

Institut Pere Mata
Hospital Psiquiàtric Universitari
Departament de Formació i Investigació

Ctra. de l'Institut Pere Mata, s/n. 43206 Reus. Spain
Phone: +34 977 338565 ext. 304
Fax: +34 977 310021

Unitat de Psiquiatria i Psicologia Mèdica
Departament de Medicina i Cirurgia
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut - Reus
Universitat Rovira i Virgili



C/ Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. Spain
Phone: +34 977 759338
Fax: +34 977 759322

Elisabet Vilella Cuadrada, del Departament de formació i investigació de l'Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata i professora associada de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili,

INFORMA QUE:

La tesi doctoral titulada "**Expressió del receptor domini discoidina 1 (DDR1) en cervell humà. Relació amb l'esquizofrènia**" presentada per **Bàrbara Roig Bourguine**, ha estat realitzada sota la meua direcció i compleix amb els requisits necessaris per a optar al títol de Doctora.

Per a que així consti i tingui els efectes oportuns, signo la present.

Nom i signatura de la Directora

Dra. Elisabet Vilella Cuadrada

Reus, 26 de Setembre 2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA
Departament de Medicina i Cirurgia

**Expressió del receptor domini discoidina 1
(DDR1) en cervell humà. Relació amb
l'esquizofrènia.**

Bàrbara Roig
Tesi Doctoral
2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

*Als meus pares,
A l'Oscar, Duna i Ivet,*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

Agraïments/Agradecimientos

Hi ha molta gent a qui agrair aquest treball i els anys implicats en desenvolupar-ho. En primer lloc voldria agrair a la meva directora de tesi, la Dra. Elisabet Vilella la oportunitat d'oferir-me de realitzar aquest treball i la seva dedicació, recolzament i energia per tal de formar-me com una bona investigadora.

Vull agrair a tot l'equip del GIP, el Dr. Labad, Joaquin, Alfonso, M^a José... i especialment a la Dra. Lourdes Martorell els bons moments que hem viscut i la lluita diària que tots hem patit i que es pateix per tal de que la investigació no finalitzi mai. No vull oblidar-me de la meva Neus, la meva "profe" de bona part de la part experimental d'aquest projecte i de l'amistat que m'ha ofert durant aquests quatre anys. Gràcies també al Jordi per la seva ajuda i consells estètics d'aquesta tesi. També vull donar les gràcies a la Marta "d'onco" per ser tan bona companya de despatx i per la nostra recent amistat que espero que perduri per molt de temps.

Gràcies a les "nenes" de la URL, Roser, Adriana, Montse... pels nostres divendres diferents al Viena, per saber escoltar i per la vostra amistat que feien que el dia a dia fos més agradable i sobretot per la vostra ajuda científica que sempre era ben rebuda. Gràcies als vostres "caps", en Jimmy, Josefa i Josep que sempre teniu un somriure a la cara que s'agraeix de tot cor.

Gràcies també a la gent del CRB, Judit, Anna, Gerard, Blai... i a la gent del Biobanc, Lídia, Carme, Rafa per la vostra ajuda i per facilitar-me tantes vegades la feina.

Finalmente y no por eso menos importante quiero agradecer especialmente esta tesis a mis padres quienes aunque no entienden muy bien el significado de este trabajo os quiero decir a ciencia cierta que es lo más importante a nivel laboral que he realizado y que todo se debe a vuestro esfuerzo y motivación por formarme como persona tanto a nivel personal como profesional. Gracias.

Y como no, a mi Oscar, gracias por aguantar todos estos años, por tu cariño y tu comprensión y aunque tu tampoco entiendes bien bien quen es lo que hago te puedo decir que ahora empieza para mi una nueva etapa que espero vaya para mejor. Y a mis niñas, Duna y la pequeña Ivet que haceis que cada dia acabe agotada pero que sois mi vida y mi alegría.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

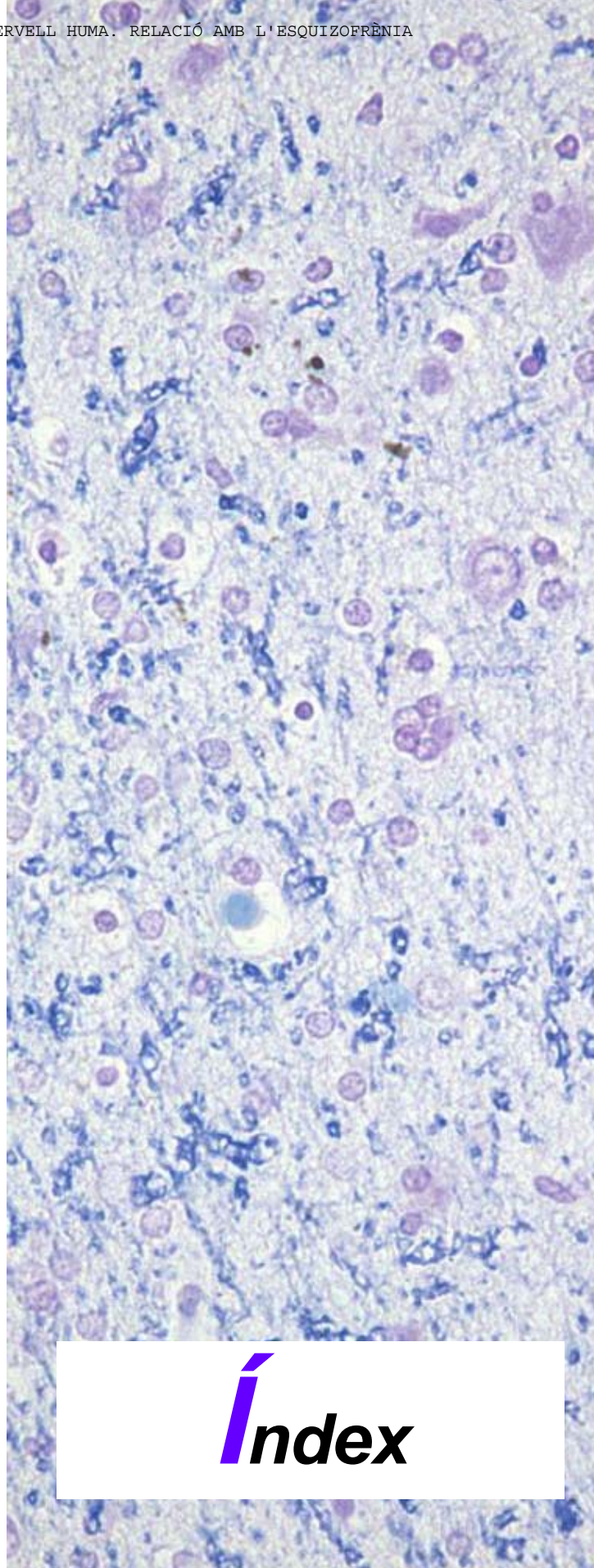
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



Í
ndex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

Índex

Justificació.....	8
1. Introducció.....	11
1.1. Esquizofrènia.....	11
1.2. Esquizofrènia i teoria del neurodesenvolupament.....	12
1.3. Substància grisa i substància blanca	14
1.3.1. Composició	14
1.3.2. Tipus cel·lulars	15
1.4. Mielina.....	19
1.4.1. Composició de la mielina.....	19
1.4.1.1. Lípids de la mielina.....	19
1.4.1.2. Proteïnes de la mielina	20
1.4.2. Origen i maduració del llinatge oligodendroglial	24
1.4.3. Marcadors oligodendroglials.....	25
1.4.3.1. Marcadors somàtics	26
1.4.3.2. Marcadors de mielina	28
1.4.4. Transport de RNA cap als processos oligodendroglials.....	29
1.5. Alteracions de la substància grisa en l'esquizofrènia	32
1.6. Alteracions de la substància blanca en l'esquizofrènia	34
1.7. Aportacions de la genètica a la hipòtesi que la substància blanca està alterada en l'esquizofrènia.....	36
1.7.1. Gens de la mielina.....	37
1.7.2. Gens en el cromosoma 6p	41
1.7.3. Patologies humanes de la mielina	43
1.8. El receptor domini discoidina 1	45
1.8.1. Família dels receptors domini discoidina.....	45
1.8.2. DDR1	47
1.8.2.1. Estructura gènica.....	47
1.8.2.2. Estructura proteica	49
1.8.2.3. Paper de DDR1 en el sistema nerviós central	52
1.8.2.4. Paper de DDR1 en altres teixits.....	54
2. Hipòtesi	57
3. Objectius	59
4. Material i mètodes	61
5. Resultats	
5.1. Estudi 1. Estudi d'associació del gen receptor domini discoidina 1 (DDR1) en l'esquizofrènia	

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

5.1.1. Antecedents	76
5.1.2. Objectius	77
5.1.3. Resultats	78
5.2. Estudi 2. Expressió de DDR1 en cervell humà	
5.2.1. Antecedents	84
5.2.2. Objectius	84
5.2.3. Resultats	85
5.3. Estudi 3. Anàlisi quantitativa d'expressió de DDR1 en malalts esquizofrènics i controls	
5.3.1. Antecedents	96
5.3.2. Objectius	96
5.3.3. Resultats	97
6. Discussió	107
7. Conclusions	120
8. Bibliografia	122
9. Abreviatures	160
10. Annexos	163

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

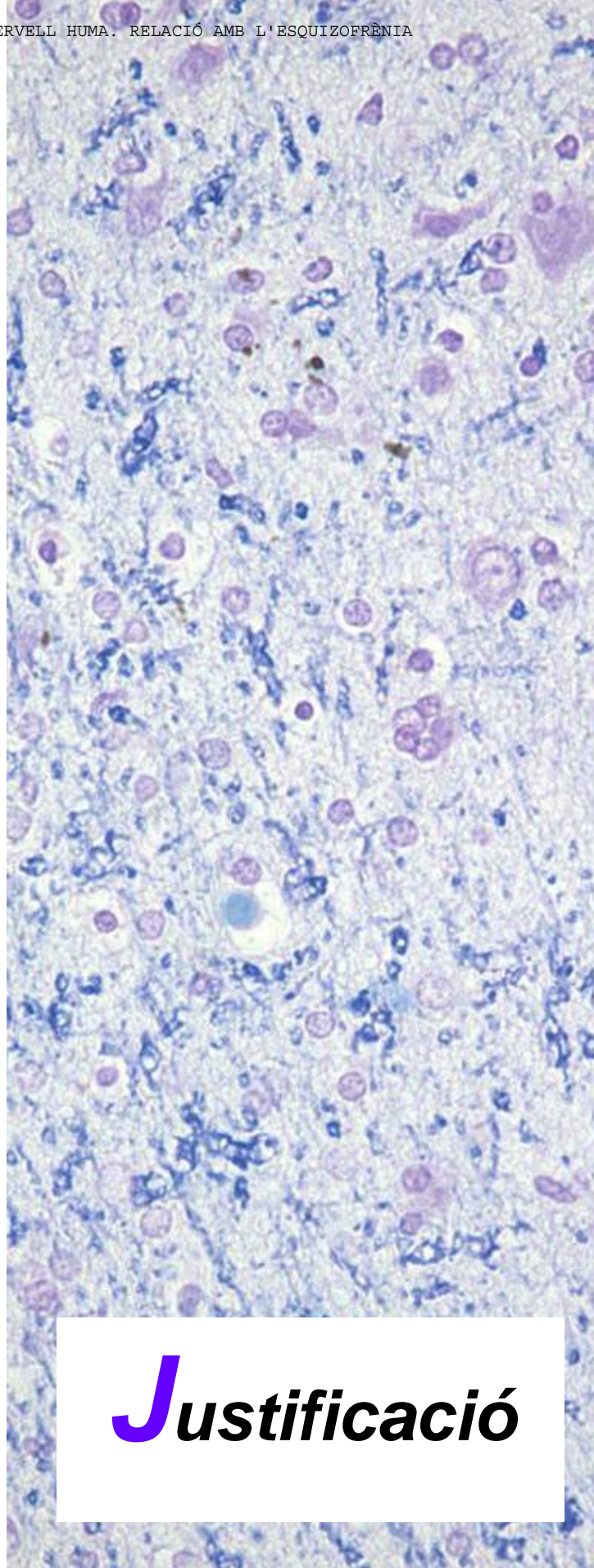
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



***J*ustificació**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

L'esquizofrènia és una malaltia complexa en la que influeixen la combinació de factors genètics i factors ambientals. Fins a la actualitat s'han identificat múltiples gens associats a la malaltia però encara es desconeixen els gens directes causants de la malaltia.

Durant l'última dècada una de les hipòtesis etiopatològiques més recolzades per l'esquizofrènia és la teoria del neurodesenvolupament. Aquesta hipòtesi postula que l'origen de la esquizofrènia tindria lloc per alteracions de la neurogènesi i gliogènesi en les etapes del desenvolupament perinatal. La manifestació clínica d'aquestes alteracions no tindria lloc fins al final de l'adolescència.

L'any 1998 el nostre grup es va interessar pel gen del Receptor Domini Discoidina 1 (DDR1) com a possible gen candidat en l'esquizofrènia per diverses raons:

1. DDR1 és un receptor tirosina quinasa que presenta una elevada homologia als receptors de neurotrofines, els quals són importants en el cervell.
2. El gen humà de DDR1 es localitza en el cromosoma 6p21. En aquesta regió diversos estudis de lligament en famílies amb elevada càrrega de pacients amb esquizofrènia van donar resultats positius.
3. S'ha vist que DDR1 s'expressa en àrees proliferatives durant el neurodesenvolupament de rata i ratolí. També s'expressa en cervell adult.
4. S'accepta la teoria del neurodesenvolupament de la esquizofrènia en la qual alteracions en la expressió de gens que afectin el desenvolupament del cervell poden desencadenar la manifestació clínica de la malaltia en l'adolescència.

Tots aquests arguments ens van encoratjar a estudiar la possible implicació de DDR1 amb la malaltia. Amb aquest supòsit es van iniciar dues línies d'investigació diferents que van donar lloc a 2 tesis doctorals ja defensades:

1. Identificació de variants genètiques en el gen humà de DDR1 en una mostra de malalts d'esquizofrènia i individus controls i estudi d'associació amb la malaltia. Tesis doctoral defensada l'any 2004 per Carme Virgos.
2. Estudi de l'expressió de DDR1 durant el desenvolupament embrionari i postnatal de ratolí. Aquest treball constitueix una part de la tesi doctoral defensada l'any 2006 per Neus Franco. Els resultats d'aquest estudi es van publicar l'any 2006 a la revista Neuroscience.

Justificació

3. Identificar la possible implicació de DDR1 en el procés de mielinització en un model murí de desmielinització-remielinització induïda per cuprizona. Aquest treball constitueix l'altre part de la tesi doctoral defensada per Neus Franco. Els resultats d'aquest treball estan sotmesos a publicar i ja han passat 2 revisions.

