissenyats a <i>GAS6</i>	74
FIGURA 15. Funcionament de les sondes FRET	87
FIGURA 16. Corba de fusió de la sonda sensor específica per un al·lel polimòrfic de <i>GAS6</i>	87
FIGURA 17. Segona derivada de la corba de fusió de la figura 16	88
FIGURA 18. Identificació dels contigs que contenen seqüències de <i>GAS6</i>	109
FIGURA 19. Caracterització de l'estructura genètica de <i>GAS6</i>	1
FIGURA 20. Illes CpG de 10Kb a <i>GAS6</i>	115
FIGURA 21. Alineament dels dominis Gla de les proteïnes dependents de vit. K	118
FIGURA 22. Comparació de les seqüències de les proteïnes dependents de la vitamina K	118
FIGURA 23. Arbre filogenètic de les diferents espècies pel mRNA de <i>gas6</i>	120
FIGURA 24. Localització dels fragments amplificats per PCR	123
FIGURA 25. Anàlisi per SSCP dels diferents fragments amplificats amb alguna variant identificada	124
FIGURA 26. Seqüències de variants identificades de <i>GAS6</i>	125
FIGURA 27. Anàlisi per SSCP dels fragments de <i>GAS6</i> , sense canvi identificat	126

FIGURA 28 Representació esquemàtica de l'estructura genètica de <i>GAS6</i>	127
FIGURA 29. Anàlisi del polimorfisme c.600+304-377del	128
FIGURA 30. Anàlisi dels genotips dels diferents SNP de <i>GAS6</i>	128
FIGURA 31. Anàlisi de LD amb el programa 2ld	133
FIGURA 32. Anàlisi per SSCP del fragment amplificat per PROZF-PROZR	143
FIGURA 33. Anàlisi amb l'enzim de restricció HpaI del fragment amplificat de <i>PROZ</i>	143
FIGURA 34. Seqüenciació dels diferents genotips del SNP de <i>PROZ</i>	144
FIGURA 35. Electroferograma de D13S285	145
FIGURA 36. Comparació de LD amb diferents programes.....	147
FIGURA 37. Anàlisi de LD entre els SNP de <i>GAS6</i> , <i>PROZ</i> i D13S285	148
FIGURA 38. Els SNP de <i>GAS6</i> genotipats LD descrits a HapMap	158
FIGURA 39. Variant de <i>splicing</i> a <i>GAS6</i>	161
FIGURA 40. Gel d'acrilamida del fragment amplificat de E8RTF-E8RTR	162
FIGURA 41. Imatge de les corbes del LC a <i>GAS6</i>	164
FIGURA 42. Imatge de les corbes del LC a <i>GAPDH</i>	164
FIGURA 43. Imatge de les corbes del LC a <i>B2M</i>	165
FIGURA 44. Imatge de les corbes del LC a <i>Ciclofilina A</i>	165