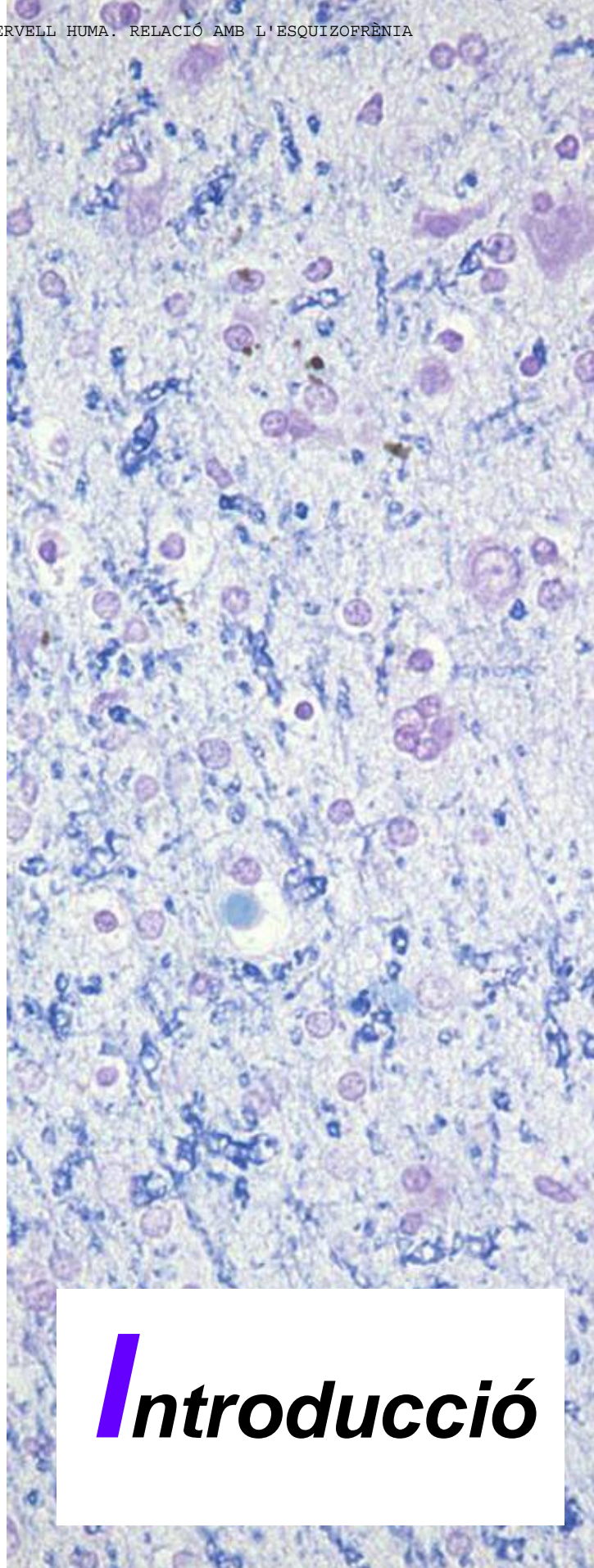
La present tesi doctoral es centra en l'estudi de l'expressió de DDR1 en cervell humà i la seva implicació en la malaltia de l'esquizofrènia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

1.1. ESQUIZOFRÈNIA

L'esquizofrènia (del grec, *schizo*: divisió i *phrenos*: ment) és un trastorn mental que presenta alteracions de diversos aspectes de la constitució psíquica de l'individu i una desorganització dels aspectes de la personalitat que afecta alguns atributs humans fonamentals com el llenguatge, el pensament, la percepció, l'afectivitat i el sentit d'un mateix. Té una prevalença aproximada d'un 1% en la població mundial i es caracteritza per ser una malaltia crònica, severa i recurrent, i que comporta un gran impacte en la vida social del malalt i del seu entorn familiar. Els símptomes de la malaltia inclouen al·lucinacions auditives i visuals, i idees delirants. L'edat d'inici de la malaltia té lloc entre el final de l'adolescència i el principi de l'edat adulta. Les hipòtesis etiopatogèniques per a l'esquizofrènia són molt variades. Les teories més influents cap a la meitat del segle XX van ser les teories psicosocials que postulen l'acció d'activitats quotidianes estressants com la conseqüència principal d'una alteració del rol social de l'individu que desencadena la malaltia. Les teories actuals consideren la malaltia com a multifactorial on hi ha una combinació del component genètic en l'expressió de la malaltia, juntament amb un important efecte ambiental (Lander i Schork, 1994). S'han postulat múltiples teories causals de l'esquizofrènia. Cadascuna d'aquestes teories explica algun dels fenòmens associats a la malaltia, però cap d'aquestes preveu totes les manifestacions del trastorn. Hi ha diverses teories per a l'esquizofrènia com són: la hipòtesi dels neurotransmissors dopamina, glutamat, acetilcolina, serotonina, GABA i noradrenalina (Owen i Simpson, 1994); la hipòtesi de la transmetilació (Smythies, 1983); la hipòtesi viral (Torrey i Peterson, 1976); la hipòtesi dels fosfolípids de membrana (Pettegrew et al., 1991) i, finalment, la hipòtesi del neurodesenvolupament (Weinbenger, 1987).

1.2. ESQUIZOFRÈNIA I TEORIA DEL NEURODESENVOLUPAMENT

Una de les teories més acceptades en l'última dècada és la teoria del neurodesenvolupament, postulada per primera vegada per Weinberger l'any 1987 (Weinberger, 1987). Aquesta postula que l'origen de l'esquizofrènia tindria lloc per alteracions durant el desenvolupament embrionari del cervell que conferirien susceptibilitat a desenvolupar la malaltia en l'adolescència. Durant l'etapa postnatal i infantesa tenen lloc una sèrie de processos de maduració en el cervell humà i no és fins al final de l'adolescència que es considera que el cervell és madur i es caracteritza per presentar el volum màxim de substància grisa. A partir d'aquesta etapa, la substància grisa es va reduint progressivament al llarg de tota la seva vida. Fins una etapa adulta mitjana aquesta reducció va acompanyada d'una expansió en volum de la substància blanca mielinitzant. Aquests dos processos oposats cancel·len el seu efecte volumètric respectivament, de forma que els canvis en el volum total del cervell normal adult són mínims (Rehn i Rees, 2005; Lobato et al., 2001).

Tots els processos de maduració que tenen lloc fins a l'etapa de l'adolescència, juntament amb factors ambientals estressants, provocarien la manifestació clínica tardana d'alteracions latents. Hi ha múltiples evidències que donen suport a aquesta teoria. S'ha vist que els malalts esquizofrènics poden presentar alteracions morfològiques en el cervell a l'inici de la malaltia que romanen estàtiques i que no progressen al llarg de la malaltia com són l'agènesi parcial o total del cos callós, l'eixamplament dels ventricles laterals acompanyat de reduccions en volum dels lòbuls temporal i frontal, i del nucli talàmic, i/o les alteracions neuronals des del punt de vista d'organització, especificitat i connectivitat (figura 1). Aquestes alteracions s'originen abans o després del naixement. Un altre fet que dóna suport a la teoria del neurodesenvolupament és l'absència de gliosi que poden presentar els malalts. S'entén com a *gliosi* la manifestació del cervell en resposta a un dany amb expressió de cèl·lules necròtiques i/o apoptòtiques. Per tant, alteracions cerebrals sense gliosi són indicatives d'alteracions que tenen lloc durant el desenvolupament del cervell.

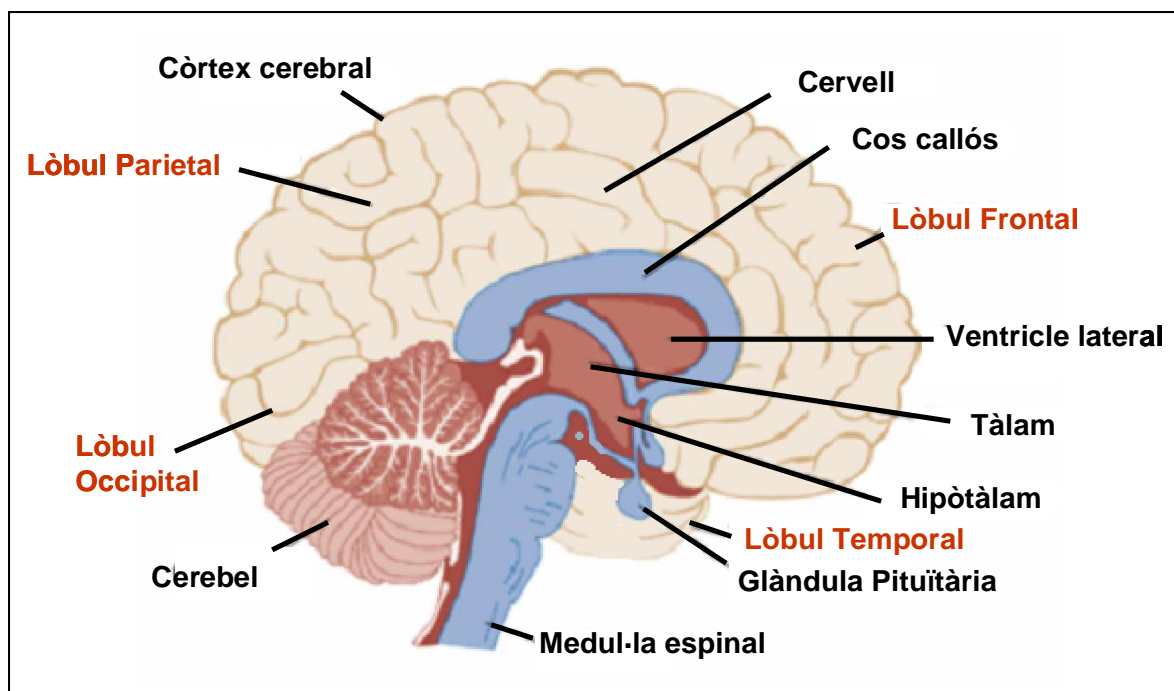


Figura 1. Visió lateral de l'encèfal. En lletra negra es descriuen les principals estructures anatòmiques que el constitueixen. En lletra vermella es destaquen les principals àrees funcionals del cervell: el lòbul occipital com a principal centre responsable de visió primària, el lòbul parietal implicat en les sensacions, el lòbul frontal implicat en la personalitat i l'àrea motora, i finalment, el lòbul temporal responsable del llenguatge i la memòria.

1.3. SUBSTÀNCIA GRISA I SUBSTÀNCIA BLANCA

El sistema nerviós es divideix en dues parts principals: el sistema nerviós central (SNC) que consisteix en l'encèfal i la medul·la espinal, i el sistema nerviós perifèric (SNP) que consta dels nervis cranials i espinals, i els seus ganglis associats. L'encèfal i la medul·la espinal de l'SNC són els centres principals de correlació i integració de la informació nerviosa. Ambdues estructures estan cobertes per unes membranes (*meninges*) i suspeses per líquid cefaloraquídi. A més, són estructures que estan protegides pels ossos del crani i la columna vertebral. L'interior de l'SNC està organitzat en substància grisa i substància blanca (Kiernan, 2000; Snell, 2003).

1.3.1. Composició

La substància grisa està formada per neurones i cèl·lules de la glia, i està altament vascularitzada. L'absència de mielina confereix un aspecte gris al teixit.

La substància blanca es correspon a les zones de l'SNC on hi ha un predomini d'axons mielinitzats. El color blanc és degut al seu elevat contingut en mielina i és una estructura molt ben organitzada i menys vascularitzada que la substància grisa.

En l'encèfal, la substància grisa es localitza en la perifèria (*còrtex*) del cervell i cerebel, i també forma els ganglis basals més profunds, mentre que la substància blanca està a un nivell més profund respecte el còrtex i rodeja els ganglis basals (vegeu la figura 2).

A la inversa succeeix a la medul·la espinal, on la substància blanca es localitza en la perifèria i la substància grisa s'ubica a l'interior.

En la substància blanca de l'hemisferi cerebral, tal com es pot veure a la figura 2, es distingeixen tres tipus de fibres segons les seves connexions: les *fibres d'associació*, que es localitzen en un hemisferi i connecten àrees corticals; les *fibres comissurals* que connecten les escorces dels dos hemisferis i, per acabar, les *fibres de projecció*, les quals connecten l'escorça i estructures subcorticals com el cos estriat, el tàlam, els nuclis del tall cerebral i la medul·la espinal. Les agrupacions d'axons mielinitzats reben el nom de *fascicle*, *cordó* o *tracte*. Hi ha diversos fascicles d'associació, com el longitudinal superior, l'arquejat, el longitudinal inferior, l'occipitofrontal inferior, l'uncinat i l'occipitofrontal superior que interconnecten lòbuls cerebrals. Altres fascicles d'associació són el cíngul, el fòrnix, l'estria longitudinal i l'estria terminal, els quals formen part del sistema límbic (Kiernan, 2000; Snell, 2003).

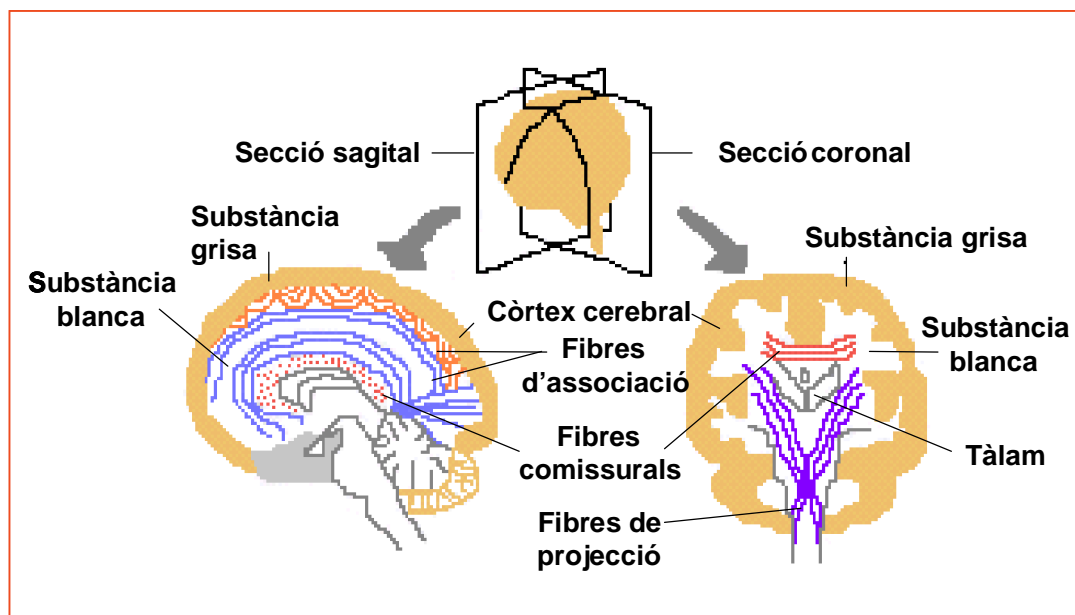


Figura 2. Seccions sagital medial i coronal de l'encèfal en les quals s'indica la localització de la substància blanca i grisa, i la posició dels principals fascicles de fibres d'associació, comissurals i de projecció de la substància blanca.

1.3.2. Tipus cel·lulars

Les cèl·lules de l'SN es poden dividir en dues categories:

Neurones

Són cèl·lules excitables especialitzades en la recepció i la transmissió dels impulsos nerviosos a l'SNC. La mida i forma és variable, però totes es caracteritzen per presentar un cos cel·lular (*soma*) on es projecten unes prolongacions (*neurites*). Les neurites que reben la informació i la condueixen cap al soma es coneixen com a *dendrites*. La llarga i única neurita tubular que condueix els impulsos des del soma es coneix com a *axó*. Les neurones es localitzen en l'encèfal, la medul·la espinal i els ganglis. D'acord amb la forma i disposició de les seves prolongacions, les neurones es classifiquen en: *neurones unipolars* que contenen una sola neurita que es divideix a curta distància del soma cel·lular en dues branques, una de les quals es dirigeix cap a alguna estructura perifèrica i l'altra cap a l'SNC; les *neurones bipolars*, que contenen una única neurita en cada extrem del soma; i les *neurones multipolars*, que contenen moltes neurites tipus dendrita i un únic axó. Aquestes últimes són les més comunes, estan en l'encèfal i la medul·la espinal, i majoritàriament són motores. Per la seva mida, les neurones també es classifiquen en: *neurones de*

Introducció

Golgi tipus I, que tenen un llarg axó de més d'un metre de longitud i que constitueixen llargs trajectes de fibres de l'encèfal i la medul·la espinal, i les fibres nervioses dels nervis perifèrics; i les *neurones de Golgi tipus II*, que contenen un axó curt que finalitza prop del soma cel·lular o que manca del tot. Aquestes últimes són més nombroses que les neurones Golgi tipus I i són abundants en el còrtex cerebral (Kiernan, 2000; Snell, 2003).

Cèl·lules glials

L'any 1846 es va descriure per primera vegada l'existència d'altres cèl·lules en el sistema nerviós a part de les neurones, la *neuroglia*. La neuroglia consisteix en un conjunt de cèl·lules no excitables de sustentació de les neurones de l'SNC. Les cèl·lules glials constitueixen el grup de cèl·lules més nombrós del sistema nerviós, i representa el 90% de les cèl·lules totals del cervell humà i el 50% del volum total de l'encèfal i la medul·la espinal. Hi ha 4 tipus principals de cèl·lules neuroglials: a) els astròcits, b) la microglia, c) l'epèndima o cèl·lules epèndimàries i d) els oligodendròcits. A continuació es fa una breu descripció de cadascun d'aquest tipus cel·lular:

a) Astròcits

Són les cèl·lules neuroglials més grans. N'hi ha de dos tipus: els *astròcits protoplàsmics* i els *astròcits fibrosos*. Els *astròcits protoplàsmics* estan sobretot en la substància grisa. Presenten unes prolongacions més curtes, més gruixudes i més ramificades que els astròcits fibrosos. Moltes de les prolongacions finalitzen en expansions sobre els vasos sanguinis (peus perivasculars), on formen una cobertura sobre la superfície externa dels capil·lars. També presenten prolongacions que constitueixen les membranes limitants glials interna i externa. Finalment, hi ha prolongacions dels astròcits al voltant del segment inicial de la majoria dels axons i en els segments no mielinitzats dels nòduls de Ranvier. Per altra banda, els *astròcits fibrosos* es localitzen bàsicament en la substància blanca on les seves prolongacions passen entre les fibres nervioses. Cada prolongació és llarga, prima, llisa i no ramificada (Kiernan, 2000; Snell, 2003).

b) Microglia

Les cèl·lules de microglia són membres del sistema fagocític mononuclear que no provenen del llinatge de cèl·lules neuronals. Són les cèl·lules neuroglials més

petites i estan disperses per tot l'SNC. El seu cos cel·lular i prolongacions presenten espines. Actuen com a fagòcits per eliminar desfetes i estructures danyades de l'SNC. Quan s'activen, actuen com a cèl·lules presentadores d'antigen i secreten citoquines. A diferència de la resta de cèl·lules neurogials la microglia té el seu origen en la medul·la òssia i és en la vida fetal quan es dirigeix cap a l'SN (Kiernan, 2000; Snell, 2003).

c) L'epèndima o cèl·lules ependimàries

Són cèl·lules epitelials de morfologia cilíndrica a cuboïdal que revesteixen les cavitats de l'encèfal (*ventricles*) i el conducte central de la medul·la espinal. Posseeixen microvellositats i cilis. Els cilis són mòbils i contribueixen a generar el moviment del líquid cefaloraquidi. Es poden dividir en tres grups: els *ependimòcits*, que revesteixen els ventricles de l'encèfal i el conducte central de la medul·la espinal, i estan en contacte amb el líquid cefaloraquidi; els *tanícits*, que revesteixen el tercer ventricle per damunt de l'hipotàlam; i les *cèl·lules epitelials coroides* que cobreixen la superfície dels plexos coroides (Kiernan, 2000; Snell, 2003).

d) Oligodendròcits

Els oligodendròcits, terme introduït per Rio Hortega l'any 1928, són cèl·lules neurogials en les quals per tècniques d'impregnació metàl·lica es marquen clarament molts processos cel·lulars. Són les cèl·lules predominants de la substància blanca, però també estan a la substància grisa. En la substància blanca aquestes cèl·lules es coneixen com a *oligodendròcits interfasciculars*, ja que són responsables de la producció i manteniment de les beines de mielina de les fibres nervioses de l'SNC. En la substància grisa embolcallen les cèl·lules nervioses, donen suport neuronal i reben el nom d'*oligodendròcits satèl·lits* (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

Els oligodendròcits es caracteritzen per la seva morfologia: cos cel·lular petit, nuclis petits i esfèrics amb cromatina densa, citoplasma amb elevada densitat electrònica i alt contingut de reticle endoplasmàtic i poliribosomes, absència de filaments intermedis i presència d'un gran nombre de microtúbuls llargs en els seus processos (Snell, 2003).

Com ja s'ha comentat prèviament, els oligodendròcits interfasciculars formen les beines de mielina. Aquestes cèl·lules es presenten en files entre els axons

Introducció

mielínics i són els seus processos citoplasmàtics els que formen les beines. Un oligodendròcit conté diversos processos citoplasmàtics, cadascun dels quals contacta i embolcalla repetidament un axó (figura 3). En un mateix axó coexisteixen beines de mielina adjacents de diferents oligodendròcits. Per una altra banda, el nombre de processos citoplasmàtics que formen les beines de mielina a partir d'un sol oligodendròcit varia segons l'àrea de l'SNC.

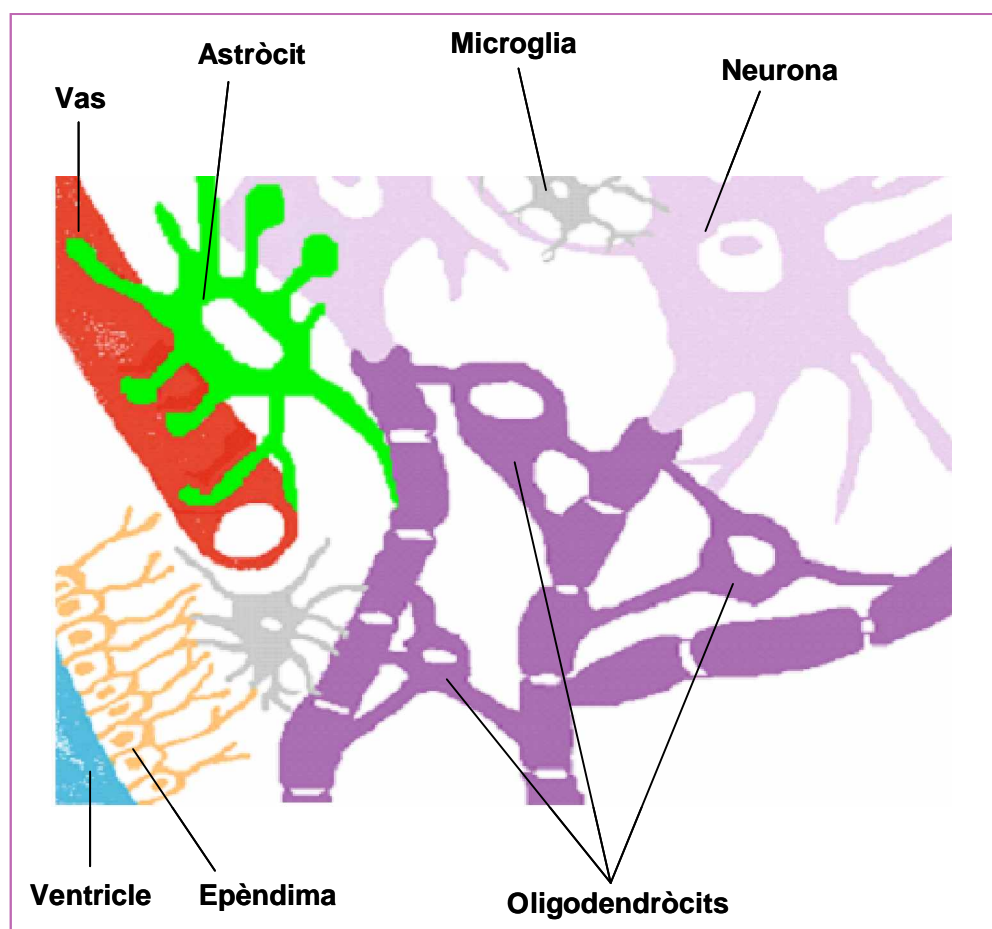


Figura 3. Tipus cel·lulars de l'SNC. L'SNC es compon de neurones i cèl·lules glials. Les neurones presenten una íntima associació amb els oligodendròcits, astròcits i la microglia. Els oligodendròcits recobreixen els axons de les neurones i formen la beina de mielina. Els astròcits estan en íntima associació amb els vasos sanguinis. Les cèl·lules de l'epèndima revesteixen els ventricles (Adaptada de *Hole's Essentials of Human Anatomy and Physiology*, Shier/Butler/Lewis, 7a edició, McGraw Hill).

1.4. MIELINA

La mielina és el principal component de la substància blanca en l'SNC. Es tracta d'una estructura espiral constituïda per extensions de membrana citoplasmàtica de les cèl·lules glials mielinitzants, els *oligodendròcits*. Aquesta estructura es coneix com a *beina de mielina* i observada en talls transversals al microscopi electrònic presenta una estructura periòdica formada per línies concèntriques denses alternades amb línies concèntriques clares. L'aposió de les superfícies citoplasmàtiques de les prolongacions dels oligodendròcits formen les línies denses. La fusió de les parts extracel·lulars de les membranes dels oligodendròcits generen les línies clares. Cada beina de mielina té una longitud aproximada de 150-200 µm, té una elevada resistència a la pèrdua de corrent i una elevada capacítància. La beina de mielina és discontinua, ja que s'interromp en intervals regulars formant els nòduls de Ranvier. La beina de mielina i els nòduls de Ranvier són importants en la velocitat i el tipus de conducció sinàptica elèctrica dels axons (figura 4). La mielina és una estructura poc hidratada (40% aigua) en comparació amb la substància grisa i està constituïda per un 70% de lípids i un 30% de proteïnes, fet que la fa peculiar respecte les altres membranes cel·lulars que presenten generalment una relació lípid-proteïna inversa. El seu gruix, el seu baix contingut en aigua i la seva riquesa en lípids facilita la ràpida transmissió sinàptica dels senyals entre neurones (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

1.4.1. Composició de la mielina

La mielina té dos constituents específics: els glicolípid i les proteïnes que són sintetitzades pels oligodendròcits.

1.4.1.1. Lípids de la mielina

La composició lipídica de la mielina és la mateixa que hi ha en altres membranes cel·lulars, però amb una proporció molar diferent. Aquests lípids són el colesterol, els fosfolípids i els glicolípid, i es presenten en la mielina amb una proporció molar de 4:3:2 a 4:4:2; i és el colesterol el lípid majoritari. En la mielina normal no hi ha èsters de colesterol. La mielina es caracteritza per la seva riquesa en glicoesfingolípid, particularment galactocerebròsids com les galactosilceramides (GalC) i sulfatides com les sulfogalactosilceramides. GalC representa el 20% dels lípids de la mielina

Introducció

madura. En la mielina també trobem galactolípid menors com són els èsters grassos de cerebròsids i els galactocerebròsids que contenen àcid siàlic com el gangliòsid GM1 i el GM4 (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

1.4.1.2. Proteïnes de la mielina

Les proteïnes de la mielina comprenen el 30% dels pes de la mielina. El 80% del total proteic està compost per dues proteïnes de baix pes molecular: l'MBP (de l'anglès, *myelin basic protein*) i la isoforma DM20 de la PLP (de l'anglès, *proteolipid protein*).

A continuació es fa una breu descripció de les proteïnes més rellevants en la mielina:

MBP (de l'anglès, myelin basic protein)

És una família proteica que constitueix el 30% de les proteïnes de la mielina. En humans el gen de l'MBP està compost per 7 exons distribuïts al llarg de 45 kb en la regió cromosòmica 18q22-qter (Saxe et al., 1985; Sparkes et al., 1987; Kamholz et al., 1988). Per mecanismes d'empalmament (de l'anglès, *splicing*) alternatiu es generen 4 isoformes majoritàries d'un pes molecular de 21.5, 20.2, 18.5 i 17.2 kDa en humans. El gen de l'MBP forma part d'una llarga unitat de transcripció que genera els diferents transcrits d'MBP i que es coneix amb el nom de *gen Golli-MBP*. El gen Golli-MBP està format per 10 exons, 7 dels quals constitueixen el gen propi de l'MBP i s'estén al llarg de 179 kb en humans (Pribyl et al., 1993). S'ha vist en ratolins mutats parcialment per l'MBP que aquesta proteïna té un paper important en la compactació de la mielina (Privat et al., 1979; Roach et al., 1985). En ratolins *shiverer*, on s'elimina una llarga porció del gen de l'MBP, es veu una menor compactació de la mielina en l'SNC (Readhead et al., 1990). En concordança amb els resultats, en ratolins també s'ha vist que rates *Long Evans* amb una mutació en el gen MBP que provoca una transcripció aberrant del gen presenten una pèrdua de la mielina compacta de l'SNC (Carre et al., 2002).

PLP/ DM20 (de l'anglès, proteolipid proteins)

Constitueixen el 50% de les proteïnes de la mielina. El gen PLP està format per 7 exons, té una longitud de 15 kb i està en el cromosoma Xq22 en humans (Willard et al., 1985; Morello et al., 1986). Aquest gen, per mecanismes d'empalmament

alternatiu, codifica dues isoformes conegudes com a *PLP* i *DM20*. *PLP* conté els 7 exons, mentre que *DM20* conté una deleció de 35 aminoàcids en la part 5' de l'exó 3. S'ha vist que la proteïna *PLP* humana és 100% homòloga a la proteïna *PLP* murina (Diehl et al., 1986; Macklin et al., 1986). Quan s'anul·la l'expressió de *PLP* i *DM20*, els oligodendròcits mantenen la seva capacitat de mielinitzar i compactar les beines de mielina, però a nivell estructural s'observa que les línies intraperiòdiques de mielina es fusionen i afecten així la seva estabilitat física. Aquest fet suggereix que la *PLP* en la mielina forma una membrana molt estable un cop la compactació ha tingut lloc (Bögler et al., 1990; Klugmann et al., 1997). La patologia principal dels ratolins genoanul·lats per *PLP* és una degeneració dels axons mielinitzats (Griffiths et al., 1998).