Índex de Taules

Índex de TAULES	pàg.
TAULA 1. Identificadors de les proteïnes dependents de la vitamina K	18
TAULA 2. Identificadors dels receptors TAM	28
TAULA 3. Característiques de la població d'ictus de l'Hospital Clínic	66
TAULA 4. Oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació del DNA genòmic de <i>GAS6</i>	75
TAULA 5. Condicions específiques per l'amplificació dels fragments de <i>GAS6</i>	76
TAULA 6. Polimorfismes analitzats utilitzant enzims de restricció	86
TAULA 7. Genotips dels SNP analitzats amb LC	90
TAULA 8. Condicions d'amplificació dels fragments de cDNA a l'estudi d'expressió	97
TAULA 9. Encebadors utilitzats a l'estudi d'expressió	98
TAULA 10. Equació utilitzada pel càlcul de la ratio de l'expressió gènica	99
TAULA 11. Identificadors dels contigs que contenen seqüències de <i>GAS6</i> mitjançant BLASTn	108
TAULA 12. Organització genètica de <i>GAS6</i>	110
TAULA 13. Característiques de les repeticions identificades a <i>GAS6</i>	111
TAULA 14. Repeticions detectades per RepeatView	112
TAULA 15. Anàlisi del promotor de <i>GAS6</i> amb FPROM	113
TAULA 16. Anàlisi del promotor de <i>GAS6</i> amb <i>Promoter 2.0 Prediction Server</i>	114
TAULA 17. Potencials caixes TATA trobades a la regió 5' de <i>GAS6</i>	114
TAULA 18. Cerca de promotors usant illes CpG	115
TAULA 19. Resultat de l'anàlisi de CpGplot a <i>GAS6</i>	115
TAULA 20. Resultat de l'anàlisi de CpGplot a <i>PROSI</i>	116
TAULA 21. Resultat de CpGisland mapping a <i>GAS6</i>	116
TAULA 22. Identificació de seqüències entre <i>Gas6</i> i les proteïnes dependents de la vitamina K	117
TAULA 23. Estructura genètica del gen <i>GAS6</i> en humà, rata, ratolí i <i>PROSI</i> humà ...	119
TAULA 24. BLASTx de <i>Gas6</i> i totes les bases de proteïnes	121
TAULA 25. Noms d'accés dels SNP de <i>GAS6</i> identificats	126
TAULA 26. Anàlisi de l'equilibri H-Wen la població amb malaltia ateroscleròtica	131
TAULA 27. Freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes de <i>GAS6</i> analitzats	132
TAULA 28. Anàlisi d'haplotips amb el programa THESIAS a la població amb	

malaltia aterotrombòtica	134
TAULA 29. Anàlisi de l'equilibri de HW en població amb ictus	135
TAULA 30. Freqüència al·lèlica dels polimorfismes de <i>GAS6</i> a la població amb malaltia cerebrovascular	136
TAULA 31. Freqüència de genotips dels SNP de <i>GAS6</i> en els subtipus d'I.I. i I.H	137
TAULA 32. Anàlisi per regressió logística dels SNP de <i>GAS6</i> en població amb malaltia cerebrovascular	138
TAULA 33. Freqüència del polimorfisme c.600+304-377del de <i>GAS6</i>	139
TAULA 34. Distribució dels genotips del SNP de l'intró 8 de <i>GAS6</i> i anàlisi per regressió logística en subtipus d'Ictus	141
TAULA 35. Anàlisi de regressió logística dels genotips de l'intró 8 de <i>GAS6</i> en diferents models d'herència	142
TAULA 36. Metaanàlisi del SNP de <i>PROZ</i>	144
TAULA 37. Distribució dels genotips del SNP de <i>PROZ</i> analitzat	145
TAULA 38. Distribució de les freqüències del marcador D13S285	145
TAULA 39. Valors de LD entre el polimorfismes de l'intró 5 de <i>GAS6</i> i la resta de SNP	147
TAULA 40. Anàlisi de LD entre el SNP del gen <i>PROZ</i> i els SNP de <i>GAS6</i>	148
TAULA 41. Anàlisi de LD amb EH+ entre el marcador D13S285 i els SNP de <i>GAS6</i>	149
TAULA 42. Anàlisi d'haplotips dels 8 SNP de <i>GAS6</i>	151
TAULA 43. Haplotips més freqüents a la població amb malaltia cerebrovascular	152
TAULA 44. Freqüències al·lèliques, genotípiques i OR pel SNP de l'intró 8 en malaltia cerebrovascular en individus joves	153
TAULA 45. Freqüències al·lèliques, genotípiques i OR pel SNP de l'intró 8 en individus tractats amb antiacoagulants orals	154
TAULA 46. Freqüències al·lèliques, genotípiques i OR pel SNP de l'intró 8 en població amb infart de miocardi	154
TAULA 47. Freqüències al·lèliques, genotípiques i OR pel SNP de l'intró 8 en pacients amb nefropatia diabètica	155
TAULA 48. Polimorfismes descrits al projecte HapMap i a dbSNP.....	156
TAULA 49. Resultats de l'anàlisi dels SNP amb el programa SpliceView	159
TAULA 50. Eficiències de les PCR dels fragments inclosos a l'estudi d'expressió	162
TAULA 51. CP i desviació estàndard de la mostra control	163