CNP (de l'anglès, *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*)

Representa el 4% de les proteïnes de mielina. En humans el gen *CNP* està format per 4 exons distribuïts al llarg de 7 kb en el cromosoma 17q21. Per mecanismes d'empalmament alternatiu es generen 2 isoformes *CNP1* i *CNP2*, amb un pes molecular de 48 i 46 kDa, respectivament (O'Neill et al., 1997). La proteïna *CNP* no es localitza exclusivament en la mielina, sinó que també està en les cèl·lules fotoreceptores de la retina (Vogel et al., 1988). Aquesta proteïna es localitza en el citoplasma axonal no compactat de l'oligodendroglia i en els llaços (de l'anglès, *loops*) paranodals (Trapp et al., 1989). En ratolins transgènics la sobreexpressió de *CNP* pertorba la formació de la mielina i crea prolongacions aberrants de la membrana dels oligodendròcits (Gravel et al., 1996). Per una altra banda, els ratolins genoanul·lats per *CNP* sembla que mielinitzen normalment, però presenten protuberàncies axonals i un procés de degeneració que els causa la mort prematura a l'etapa adulta (Lappe-Siefke et al., 2003).

MAG (de l'anglès, *myelin associated glycoprotein*)

Representa un 1% de les proteïnes de mielina. El gen *MAG* s'estén al llarg de 16 kb pel cromosoma 19 en humans. Està format per 13 exons i per empalmament alternatiu es generen 2 isoformes: *L-MAG* (*large-MAG*) i *S-MAG* (*small-MAG*). Aquestes dues proteïnes corresponen a polipèptids de 72 i 67 kDa, respectivament. *L-MAG* està implicat en l'activació de la proteïna tirosina quinasa *Fyn* i suggereix una

Introducció

implicació de la cascada de fosforilació de les tirosines en la mielogènesi. S'ha vist que ratolins deficients en Fyn presenten alteracions de la mielinització i que la diferenciació morfològica dels oligodendròcits depèn de l'activació tirosina quinasa de Fyn (Urenjak et al., 1992; Osterhout et al., 1999).

Entrant més en detall de la funció de MAG, s'ha vist que els ratolins deficients en MAG presenten retards en la compactació i un major nombre de beines de mielina que embolcallen els axons. Aquest fet suggereix que MAG té un paper d'ajuda als oligodendròcits perquè distingeixin axons mielinitzats dels no mielinitzats en l'SNC (Li et al., 1994; Montag et al., 1994). A més, s'ha vist que els ratolins deficients per l'L-MAG però amb S-MAG intacte presenten les mateixes alteracions que els animals deficients per MAG, per contra la mielina del sistema nerviós perifèric (SNP) es manté normal. Aquestes dades indiquen que l'L-MAG té un paper crític en l'SNC, mentre que l'S-MAG estaria directament implicada en la mielina de l'SNP (Fruttiger et al., 1995; Carenini et al., 1997; Fujita et al., 1998). Estudis in vitro de cèl·lules de Schwann transfectades correlacionen la sobreexpressió de MAG amb una hipermielinització i, contràriament, una baixa expressió de MAG amb una hipomielinització (Meyer-Franke et al., 1994; Filbin et al., 1996). Una altra funció atribuïda a MAG és la d'inhibir el creixement axonal en l'SNC després d'una lesió, i permet així la reparació del dany (Filbin et al., 1996; Qiu et al., 2000). Recentment s'ha vist que MAG pot ser proteolitzada en el seu domini transmembrana, i forma un producte derivat soluble (*dMAG*). *dMAG* s'ha implicat en el procés de desmielinització a causa que la seva formació es veu augmentada en pacients amb esclerosi múltiple (Moller et al., 1996).

MOG (de l'anglès, myelin-oligodendrocyte glycoprotein)

És una de les proteïnes minoritàries de la mielina que només està present en mamífers (Birling et al., 1993). En humans, el gen MOG es localitza en el complex major d'histocompatibilitat I (MHC I) en el cromosoma 6p21.3-p22. Aquest gen està format per 8 exons, els quals per mecanismes d'empalmament alternatiu generen 6 transcrits diferents (Pham-Dinh et al., 1995). MOG està en la membrana plasmàtica de les prolongacions dels oligodendròcits i en la lamel·la més externa de la beina de mielina (Brunner et al., 1989). També és considerat un marcador d'oligodendròcits madurs a causa que la seva presència correlaciona amb els últims estadis de

maduració d'aquestes cèl·lules gials (Solly et al., 1996). Malgrat que la seva funció no es coneix del tot, la seva localització en la superfície cel·lular la fan accessible a un atac autoimmune. De fet, la immunització amb aquesta proteïna en l'experimentació animal causa una recaiguda-remissió d'una forma d'encefalomielitis al·lèrgica experimental (EAE), malaltia que presenta similituds clíniques amb l'esclerosi múltiple (Iglesias et al., 2001). Recentment, es considera MOG com un important autoantigen de l'esclerosi múltiple (Berger et al., 2003).

MOBP (de l'anglès, myelin-associated oligodendrocyte basic protein)

És una proteïna bàsica de mielina. El gen MOBP es localitza en el cromosoma 3p22 en humans (Holz et al., 1997). Hi ha 3 isoformes generades per empalmament alternatiu que corresponen a polipèptids de 8.2, 9.7 i 11.7 kDa. Es localitzen en la línia densa de la mielina on sembla que juguen un paper en la compactació de la mielina de forma similar a l'MBP. Tal com es detalla en l'apartat 1.3.3., quan el procés de mielinització s'inicia, l'RNAm de MOBP a l'igual que succeeix amb l'RNAm d'MBP, entre d'altres, és traslladat del cos cel·lular cap a les prolongacions dels oligodendròcits (Montague et al., 1997).

ALTRES PROTEÏNES

Destaquen proteïnes com l'OSP (de l'anglès, *oligodendrocyte-specific protein*), membres de la família de la tetraspanina, Cx32, OMgp (de l'anglès, *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*), MOSP (de l'anglès, *myelin/oligodendrocyte specific protein*), antigen RIP i les proteïnes NI-35/250, entre d'altres.

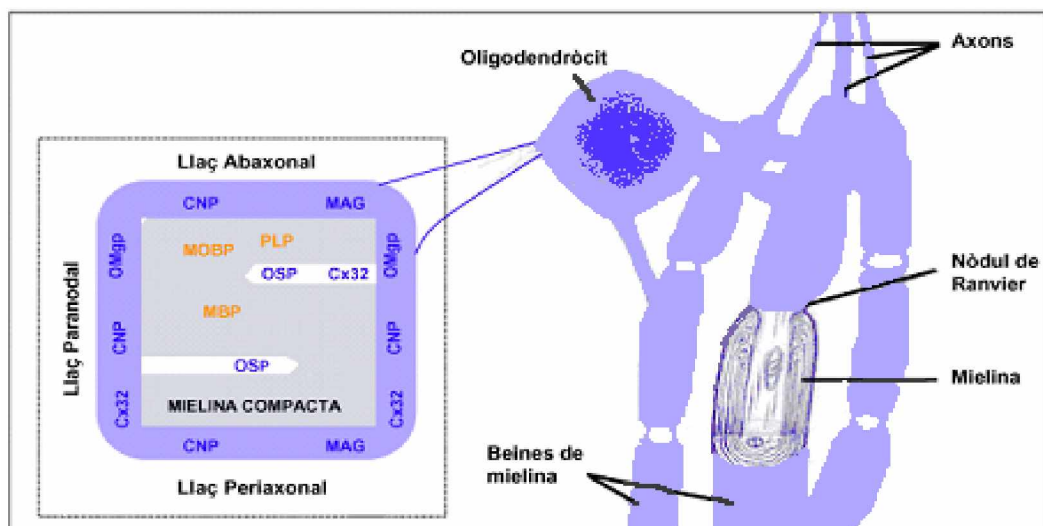


Figura 4. Esquema d'un oligodendrocit mielinitzant tres axons neuronals i la distribució de les proteïnes de la mielina en els seus corresponents diferents dominis en la membrana d'un oligodendrocit. A destacar els dominis de la mielina que són: mielina compacta, llaços periaxonals, abaxonals i paranodals (Modificada de Kramer et al., 2001).

1.4.2. Origen i maduració del llinatge oligodendroglial

Les neurones i altres cèl·lules de l'SN s'originen a partir de l'ectoderm dorsal de l'embrió temprà. Aquest ectoderm s'engrandeix i forma la placa neural. A mesura que avança la gestació, els plecs neurals es fusionen formant el tub neural. L'extrem rostral del tub neural origina l'encèfal i el cabal forma la medul·la espinal.

Cap a la quarta setmana del desenvolupament embrionari es formen en el tub neural les primeres poblacions cel·lulars, *els neuroblasts*, els quals són precursors de neurones.

Cap a la dinovena setmana de gestació es comencen a originar els precursors de la neuroglia, *els glioblasts*. D'aquests últims, els precursors d'oligodendrocits s'originen en les regions ventrals del tub neural, i en la zona ventricular i subventricular. Un cop formats aquests oligodendrocits precursors migren per l'SNC abans que es diferenciïn en oligodendrocits mielinitzants. Aquest procés de migració és massiu i de llarg recorregut, per tal de colonitzar específicament diferents territoris del cervell i està regulat pels factors de transcripció Olig1 i Olig2. Un cop finalitzen la seva migració es col·loquen en els tractes de fibres que seran substància blanca, perden

part de la seva mobilitat, adquireixen el marcador O4 i es transformen en preoligodendròcits.

Els preoligodendròcits es transformen en oligodendròcits immadurs, cèl·lules que en el cas de rates es caracteritzen per la presència del marcador GalC i la pèrdua d'expressió dels antigens GD3 i A2B5. En rates, la maduració en oligodendròcits madurs no mielinitzants té lloc quan expressen de forma successiva en el temps diferents proteïnes de la mielina: CNP, MBP, MAG i PLP, respectivament. Finalment, l'expressió de la proteïna MOG correlaciona amb l'últim estadi de diferenciació en oligodendròcits madurs mielinitzants (figura 5).

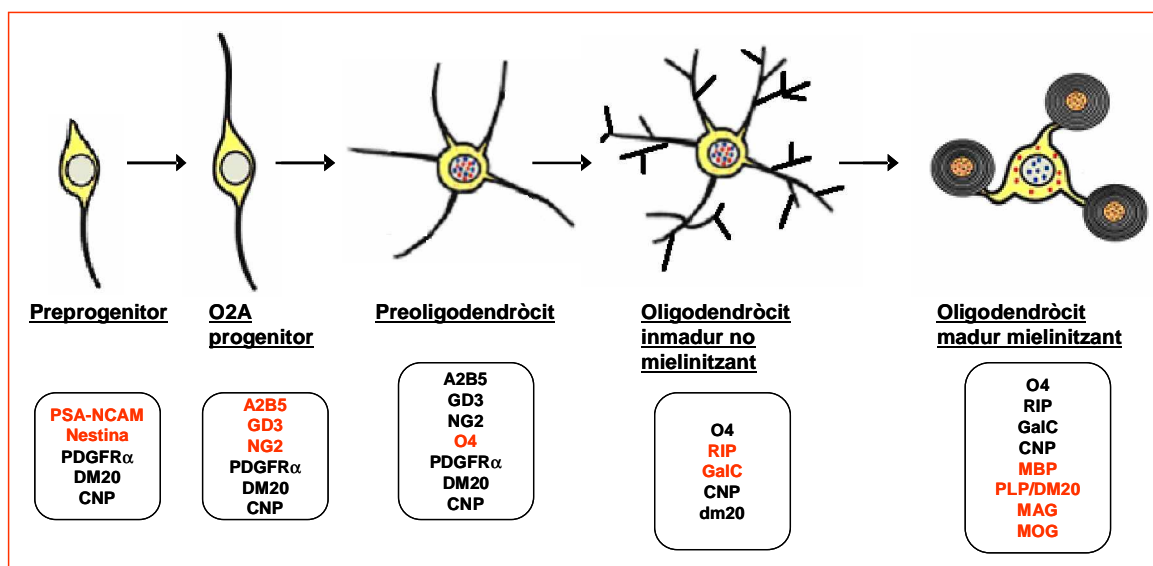


Figura 5. Representació gràfica del procés de maduració del llinatge oligodendroglial. Es pot apreciar tant l'evolució morfològica com antigènica des de l'etapa precursora de progenitor d'oligodendròcits fins a l'etapa última d'oligodendròcits madurs amb capacitat mielinitzant. En vermell es destaquen els marcadors antigènics específics de cadascuna de les etapes de maduració dels oligodendròcits (Adaptada de Baumann and Pham-Dinh, 2001).

1.4.3. Marcadors oligodendroglials

El procés de mielinització implica una successió d'etapes de maduració del llinatge cel·lular oligodendroglial que s'acompanyen de canvis coordinats en l'expressió d'antígens cel·lulars (Hardy et al., 1993; Pfeiffer et al., 1993). És a dir, el procés de diferenciació o de maduració dels oligodendròcits implica la pèrdua de determinats antígens intracel·lulars o de superfície i l'adquisició d'uns altres antígens nous.

Introducció

1.4.3.1. Marcadors somàtics

Alguns d'aquests antígens són marcadors exclusius de determinades fases del llinatge oligodendroglial tal com es detalla a continuació:

Nestina

És una proteïna que distingeix específicament les cèl·lules mare neuroepiteliales en rates (Lendahl et al., 1990). Defineix una sisena classe de filaments intermedis que estan molt associats als neurofilaments. Aquesta proteïna també és expressada per precursors glials com la glia radial i en el cerebel per les fibres immadures de Bergmann (Hockfield et al., 1985; Lendahl et al., 1990). Estudis en cultius cel·lulars d'oligodendròcits han detectat elevada expressió d'aquesta proteïna en oligodendròcits progenitors i una menor expressió en oligodendròcits diferenciats (Gallo et al., 1995).

PLP (de l'anglès, proteolipid protein)

És un marcador de maduració de les cèl·lules glials mielinitzants de l'SNC i SNP. La isoforma DM-20 és detectada per RT-PCR i per hibridació *in situ* durant les primeres etapes de desenvolupament dels SNC, abans del pic màxim de mielinització (Ikenaka et al., 1992; Timsit et al., 1992; Timsit et al., 1995; Peyron et al., 1997).

PDGFR- α (de l'anglès, platelet-derived growth factor α -receptor)

Els seus transcrits es detecten de la mateixa manera que la isoforma DM-20 en estadis primerencs de maduració de les cèl·lules glials mielinitzadores (Richardson et al., 2000; Spassky et al., 2000).

PSA-NCAM

És la forma polisialitada embriònica de la molècula d'adhesió cel·lular neural (NCAM). Sense el gangliòsid GD3, PSA-NCAM defineix l'estadi precursor dels oligodendròcits (Hardy et al., 1991; Grinspan et al., 1995).

GD3

Estudis *in vitro* revelen que aquest gangliòsid s'expressa en oligodendròcits precursors i no s'expressa quan les cèl·lules maduren (Hardy et al., 1991). *In vivo*,

però, també és expressada per altres cèl·lules glials com les cèl·lules neuroectodermals immadures, subpopulacions de neurones i astròcits (Ellison et al., 1995; Wolswijk et al., 2000); per tant, s'ha de tenir molta cura a l'hora d'extrapol·lar resultats obtinguts *in vitro* amb els obtinguts *in vivo*.

A2B5

L'anticòs monoclonal anti-A2B5 reconeix alguns gangliòsids (Fredman et al., 1984). *In vivo* s'expressa en neurones i cèl·lules glials. S'utilitza en estudis de cultius d'oligodendròcits per seguir el procés de maduració dels oligodendròcits progenitors.

NG2

És un proteoglican condroitin sulfat integral de membrana de rata. En l'SNC madur les cèl·lules expressen NG2, juntament amb PDGFR- α (Nishiyama et al., 1996; Reynolds et al., 1997; Nishiyama et al., 1999). Aquestes cèl·lules presenten en els seus processos cel·lulars llargues arboritzacions i s'ha vist que no expressen antígens específics d'oligodendròcits madurs, ni d'astròcits, ni de microglia, ni de neurones, suggerint que es tracta d'una nova població de cèl·lules glials que, com a conseqüència de diferents estímuls com la inflamació i la desmielinització proliferen, i canvien de morfologia (Nishiyama et al., 1999; Dwason et al., 2000).

O4

L'anticòs monoclonal anti-O4 és un marcador específic de preoligodendròcits (Sommer et al., 1981).

Transferrina

És una proteïna mobilitzadora de ferro que s'expressa en els oligodendròcits i en les cèl·lules epitelials del plexe coroide (Bloch et al., 1985). Les cèl·lules neurals depenen d'aquesta producció de transferrina un cop s'ha format la barrera hematoencefàlica (Espinosa de los Monteros et al., 1989).

APC (de l'anglès, *adenomatous polyposis coli*)

És un gen supressor tumoral que es va identificar per primera vegada en càncer de còlon (Grodén et al., 1991). Estudis d'hibridació *in situ* en cervell adult de rata han

Introducció

identificat elevada expressió d'aquest gen en els oligodendròcits de la substància blanca i grisa (Bhat et al., 1994, Bhat et al., 1996). En humans s'ha vist que APC s'expressa en els oligodendròcits (Chambers and Perrone-Bizzozero, 2004), però també s'ha vist expressió d'aquesta proteïna en astròcits (Leroy et al., 2001).

Carnosina

És un dipèptid que està present en l'SN de diferents vertebrats. Estudis immunohistoquímics en cultius cel·lulars glials de rata mostren presència de carnosina en els oligodendròcits madurs (De Marchis et al., 1997). *In vitro* i d'acord amb els resultats immunohistoquímics anteriors es va veure que la biosíntesi d'aquest dipèptid està confinat als oligodendròcits (Hoffmann et al., 1996).

1.4.3.2. Marcadors de mielina

A part d'aquests marcadors antigènics que caracteritzen l'estat de maduració d'oligodendròcits, aquestes cèl·lules també presenten diversos marcadors de mielina a causa que la proteïna que es detecta està tant en la membrana de mielina que s'ha generat com en el seu cos cel·lular. Alguns d'aquests marcadors de mielina són proteïnes estructurals de la mielina, com és el cas de l'MBP, CNP, PLP/DM-20, MAG i MOG, i que estan caracteritzades i comentades en l'apartat 1.4.1.2. La resta de marcadors de mielina es detallen a continuació:

NOGO A

Nogo és una proteïna associada a la mielina que inhibeix el creixement de les neurites i dels terminals nerviosos (Chen et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Es tracta d'una proteïna important en la regulació de la migració neuronal i la plasticitat, i que està altament expressada durant el neurodesenvolupament de l'SNC (Josephson et al., 2001). Durant el desenvolupament embrionari de rata i en rata adulta, així com en humans, s'ha vist que Nogo està altament expressat en els oligodendròcits del teixits mielinitzats de l'SNC (Josephson et al., 2002; Huber et al., 2002). El gen Nogo, per mecanismes d'empalmament alternatiu, codifica per 3 variants: Nogo A, Nogo B i Nogo C (Skaper et al., 2001). Les tres variants presenten activitat inhibidora neuronal (GrandPre et al., 2000).

RIP

RIP es va identificar en utilitzar un anticòs per identificar les cèl·lules oligodendroglials del bulb olfactori de rata (Friedman et al., 1989). Aquest marcador reconeix un epítoc citosòlic desconegut dels oligodendròcits i marca tant els processos oligodendroglials com la mielina (Friedman et al., 1989; Berger i Frotscher, 1994).

CAII

El gen anhidrasa carbònica II (CAII) codifica per un isoenzim que es localitza en els oligodendròcits de l'SN. Es tracta d'un marcador de tots els estadis del llinatge oligodendrogliat i dels oligodendròcits adults (Gandhour et al., 1980). En el vel medul·lar anterior de rata els oligodendròcits RIP⁺ CAII⁺ donen suport a moltes beines de mielina de diàmetre axonal petit, mentre que els oligodendròcits RIP⁺ CAII⁻ donen suport a menys beines de mielina de diàmetre axonal gran (Butt et al., 1995). No obstant això, s'ha vist que CAII s'expressa també en la microglia (Wolswijk, 1995).

1.4.4. Transport d'RNA cap als processos oligodendroglials

Fa 40 anys que es van començar a publicar estudis de localització de l'RNA en els organismes eucariotes (Bodian et al., 1965; Koenig et al., 1965 a, b). A final dels anys 80 i inici dels 90 es va veure que la maquinària de síntesi proteica i certs RNA individuals eren traslladats a llocs distants del nucli i regulaven així espaciotemporalment la seva expressió gènica. Aquest transport s'ha vist que té lloc en diferents tipus cel·lulars com els oòcits de *Xenopus*, les neurones i les cèl·lules glials. Actualment, està documentat que aquest fenomen també té lloc en plantes, vertebrats, invertebrats i organismes unicel·lulars, fet que suggereix que es tracta d'un antic mecanisme cel·lular.

Aquest transport actiu de l'RNA implica el reconeixement d'elements coneguts com a *cis-acting RNA elements* per part de factors d'unió d'RNA *trans-acting*. Els *cis-acting RNA elements* són segments d'RNA que contenen una seqüència genètica específica de transport reconegut pels anomenats *factors d'unió*. Aquesta interacció resulta en la formació d'un complex ribonucleoproteic (RNP) que és transportat amb

Introducció

l'ajuda de proteïnes motores a través dels filaments del citoesquelet. Quan arriben al seu destí els transcrits són alliberats, ancorats i traduïts.

Com ja s'ha comentat en apartats anteriors, els oligodendròcits són cèl·lules gials amb llargues prolongacions que formen les beines de mielina al voltant dels axons. Hi ha alguns RNAm codificadors de proteïnes de mielina, el més conegut dels quals és l'RNAm de l'MBP, que són transportats en forma de grànuls d'RNA a través dels microtúbuls cap a les terminacions dels processos oligodendrogials on es forma la mielina (Barbarese et al., 1999; Boccaccio et al., 2000). En el cas de l'RNAm d'MBP el transport és mediat per una seqüència *cis-acting* d'11 nucleòtids (GCCAAGGAGCC), conegut com a element de resposta d'hnRNP A2 (A2RE). Aquesta seqüència A2RE és reconeguda i unida per una ribonucleoproteïna *trans-acting* hnRNP A2. El complex format roman associat mentre dura el transport (Carson et al., 1998; Hoek et al., 1998). Originàriament, A2RE es va identificar com una seqüència de 21 nucleòtids en l'RNAm d'MBP (Hoek et al., 1998). L'anàlisi mutacional dels 21 nucleòtids d'A2RE va mostrar que només els primers 11 nucleòtids eren necessaris per a la unió i transport amb hnRNP A2 (Munro et al., 1999). Hi ha seqüències similars als 11 nucleòtids A2RE que medien el transport de diferents RNA que també es localitzen en els processos distals o en el compartiment de mielina dels oligodendròcits. Entre aquests RNAm destaquen: RNAm d'MOBP isoforma 81A (Holz et al., 1996), RNAm de CAII (Ghandour i Skoff, 1991; Tansey et al., 1996), RNAm de tau (LoPresti et al., 1995) i l'RNAm d'APP (García-Ladona et al., 1997). La ribonucleoproteïna hnRNP A2 s'expressa en molts tipus cel·lulars a part dels oligodendròcits i es pensa que el mecanisme de transport a través de la via A2RE/hnRNP A2 pot tenir lloc en altres sistemes a part de l'SN.

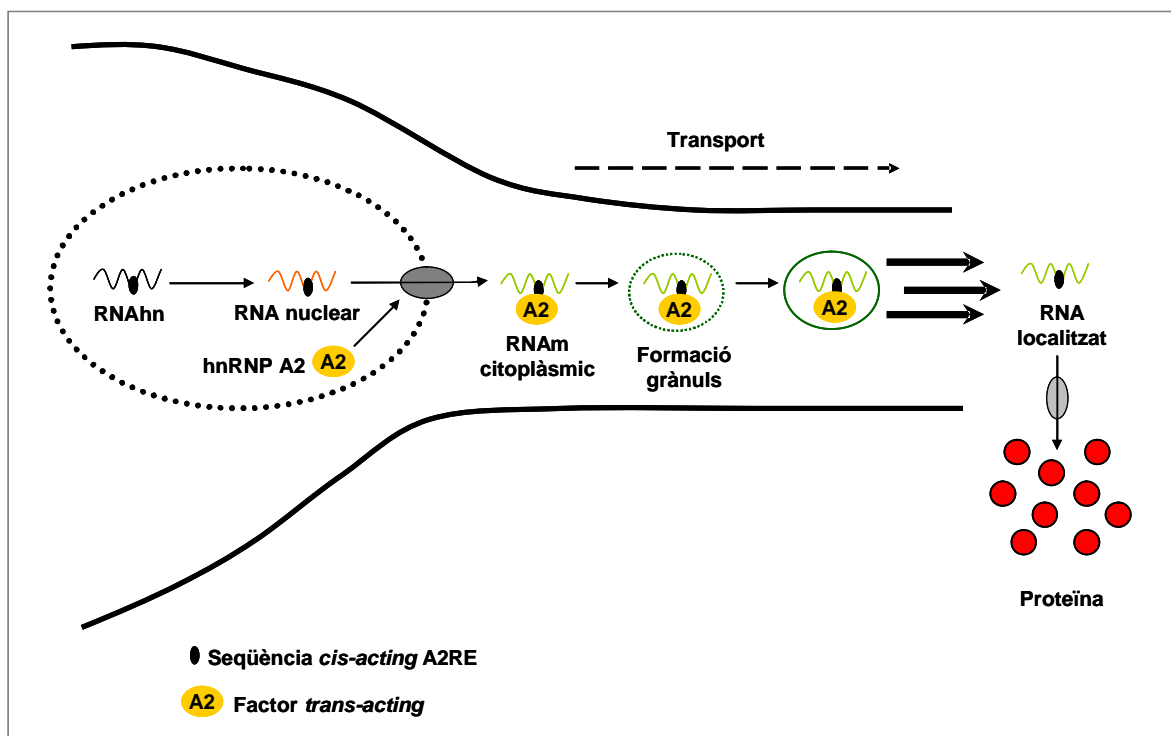


Figura 6. Representació gràfica del model de transport dels RNA amb seqüències A2RE. Els RNA amb seqüències A2RE (punts negres) s'uneixen a la ribonucleoproteïna nuclear heterogènia A2 (hnRNP A2). Els complexos d'unió formats són reclutats en forma de grànuls i transportats a través dels microtúbuls. Aquests grànuls contenen múltiples còpies dels complexos RNA-proteïna. Un cop arriben al seu destí final, l'RNA és ancorat i traduït. Cadascuna de les etapes d'aquest procés, incloent la degradació de l'RNA, és un potencial punt de control posttranscripcional d'expressió gènica (Adaptada de Smith et al., 2004).

1.5. ALTERACIONS DE LA SUBSTÀNCIA GRISA EN L'ESQUIZOFRÈNIA

Ja fa més de vint anys que es va publicar el primer estudi de neuroimatge sobre alteracions anatòmiques cerebrals que estan associades a l'esquizofrènia (Johnstone et al., 1978). Des de llavors, dos trets particulars han estat ben replicats per altres autors: l'eixamplament dels ventricles laterals i una reducció del 3-4% del volum de la substància grisa cortical (Zipursky et al., 1992; Lawrie et al., 1998).

La ressonància magnètica (MRI) (de l'anglès, *magnetic resonance image*) és una eina no invasiva que permet estudiar la morfologia cerebral *in vivo* i concretament té la capacitat de segmentar el parènquima en substància grisa i substància blanca, i permet una avaluació dels principals compartiments relacionats amb la citoarquitectura i connectivitat. Per tant, aquesta eina d'imatge ha estat i és molt útil per analitzar alteracions estructurals del cervell dels malalts esquizofrènics.

Molts dels estudis d'MRI han recolzat l'existència d'alteracions en el volum de substància grisa cortical dels pacients esquizofrènics (Zipursky et al., 1992; Gur et al., 1999; Hirayasu et al., 2001). Lauriello i col·laboradors van veure que aquest dèficit de la substància grisa cortical té lloc per igual en homes i dones afectades per la malaltia (Lauriello et al., 1997). D'aquests estudis els resultats més consensuats fan referència a una reducció específica de la substància grisa en els lòbuls frontal i temporal (Sullivan et al., 1998; Shenton et al., 2001). Aquestes alteracions volumètriques regionals estan associades a la psicopatologia com és la símptomatologia positiva o negativa (Gur et al., 2000; Sanfilipo et al., 2000) i també a dèficits cognitius com la funció executiva, atenció i memòria. Els lòbuls frontal i temporal són regions clau implicades en la cognició social, aspecte deficitari en l'esquizofrènia. S'ha postulat molt sobre el possible paper que els antipsicòtics poden tenir en aquest dèficit de volum (Harrison, 1999). Resseguint aquesta línia s'han realitzat diversos estudis, tant en models animals com humans, i alguns d'aquests estudis suggereixen un possible efecte compensatori d'augment de volum de substància grisa cortical, a causa de l'acció de certs fàrmacs (De Lisi et al., 1997; Keshavan et al., 1998; Selemon et al., 1999; Lieberman et al., 2001). Recentment, Molina i col·laboradors (Molina et al., 2005) han vist que el tractament amb clozapina i risperidona, dos antipsicòtics considerats típics, va resultar en un augment de volum de la substància grisa en els lòbuls frontal, parietal i occipital dels pacients

esquizofrèncics respecte els controls. Aquest increment de la substància grisa té lloc en els dos grups de pacients tractats: neurolèptics *naïf* i resistents crònics.

Hi ha múltiples estudis funcionals realitzats en pacients esquizofrèncics. D'entre tots aquests cal destacar l'estudi realitzat per Siegel i col·laboradors mitjançant la tecnologia PET (de l'anglès, *positron emission tomography*). Aquest estudi va mostrar que els pacients esquizofrèncics presentaven un menor metabolisme de la glucosa en la regió temporal (*gyrus inferior temporal*) respecte individus control (Siegel et al., 1995).