TAULA 52. Anàlisi d'expressió per RT-PCR al LC del mRNA de <i>GAS6</i> en mostres sanes i patològiques	166
TAULA 53. Anàlisi d'expressió relativa de la PCR a temps real entre mostres amb i sense placa d'ateroma	168
TAULA 54. Anàlisi d'expressió relativa de la PCR a temps real entre mostres amb diferents genotips pel SNP de l'intró 8 de <i>GAS6</i>	168

APÈNDIX

APÈNDIX 1

Identificació d'exons de gasó en altres espècies utilitzant BLASTn amb el cDNA de GAS6 com a ham.

Exó	Opossum		Rata		Ratolí		Vaca		Macaco	
	Identitat	Evalor	Identitat	Evalor	Identitat	Evalor	Identitat	Evalor	Identitat	Evalor
1	140/177 (79%)	6e-34	61/75 (81%)	3e-5	93/119 (78%)	7e-7	36/41 (87%)	0,73		
2			148/164 (90%)	3e-53	147/164 (89%)	2e-51			45/52 (86%)	4e-4
3										
4										
5			103/118 (87%)	2e-28	103/120 (85%)	6e-26	98/118 (83%)	2e-19		
6	75/106 (70%)	4e-5	79/94 (84%)	2e-14	99/125 (79%)	3e-13	100/122 (81%)	3e-18		
7	87/125 (69%)	7e-9	100/122 (81%)	1e-18	99/122 (81%)	1e-16	94/116 (81%)	9e-15		
8	90/125 (72%)	1e-11	106/125 (84%)	2e-25	106/125 (84%)	2e-25	105/119 (88%)	2e-30		
9	92/122 (75%)	7e-15	110/122 (90%)	6e-36	110/122 (90%)	8e-36	102/122 (83%)	e-21		
10	143/193 (74%)	3e-29	150/189 (79%)	7e-28	153/190 (80%)	9e-32	167/192 (86%)	2e-53		
11	127/169 (75%)	1e-25	129/164 (78%)	3e-20	130/164 (79%)	7e-22	144/169 (85%)	3e-40		
12	127/169 (75%)	1e-25	136/166 (81%)	4e-30	114/136 (83%)	2e-26	133/165 (80%)	9e-26		
13			112/129 (87%)	<5e-5	125/165 (75%)	4e-9	113/144 (78%)	2e-12		
14	153/234 (65%)	1e-19	188/233 (80%)	7e-43	182/233 (78%)	2e-32	171/215 (79%)	7e-34		
15	118/164 (71%)	1e-19	189/224 (84%)	<2e-17	174/201 (87%)	<3e-24	177/203 (87%)	<2e-42		

APÈNDIX 2

Article publicat a Human Mutation sota el títol:

“Human vitamin K-dependent GAS6: gene structure, allelic variation, and association with stroke”

Muñoz X, Sumoy L, Ramírez-Lorca R, Villar J, de Frutos P, Sala N.

2004 May;23(5):506-12

APÈNDIX 3

Article publicat a Thrombosis and Haemostasis sota el títol:

“Intronic c.573 + 79G > A polymorphism of protein Z gene in haemorrhagic and ischaemic stroke”

Obach V, Muñoz X, Sala N, García de Frutos P, Chamorro A

2006 Jun;95(6):1040-1.

APÈNDIX 4

Article sotmès a la revista Journal of Medical Genetics sota el títol:

“Association of specific haplotypes of GAS6 gene with atherosclerotic stroke”

Muñoz X, Obach V, Hurtado B, García de Frutos P, Chamorro A, Sala N.