A nivell genètic s'ha vist que hi ha al·lels específics o polimorfismes de determinats gens que contribueixen a un major risc genètic, a causa dels seus efectes en l'estructura i funció de diferents àrees cerebrals. Així hi ha haplotips dels gens DISC1 i TRAX que estan associats amb trets quantitius endofenotípics de l'esquizofrènia com és una reducció en densitat de la substància grisa en el còrtex prefrontal (Cannon et al., 2005; Hennah et al., 2006). Prasad i col·laboradors han trobat associació entre alteracions volumètriques de la substància grisa del còrtex prefrontal dorsal i la presència de polimorfismes en el gen RGS4 (Prasad et al., 2005). De forma similar, entre diversos polimorfismes detectats pel gen de la BDNF s'ha vist que hi ha una forta associació entre el polimorfisme 11757 G/C amb alteracions del volum frontal de la substància grisa dels pacients (Agartz et al., 2006). Per finalitzar, s'ha trobat un nou gen, PCM1, que està fortament associat a alteracions de volum de la substància grisa orbitofrontal (Gurling et al., 2006).

1.6. ALTERACIONS DE LA SUBSTÀNCIA BLANCA EN L'ESQUIZOFRÈNIA

Els fascicles de fibres de substància blanca són la base principal de comunicació entre regions cerebrals. S'ha postulat molt sobre el paper que juguen les alteracions de la substància blanca en la patofisiologia de l'esquizofrènia (Davis et al., 2003). Mentre que actualment es coneixen bé les alteracions de la substància grisa gràcies a les tècniques de neuroimatge, menys se sap sobre les alteracions que hi ha en la substància blanca, concretament sobre els tractes de fibres que interconnecten els lòbuls frontal i temporal, tractes postulats com a alterats en l'esquizofrènia des de fa molt de temps (Wernicke, 1906; Kraepelin, 1919/1971). Gràcies als avenços en les tècniques de neuroimatge dels últims anys s'ha pogut estudiar i avaluar la substància blanca. Malgrat tot, els resultats obtinguts en malalts esquizofrènics han estat inconsistents entre autors a causa, en part, de les diferents metodologies d'anàlisi MRI emprades (Lim and Helpers, 2002; Kubicki et al., 2007).

Recentment, estudis de neuroimatge DWI (de l'anglès, *diffusion weighted imaging*) han trobat disrupcions de la substància blanca que alteren la connectivitat entre hemisferis i la lateralització funcional del cervell (Mendelsohn et al., 2006). DWI és una tècnica relativament nova que és capaç de mesurar i proporcionar un coeficient de difusió aparent (ADC) de les molècules de l'aigua en el cervell. ADC és un coeficient crític de la integritat de la substància blanca i ens dóna informació sobre la seva microestructura, organització i citoarquitectura.

En la mateixa línia d'investigació, diferents estudis de neuroimatge DTI (de l'anglès, *diffusion tensor imaging*) han mostrat que en els pacients esquizofrènics crònics hi ha una desorganització dels oligodendròcits de la substància blanca en diferents regions cerebrals, incloent les regions corticals frontals (Buschsbaum et al., 1998; Lim et al., 1999; Ardekani et al., 2003; Minami et al., 2003). En dos estudis DTI recents on s'analitzen pacients esquizofrènics a l'inici de la malaltia (amb una mitjana d'edat de 25 anys) no s'observen alteracions en la substància blanca de les regions frontotemporals (Price et al., 2005; Szeszko et al., 2005).

A nivell genètic s'ha confirmat l'associació de certs gens de mielina amb l'esquizofrènia (Davis et al., 2003). L'anàlisi quantitativa per tecnologia d'RT-PCR Quantitativa i per *microarray* mostren que hi ha una menor expressió de l'RNAm de gens de la mielina en les regions corticals prefrontal i temporal dels malalts per

l'esquizofrènia (Hakak et al., 2001; Tkachev et al., 2003; Aston et al., 2004; Dracheva et al., 2005; Haroutunian et al., 2006).

A més, Uranova i col·laboradors per microscòpia electrònica mostren alteracions qualitatives i quantitatives des del punt de vista de l'oligodendroglia en el còrtex prefrontal i el nucli caudat, una major densitat de cossos concèntrics lamel·lars (indicadors de dany en les fibres mielinitzades) en el nucli caudat i, finalment, una menor densitat d'oligodendròcits en la capa IV del còrtex prefrontal en cervells *post mortem* de malalts esquizofrènics (Uranova et al., 2001; Uranova et al., 2004). En un altre estudi, Hof i col·laboradors troben una disminució en nombre i densitat d'oligodendròcits de la capa III de l'àrea de Brodmann 9 i de la substància blanca prefrontal de malalts esquizofrènics (Hof et al., 2003).

1.7. APORTACIONS DE LA GENÈTICA A LA HIPÒTESI QUE LA SUBSTÀNCIA BLANCA ESTÀ ALTERADA EN L'ESQUIZOFRÈNIA

Com ja s'ha comentat a l'inici d'aquest capítol, l'esquizofrènia és una malaltia multifactorial on el component genètic juga un paper molt important.

Hi ha diverses formes d'estudiar el component genètic d'una malaltia. Les aproximacions més emprades són tres:

a) Estudis de lligament

Són eines d'estudi que permeten acotar les regions cromosòmiques lligades a un trastorn. En el cas de l'esquizofrènia s'han identificat diverses regions cromosòmiques entre les quals destaca la regió 6p, a la qual li dediquem un apartat en aquest capítol (1.7.2.).

b) Estudis d'associació

Aquests estudis es basen a comparar les freqüències al·lèliques o genotípiques d'un o més marcadors (haplotips en el segon cas) d'un gen o uns gens candidats. Els gens candidats o *loci* candidat es trien en funció dels resultats obtinguts dels estudis de lligament o per la funció del producte genètic.

Dels estudis d'associació que s'han fet des dels anys 80 s'han identificat diversos gens de susceptibilitat per a l'esquizofrènia que podrien participar en l'etiologia de la malaltia. Aquests gens identificats presenten una funcionalitat molt diversa, i estan implicats tant en el desenvolupament del cervell, en la connectivitat sinàptica com en la neurotransmissió (Berry et al., 2003; Carter, 2006). Però aquí només comentarem els que han aportat resultats positius en relació amb els gens que s'expressen en la mielina (apartat 1.7.1.; vegeu la taula 1).

c) Estudis d'expressió gènica

Són estudis complementaris als estudis de lligament i d'associació on es mesuren l'existència de nivells d'expressió diferencials de gens candidats entre individus afectats per la malaltia d'estudi i individus control. Fins a l'actualitat, els estudis d'expressió gènica realitzats en malalts esquizofrènics s'han centrat en el còrtex prefrontal dels malalts i s'ha vist que hi ha diferències en expressió de gens implicats en diferents vies del cervell, com la regulació de la funció presinàptica, plasticitat sinàptica, via glutamatèrgica

i GABAèrgica, vies metabòliques, mielinització i sistemes de missatgers secundaris d'AMPC i fosfoinositol (Hakak et al., 2000; Mirnics et al., 2000; Middleton et al., 2002; Pongrac et al., 2002, Vawter et al., 2002; Tkachev et al., 2003; Dracheva et al., 2004; Dracheva et al., 2005). En aquesta tesi només comentarem els estudis en relació amb els gens de la mielina (apartat 1.7.1.; vegeu la taula 2).

1.7.1. Gens de la mielina

Durant els anys 80 i 90 del segle passat es van realitzar molts estudis de lligament i d'associació que han permès identificar variants del tipus *single nucleotide polymorphism* (SNP) associades a esquizofrènia. En la taula 1 destaquem alguns estudis en gens de proteïnes de la mielina en relació amb l'esquizofrènia.

En els estudis descrits en la taula 1 s'ha vist que determinades variants o SNP de gens de la mielina s'associen positivament amb l'esquizofrènia. Actualment, però, hi ha estudis recents que descarten l'associació positiva entre la inserció CAA de Nogo A i la malaltia (Sinibaldi et al., 2004; Gregorio et al., 2005; Xiong et al., 2005; Novak et al., 2006; Meng et al., 2007).

Introducció

Taula 1. SNP de gens de la mielina associats a l'esquizofrènia

Estudi	Mostra	Gen	SNP	Resultat
Novak et al., 2002		Nogo A	Inserció CAA 3'-utr	Associació positiva
Wan et al., 2005	470 Esquizofrènics 470 Controls	MAG	rs720309	Elevada associació amb esquizofrènia
Yang et al., 2005	413 Esquizofrènics (triades de parents)	MAG	rs720308- rs720309	Haplotip associat a esquizofrènia
Liu et al., 2005	532 Esquizofrènics (triades de parents)	MOG	D6S299	Elevat desequilibri de lligament
Zai et al., 2005	111 Esquizofrènics (triades/diades de parents)	MOG	rs2252711 rs2071653	No-desequilibri de lligament
Qin et al., 2005	487 Esquizofrènics parents	PLP1	rs475827	Només associació en homes
Peirce et al., 2006	708 Esquizofrènics 711 Controls	CNP	rs2070106	Associació amb esquizofrènia

MAG= *Myelin associated glycoprotein*; MOG= *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*; PLP1= *Proteolipid protein 1*; CNP= *2', 3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase*.

Durant els processos normals de desenvolupament de l'SN o durant el transcurs d'una malaltia l'expressió de diferents gens del genoma pot trobar-se alterada tant al llarg del temps com entre els individus. Els estudis de quantificació per *microarrays* o per PCR quantitativa realitzats en regions frontals i altres regions corticals de malalts esquizofrènics mostren que hi ha una alteració en els nivells d'expressió de gens implicats en l'estructura i funció dels oligodendròcits juntament amb altres gens d'altres vies funcionals cerebrals. En la taula 2 es descriuen estudis d'expressió gènica on s'ha vist que hi ha gens d'oligodendròcits i de la mielina que estan alterats en els malalts esquizofrènics.

Fins a l'actualitat hi ha més de 30 estudis d'expressió relacionats amb l'esquizofrènia. La majoria d'aquests estudis s'han realitzat en regions del còrtex

prefrontal. Hakak i col·laboradors van ser els primers a descriure que hi ha una menor expressió significativa de 5 gens implicats en la formació i manteniment de la mielina en la regió prefrontal de pacients esquizofrènics en comparació amb individus control. Aquesta expressió alterada dels gens MAG, neuregulina, ErbB3, transferrina i CNP, juntament amb d'altres, va ser confirmada posteriorment també en la regió del còrtex dorsolateral prefrontal (DLPFC) per Copland i col·laboradors (Copland et al., 2002). La comparació per tecnologia *microarray* i per PCR quantitativa de malalts esquizofrènics respecte individus control realitzat per Tkachev i col·laboradors l'any 2003 va mostrar que els canvis en l'expressió de determinats gens de la mielina era comú en ambdues malalties mentals i no exclusiu de l'esquizofrènia. De forma similar, en altres regions corticals s'ha vist que hi ha alguns gens de la mielina que també troben alterada la seva expressió. És el cas dels gens de la MAG, la MAL, la CNP i la PLP (Aston et al., 2005). Recentment, s'ha vist que l'expressió alterada dels gens de la mielina té lloc de forma regional. Així, Katsel i col·laboradors l'any 2005 van trobar que els nivells d'expressió dels gens de la MAG, MAL, CNP, MOG, CLDN11, ErbB3 i sobretot la transferrina estan alterats en diferents regions corticals, sent màxim en el cíngul anterior, cíngul posterior, hipocamp i en la circumvolució temporal mitjana. De forma similar, Dracheva i col·laboradors van trobar reduccions d'expressió en diversos RNAm de mielina com la MAG, CNP, CLDN11, PMP22 i SOX10 de forma regional i específica en l'hipocamp i en el còrtex cingular anterior. No així ho va trobar per a la PLP o MBP (Dracheva et al., 2006).

Introducció

Taula 2. Gens de mielina en estudis d'expressió gènica

Estudi	Mostra	Regió analitzada	Gens de mielina alterats	Gens de mielina no alterats
Hakak et al., 2001	16 Esquizofrèncics crònics 12 Controls	DLPFC (còrtex prefrontal dorsolateral)	MAL CNP MAG Transferrina ErbB3	-
Tkachev et al., 2003	15 Esquizofrèncics 15 Bipolars 15 Controls	PFC (Còrtex prefrontal)	PLP CLDN11 MOG ErbB3 Transferrina menor expressió: OLIG1, OLIG2, SOX10	MBP GALC
Sugai et al., 2004	6 Esquizofrèncics 6 Controls	DLPFC	MBP MOBP MAL	-
Aston et al., 2004	12 Esquizofrèncics 14 Controls	Circumvolució temporal mitjana	MAG PLP ErbB3 MAL Transferrina CNP	-
Dracheva et al., 2006	30 Esquizofrèncics crònics 25 Controls	Hipocamp, cíngul anterior, caudat i putamen	MAG CNP SOX10 CLDN11 PMP22	MBP MOBP
Katsel et al., 2005	13 Esquizofrèncics 13 Controls	PFC, cíngul ant./post., temporal, parietal, occipital, hipocamp, caudat i putamen	QK1 Transferrina MAG MOG ErbB3 CNP CLDN5 CLDN11 PMP22 gelsolina	-

CLDN11 (*claudin 11*), CNP (2', 3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase), ErbB3 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*), GALC (*galactosylceramide*); MAG (*myelin associated glycoprotein*), MAL (*myelin and lymphocyte protein*), MBP (*myelin basic protein*), MOBP (*myelin-associated oligodendrocytic basic protein*), MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), OLIG1 (*oligodendrocyte lineage transcription factor 1*), OLIG2 (*oligodendrocyte lineage transcription factor 2*), PLP (*proteolipid protein 1*), PMP22 (*peripheral myelin protein 22*), QK1 (*quaking homolog, KH domain RNA binding*), SOX10 (*sex determining region Y-box 10*).

1.7.2. Gens en el cromosoma 6p

El braç curt del cromosoma 6 (6p) ha despertat molt d'interès, ja que en la regió 6p21.3 es localitza el locus del sistema HLA (de l'anglès, *human leucocyte antigen*). El primer estudi que va trobar associació entre el sistema HLA i l'esquizofrènia va ser el reportat per Cazzullo i col·laboradors l'any 1974. Des de llavors, la possible existència d'un locus de susceptibilitat per a l'esquizofrènia en 6p en proximitat amb la regió HLA ha estat objecte de múltiples estudis de lligament genètic i no va ser fins a l'any 1995 que es van publicar els primers estudis de lligament associats a la malaltia. Aquests primers estudis estan detallats en la taula 3; alguns d'aquests van resultar negatius (Gurling et al., 1995; Moisés et al., 1995; Mowry et al., 1995; DeLisi et al., 2002).

Taula 3. Estudis de lligament del cromosoma 6p més rellevants associats a l'esquizofrènia

Estudi	Regió cromosòmica	Mostra	Resultat
Straub et al., 1995 Mowry et al., 1995 Gurling et al., 1995 Antonarakis et al., 1995 Maziade et al., 2001 DeLisi et al., 2002	6p24-22	265 famílies d'Irlanda 480 malalts de 21 arbres genealògics multigeneracionals del Quebec 382 parelles de germans malalts	+ ^a - ^b - + + -
Bailer et al., 2000	6p24	5 famílies	+
Lindholm et al., 1999	6p23	31 malalts suecs	+
Schwab et al., 1995 Moisés et al., 1995	6p22	54 famílies	+ -

^aEl signe + fa referència a estudis on s'ha vist una associació positiva de la regió cromosòmica analitzada amb l'esquizofrènia; ^bEl signe - fa referència a estudis on no s'ha trobat associació de la regió cromosòmica analitzada amb la malaltia.

Per tant, hi ha múltiples evidències que suggereixen la localització d'aquest locus de susceptibilitat per a l'esquizofrènia en una àmplia regió d'aproximadament 30 cM del cromosoma 6p, concretament entre els marcadors D6S309 i D6S258. Aquests

Introducció

marcadors delimiten les regions 6p24-21.3 on hi ha centenars de gens, alguns dels quals, tal com es mostra en la figura 7, s'han trobat associats a l'esquizofrènia

Localització	Gen	Estudi
6p23	SCA1	Joo et al., 1999 Wang et al., 1996
6p22.3	DTNBP1	Joo et al., 2006 Tochigi et al., 2006 Fanous et al., 2005 Schwab et al., 2003 Morris et al., 2003 Weickert et al., 2004 Bray et al., 2005
6p22.1	MOG	Liu et al., 2005
6p21.3	GRM4	Ohtsuki et al., 2001
6p21.1-21.3	TNF α	Schwab et al., 2003 Boin et al., 2001
6p21.3	TNXB	Liu et al., 2004 Wei and Hemmings, 2004
6p21.3	NOTCH4	Ivo et al., 2006 Wei and Hemmings, 2000 Fan et al., 2002

Cromosoma 6

Figura 7. Cromosoma 6 i gens associats a l'esquizofrènia. Gens: SCA1, atàxia espinocerebelar tipus 1; DTNBP1, disbindina; GRM4, receptor glutamat metabotrópic; TNF α , factor necròtic tumoral alfa; TNXB, tenascina X; NOTCH4, receptor de la família NOTCH4.

S'ha vist que l'associació del gen TNXB té lloc en població caucàsica i no en població xinesa (Liu et al., 2004; Wei et al., 2004). Per una altra banda, l'anàlisi de variants del gen NOTCH realitzada fins al moment dóna resultats contradictoris (Wei et al., 2000; Fan et al., 2002; Ivor et al., 2006). Recentment, i resseguint l'observada alterada expressió gènica de MOG en pacients esquizofrènics s'ha vist una associació positiva de la MOG amb la malaltia tant a nivell al·lèlic com genotípic i haplotípic (Liu et al., 2005).

Un dels gens més estudiats en els últims anys és DTNBP1 o gen de la disbindina, que codifica per la proteïna disbindina. S'han dut a terme diferents estudis genètics de variants o SNP presents en el gen DTNBP1 molts dels quals han resultat positius per a l'esquizofrènia, però també n'hi ha hagut de negatius en les mateixes ètnies analitzades (Straub et al., 2002; Morris et al., 2003; Schwab et al., 2003; Fanous et al., 2005; Joo et al., 2006; Tochigi et al., 2006; Vilella et al., 2007). Fins a l'actualitat cap de les variants identificades en les regions codificants és funcional. Malgrat tot, s'ha vist que hi ha una menor expressió de l'RNAm de la disbindina en el còrtex dorsolateral prefrontal (DLPFC) dels pacients esquizofrènics en comparació amb els controls (Weickert et al., 2004). Recentment, dos estudis troben associació entre variants del gen i expressió de la proteïna. Weickert i col·laboradors l'any 2004 van trobar associació entre variants en regions 5' i 3'- UTR (de l'anglès, *untranslated regions*) amb alteracions en l'expressió de disbindina en regions corticals del cervell. Paral·lelament, Bray i col·laboradors l'any 2005 van veure que els esquizofrènics portadors d'un haplotip de risc concret presentaven una reducció en l'expressió d'RNAm de disbindina en el còrtex cerebral.

1.7.3. Patologies humanes de mielina

Hi ha diverses patologies humanes causades per alteracions diverses de la mielina. Una de les patologies més característiques és la *leucodistròfia*, que és el resultat de la dismielinització, hipomielinització o la desmielinització. La dismielinització i la hipomielinització es defineixen com la interrupció de la mielinització durant el desenvolupament fetal o la primera infància i són característics de la malaltia de Pelizaeus-Merzbacher. La desmielinització es coneix com el procés de ruptura de la mielina, tal com succeeix en les leucodistròfies metabòliques com la malaltia de Krabbe, entre d'altres.

La majoria de les leucodistròfies es caracteritzen per presentar problemes en la degradació dels lípids que constitueixen la mielina. La malaltia de Krabbe té lloc durant la infantesa i presenta defectes de la galactocerebrosidasa lisosomal, enzim que degrada la GalC en ceramida i galactosa (Suzuki et al., 1971). La degeneració de la mielina i els oligodendròcits es deu a la presència d'un metabòlit tòxic, la *psicosina*, la qual és normalment degradada per aquest enzim lisosomal (Suzuki et

Introducció

al., 1998). Les leucodistròfies que debuten en l'adult presenten un quadre psicòtic similar a l'esquizofrènia.

Altres malalties són les *leucoencefalopaties*, malalties genètiques on la desmielinització és secundària a les alteracions vasculares, mitocondrials o neuronals. Entre les leucoencefalopaties destaquen la síndrome CADASIL (de l'anglès, *cerebral autosomal arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*) que constitueix una infreqüent causa de demència vascular hereditària on hi ha una desmielinització més o menys extensiva de la substància blanca (Tournier-Lasserre et al., 1991). MELAS és una miopatia mitocondrial amb acidosi làctica i encefalopaties que presenta modificacions de la substància blanca i atròfia cortical (Di Trapani et al., 1997).

Una de les malalties desmielinitzants de l'SNC més comunes en humans és l'*esclerosi múltiple*. Es tracta d'una malaltia crònica on predomina la varietat interindividual de les lesions sobre la varietat intraindividual (Storch et al., 1998). L'etiologia de l'esclerosi múltiple i d'altres malalties desmielinitzants implica la combinació de factors genètics, vírics i autoimmunes. La patologia de la malaltia implica l'alternança de processos de desmielinització i pèrdua d'oligodendròcits amb una conseqüent activació de macròfags que no causen ni dany tissular, ni dany de la mielina, ni dany dels oligodendròcits, dels axons ni dels astròcits (Lucchinetti et al., 2000).

Un humà adult té oligodendròcits progenitors en l'SNC. S'ha vist que en les zones afectades d'esclerosi múltiple aquests oligodendròcits progenitors no tenen la capacitat de reparar les regions desmielinitzades (Wolswijk et al., 1995; Scolding et al., 1998; Wolswijk et al., 2000).

1.8. EL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1

1.8.1. Família dels receptors domini discoidina

Els receptors domini discoidina 1 i 2 (DDR1 i DDR2) formen una subfamília de receptors tirosina quinasa transmembranals (RPTK) (de l'anglès, *receptor protein tyrosine kinase*).

Els RPTK són importants reguladors de les vies de transducció del senyal intracel·lular, i controlen diversos processos cel·lulars com la proliferació, diferenciació, transformació, senescència i apoptosi. En humans, es coneixen 20 subfamílies d'RPTK que es caracteritzen per tenir un domini extracel·lular, un domini transmembrana i un domini intracel·lular tirosina quinasa (figura 8). El mecanisme d'activació dels RPTK és comú: la unió del lligand en el domini extracel·lular provoca l'oligomerització del receptor i un canvi conformacional de la molècula que activa la seva autofosforilació dels residus tirosina del domini citoplasmàtic intracel·lular (Heldin, 1995). La fosforilació dels residus tirosina estableixen la conformació activa del receptor i es creen llocs d'unió per diverses molècules de transmissió del senyal com són les proteïnes amb dominis SH2 i PTB, les quals interactuen amb d'altres proteïnes, i activen així les corresponents cascades de transmissió del senyal intracel·lular (Schlessinger, 2000; Blume-Jensen i Hunter, 2001). Fins a l'actualitat, l'únic lligand que es coneix dels DDR és el col·lagen. DDR1 s'uneix al col·lagen tipus I, II, III, IV i V, mentre que DDR2 reconeix el col·lagen fibril·lar tipus I i III, principalment, malgrat que també reconeix el col·lagen tipus II i V (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997).

Un dels trets que caracteritza els DDR és la presència d'un domini discoidina homòleg a la proteïna discoidina I de l'ameba *Dictyostelium discoideum* en la regió extracel·lular. Discoidina I és una lectina implicada en el manteniment de la morfologia cel·lular, organització citoesquelètica i agregació cel·lular (Devine et al., 1982; Alexander et al., 1992). En humans hi ha proteïnes amb regions homòlogues al domini discoidina que estan implicades en l'adhesió cel·lular i contacte cel·lular. Aquestes proteïnes inclouen receptors de membrana com la caspr4 (Peles et al., 1997), la neuropilina 1 i 2 (He i Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997) i proteïnes de secreció com els factors de coagulació V i VIII o també dit *factor de von*

Introducció

Willebrand (Kane i Davie, 1986), l'AEBP1 (Layne et al., 1998), l'RS1 (Sauer et al., 1997) i l'MFGE8 (Hanayama et al., 2002).

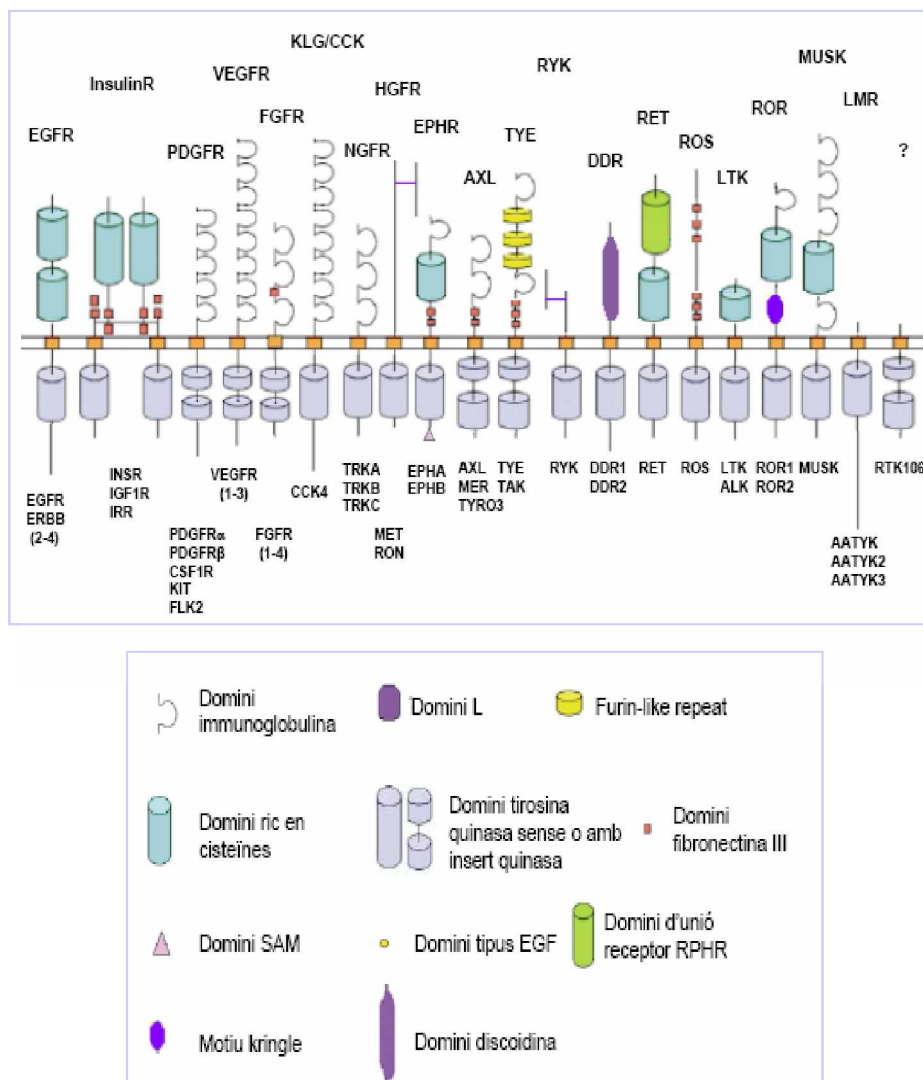


Figura 8. Esquema de les famílies estructurals de receptors tirosina quinasa en humans. Sobre cada receptor s'indica el nom prototip de cada família i, a sota, els receptors representatius identificats. Al requadre de sota de la figura s'especifiquen els diferents dominis estructurals. Les abreviatures dels receptors prototipus són: EGFR: receptor de creixement epidèrmic; INSR: receptor d'insulina; PDGFR: receptor de factor de creixement derivat de plaquetes; FGFR: receptor de creixement de fibroblasts; TRK: receptor tirosina quinasa; EPH: receptor d'ephrin; TYE: receptor tirosina quinasa de cèl·lules epitelials; RYK; receptor relacionat amb tirosines quinases; DDR: receptor domini discoidina; ROS: RPTK expressat en determinades cèl·lules epitelials; LTK: tirosina quinasa de leucòcits; ROR: receptor orfe; MUSK: receptor tirosina quinasa específica de múscul (Adaptada de Blume-Jensen i Hunter, 2001).

1.8.2. DDR1

Durant el desenvolupament embrionari i en teixit adult DDR1 s'expressa en l'epiteli de diferents òrgans com: cervell, ronyó, pulmó, tracte gastrointestinal, glàndula mamària, còlon, fetge, tiroides i còrnia (Alves et al., 1995; Tanaka et al., 1998; Hou et al., 2001; Mohan et al., 2001; Sakamoto et al., 2001; Curat i Vogel, 2002; Ferri et al., 2004). La seva expressió és particularment abundant en cervell (Vogel et al., 1999). L'expressió de DDR1 es veu incrementada en diferents tipus de càncers com el càncer de mama, d'ovari, d'esòfag, de pulmó i de cervell (Laval et al., 1994; Barker et al., 1995; Pérez et al., 1996; Nemoto et al., 1997; Weiner et al., 2000; Alves et al., 2001; Heinzelmann-Schwarz et al., 2004; Ram et al., 2005).

S'ha vist que els ratolins deficients per DDR1 presenten una mida i pes menor fins a la pubertat. En el cas de les femelles presenten problemes d'implantació dels embrions, retard en el creixement de la glàndula mamària, absència de l'obertura alveolar i no secreten la proteïna de la llet. També presenten un increment de col·lagen en la matriu extracel·lular de l'epiteli mamari (Vogel et al., 2001). Per tant, DDR1 és important en el desenvolupament postnatal de la glàndula mamària.

1.8.2.1. Estructura gènica

El gen DDR1 es va clonar per primera vegada l'any 1993, en una llibreria de cDNA de placenta humana mitjançant la hibridació d'una sonda de 8 aminoàcids (HRDLAARN) homòloga al domini tirosina quinasa dels RTK (Johnson et al., 1993). Es va anomenar *DDR*. Simultàniament va ser identificat per altres grups i va rebre noms diferents, com el gen NEP homòleg al DDR1 en ratolí (Zerlin et al., 1993), *trkE* (Di Marco et al., 1993), *PTK-3* en rata (Sánchez et al., 1994), *RTK6* (Laval et al., 1994), *Cak* (Pérez et al., 1994) i *MCK-10* (Alves et al., 1995).

En humans, el gen DDR1 es localitza en el cromosoma 6p21.3 en proximitat als gens del complex major d'histocompatibilitat classe I (MHC I) (Valent et al., 1995).

DDR1 està format per 17 exons que s'estenen al llarg de 12 kb del DNA genòmic. Els 8 primers exons (exons 1-8) codifiquen pel domini extracel·lular, dels quals els 3 primers (exons 1-3) codifiquen pel domini discoidina. L'exó 9 codifica el domini transmembrana. La resta d'exons, en total 8, codifiquen pel domini intracel·lular, dels quals 3 exons codifiquen pel domini transmembrana (exons 10-12) i 5 exons pel

Introducció

domini catalític i la cua C-terminal (exons 13-17) (Playford et al., 1996; Sakuma et al., 1996) (figura 9).

El domini transmembrana es caracteritza per ser una regió rica en glicines i prolines, i per ser més llarga en comparació amb la resta d' RPTK (té 176 aminoàcids).

Fins a l'actualitat hi ha descrits 18 transcrits diferents de DDR1 a les bases de dades públiques, dels quals 6 no codifiquen per cap proteïna (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=OTTHUMG00000031236;db=vega). En aquesta tesi es descriuen 5 transcrits o isoformes diferents de DDR1, descrits per Alves i col·laboradors. Aquestes 5 isoformes de DDR1 es generen com a conseqüència de diferents mecanismes d'empalmament alternatiu i són conegudes amb els *affixs* a-e. La majoria d'aquestes isoformes afecten la regió transmembrana (Laval et al., 1994; Alves et al., 1995; Alves et al., 2001). A continuació, es fa una breu descripció de cadascuna d'aquestes isoformes ordenades de més llarga a més curta:

- § DDR1c: És la isoforma més llarga. Conté tota la regió codificant i genera una proteïna de 919 aminoàcids.
- § DDR1b: Codifica per una proteïna de 913 aminoàcids. Aquesta isoforma presenta un lloc acceptor d'empalmament alternatiu críptic que causa una deleció de les primeres 18 pb en l'extrem 5' de l'exó 14 del domini catalític.
- § DDR1a: Codifica per una proteïna de 876 aminoàcids a causa de l'empalmament dels 6 aminoàcids i dels 37 aminoàcids codificats per l'exó 14 i per l'exó 11, respectivament.
- § DDR1e: Codifica per una proteïna de 767 aminoàcids. Aquesta isoforma es caracteritza per la pèrdua, a causa de mecanismes d'empalmament alternatiu, de la primera meitat (82 pb) de l'exó 10, de l'exó 11 i de l'exó 12. La unió de l'exó 9 amb la segona meitat de l'exó 10 (84 pb) genera una nova pauta de lectura de 28 aminoàcids en la proteïna. Per contra, quan s'uneix la segona meitat de l'exó 10 amb l'exó 13 la pauta de lectura es restableix presentant l'exó 13 una codificació normal. La nova pauta de lectura comporta la pèrdua d'un lloc d'unió d'ATP en el domini transmembrana, fet que probablement implicaria la pèrdua de l'activitat intrínseca tirosina quinasa del receptor.

§ DDR1d: Codifica per la proteïna més curta de DDR1, de 508 aminoàcids. Aquesta proteïna resulta de l'empalmament dels exons 11 i 12. La unió de l'exó 10 amb l'exó 13 genera una nova pauta de lectura i una terminació prematura de la traducció a causa de l'aparició d'un codó de terminació just abans de la regió tirosina quinasa. Per tant, es tracta d'un receptor ancorat a la membrana sense domini tirosina quinasa i cua C-terminal.

1.8.2.2. Estructura proteica

Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior, la proteïna DDR1 conté diversos dominis (figura 9). A continuació es fa una descripció més detallada de l'estructura proteica i funcionalitat d'aquestes regions.

Regió extracel·lular: domini discoidina i regió *stalk*

La regió extracel·lular de DDR1 està composta pel pèptid senyal, el domini discoidina i la regió *stalk*. El pèptid senyal es correspon als primers 19 aminoàcids de la regió extracel·lular. A continuació està el domini discoidina constituït per 160 aminoàcids i, finalment, trobem la denominada regió *stalk* prèvia al domini transmembrana i formada per 215 aminoàcids (Curat et al., 2001).

Domini discoidina

És el lloc de DDR1 on s'uneix el seu lligand, el col·lagen. A diferència del mecanisme d'activació de la resta dels RPTK DDR1 només reconeix el col·lagen quan està en forma dimèrica i, per tant, la causa directa d'aquesta dimerització no és la unió del lligand (Schlessinger, 1997; Leitinger, 2003).

En aquest domini s'han identificat diversos residus agrupats en 3 llaços: llaç 1 (Ser52-Thr57), llaç 3 (Arg105- Lys112) i llaç 4 (Ser175), que són crítics per la unió del col·lagen al receptor (Abdulhussein et al., 2004).

Regió stalk

No presenta homologia amb cap altra proteïna. Aquesta regió és responsable del reordenament estructural de la proteïna un cop s'ha unit el lligand i de la transmissió del senyal a través de la membrana cel·lular. Conté dues seqüències importants: una seqüència de glicosilació important per a aquesta transmissió transmembranal del

Introducció

senyal (Curat et al., 2001) i una seqüència diana per proteases, probablement de la família de les MT-MMP o ADAM (Vogel et al., 2002). Els canvis conformacionals en la regió *stalk* com a conseqüència de la unió del col·lagen permeten l'acció d'aquests enzims proteolitzant DDR1 en dos fragments: una subunitat β fosforilada de 62 kD que roman anclada a la membrana i un ectodomini soluble de 58 kD. Sembla que aquest ectodomini manté unit el col·lagen i n'impedeix la interacció amb altres receptors de membrana (Vogel et al., 2002). Recentment s'ha vist que el col·lagen tipus I promou la proteòlisi de DDR1 i l'alliberament del seu ectodomini a través d'un mecanisme que depèn del reclutament de *metalloproteïnases* de matriu o disintegrines i Src (Slack et al., 2006). Fins al moment es desconeix la implicació biològica d'aquest trencament de DDR1.

Regió juxtamembrana

El domini juxtamembrana té 176 aminoàcids, llargària que la diferència de la resta dels RPTK. És una regió rica en prolines i és la més afectada pels mecanismes d'empalmament alternatiu. L'única homologia que hi ha entre DDR1 i DDR2 en aquesta regió és una seqüència de 25 aminoàcids localitzats en l'exó 12, i suggereix que és una regió crítica per les propietats senyalitzadores d'ambdós receptors (Alves et al., 2001). Conté diverses seqüències consens amb residus tirosina que poden ser llocs d'autofosforilació. Aquest domini està codificat pels exons 10, 11 i 12. L'exó 11, present en les isoformes DDR1b i DDR1c, conté el motiu LXNPXY que correspon al motiu consens XNPXpY d'unió al domini PTB de la proteïna adaptadora Shc. En línies cel·lulars de càncer de mama humanes aquest motiu d'unió entre la molècula adaptadora Shc i domini PTB de la regió juxtamembrana té lloc en la tirosina 513 fosforilada de la isoforma DDR1b (Vogel et al., 1997). Aquesta unió ha estat confirmada recentment per Foehr i col·laboradors l'any 2000 en diferents quimeres de DDR1. En cèl·lules THP-1 diferenciades s'ha vist que hi ha el reclutament de la molècula adaptadora ShcA en el mateix motiu LXNPXY de la isoforma DDR1b fosforilada; unió que causa l'activació de la proteïna MAPK p38, el factor NF κ B i TAB1 β a través de la via TRAF6 (Matsuyama et al., 2003; Yoshimura et al., 2005). Anteriorment, Matsuyama i col·laboradors l'any 2003 van observar que l'activació de la via MAPK p38 per a aquesta unió induïa la producció d'MCP-1, IL-8, MIP-1 α i MMP-9 en cèl·lules bronquioalveolars BALF.

Hi ha altres llocs potencials d'unió a proteïnes amb dominis Sh2 o PTB en aquesta regió, concretament 2 tirosines que es localitzen en l'exó 12: la Tyr 506 (YSGD) i la Tyr 547 (YMEP) (Alves et al., 1995).

Com ja s'ha comentat anteriorment, la isoforma DDR1a no conté l'exó 11; per tant, no té el domini d'unió PTB per la molècula Shc2. No obstant això posseeix un motiu consens per a la unió al domini PTB de la proteïna adaptadora FRS2 (Foehr et al., 2000).

Recentment s'ha identificat un probable domini SH2 d'unió per a Nck-2 en una Tyr484 (YQEP) (Koo et al., 2005).

Regió intracel·lular: domini tirosina quinasa i cua C-terminal

Domini tirosina quinasa

El domini tirosina quinasa comprèn els aminoàcids 608 fins al 903. Aquest domini presenta una elevada homologia amb els receptors tirosina quinasa de les neurotrofines. No obstant això, la cinètica d'activació dels receptors domini discoidina difereix de la resta de RPTK. L'autofosforilació del domini tirosina quinasa és lenta, s'inicia al cap de 2 hores d'unir-se al col·lagen i és màxima a les 18 hores. Per contra, en la resta d'RPTK aquest procés de fosforilació és immediat (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997).

El domini tirosina quinasa de DDR1 comparteix una sèrie de característiques amb els receptors de neurotrofines trkA/B/C: un gap d'un aminoàcid entre els residus 623 i 624, una Thr732 i Phe808 en lloc d'una Ala732 i Tyr808 present en altres tirosines quinases, un probable lloc d'autofosforilació en la Tyr759 seguit d'una altre Tyr, 11 aminoàcids extra en una regió corresponent a un domini característic de les proteïnes c-Kit, PDGF i CSF-1 i 3 residus corresponents d'una inserció de 5 residus (Leu-X-Ala-Val-X) del domini catalític dels trk (Di marco et al., 1993). En aquesta regió s'ha identificat també l'existència d'una Tyr740 d'unió a Shp-2 (Koo et al., 2005).

Les isoformes DDR1d i DDR1e no tenen activitat catalítica. Partint de la seva estructura s'ha postulat que aquests receptors sense domini quinasa actuarien com a repressors mitjançant la formació d'heterodímers, i regularien així el mateix receptor DDR1 (Alves et al., 2001).

Introducció

Cua C-terminal

La cua C-terminal present en les isoformes DDR1a, DDR1b i DDR1c conté només 9 aminoàcids. Presenta un motiu d'unió LNTV per proteïnes amb dominis PDZ. En la cua C-terminal de la isoforma DDR1d hi ha un motiu GAPV. En aquest motiu també es poden unir proteïnes amb un o diversos dominis PDZ. Les proteïnes PDZ tenen un paper clau en l'organització dels receptors eph i en la localització HER2 (Lin et al., 1999; Borg et al., 2000).

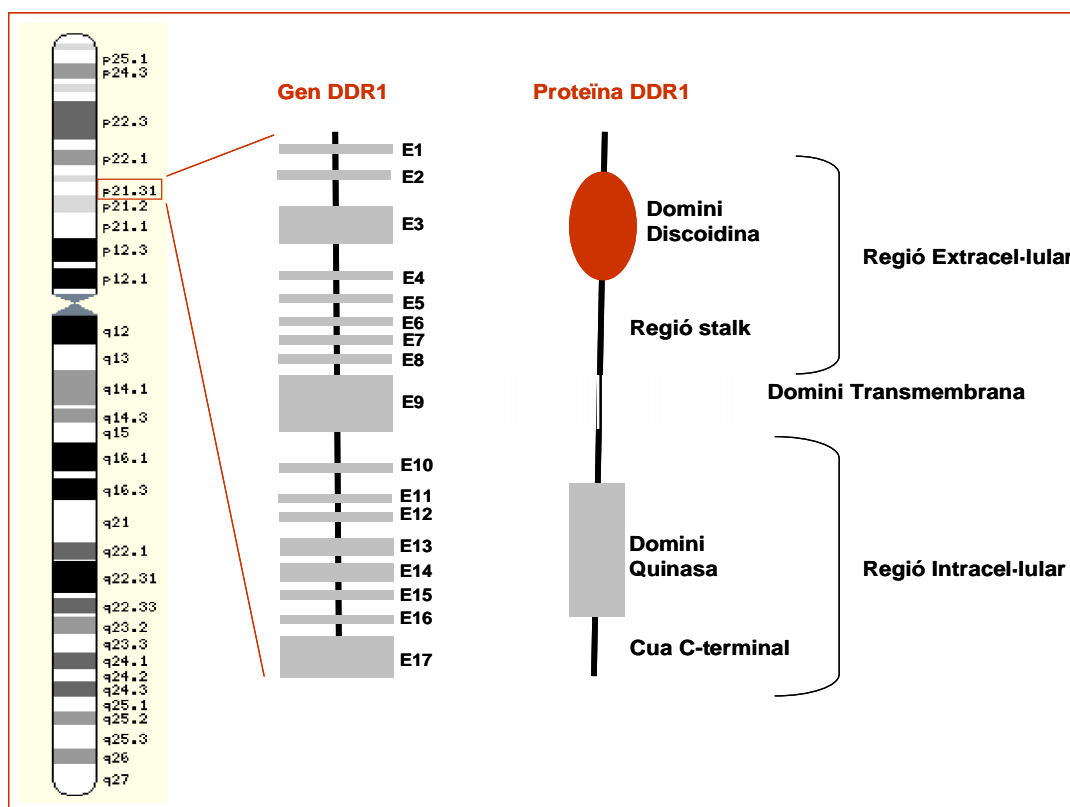


Figura 9. Estructura gènica i proteica de DDR1. En la part esquerra de la figura es mostra l'estructura gènica de DDR1 i s'enumeren en capses grises els diferents exons i la seva correspondència proteica en els dominis discoidina, transmembrana, i tirosina quinasa a la part dreta de la figura.

1.8.2.3. Paper de DDR1 en el sistema nerviós central

A part de certs estudis d'expressió de DDR1 en cervell humà embrionari i adult (Di Marco et al., 1993; Pérez et al., 1994; Alves et al., 1995; Johansson et al., 2005; Ram et al., 2006) i la seva expressió incrementada en diferents tipus de càncers cerebrals, els únics estudis que han analitzat més detalladament l'expressió de DDR1 en el sistema nerviós central s'han realitzat en models murins.

El primer d'aquests estudis el va realitzar Zerlin i col·laboradors l'any 1993, observant expressió localitzada de DDR1 en diferents estructures de l'SNC durant el desenvolupament embrionari i el postnatal. Concretament va observar durant el desenvolupament embrionari que l'expressió de DDR1 es concentrava en les cèl·lules neuroepitelials de la zona ventricular. Aquesta expressió ja es manifestava a l'inici de la neurulació. En cervell adult de ratolí, l'expressió de DDR1 es localitzava en cèl·lules glials del cos callós, regions ventrals de l'hipotàlam i el pons, entre d'altres.

Sánchez i col·laboradors l'any 1994 van confirmar aquests resultats en cervell de rata. Van analitzar l'expressió de DDR1 més detalladament mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, en diferents estadis del desenvolupament embrionari de l'SNC i van trobar que: 1) en embrions de 12-13 dies (E12.5) l'expressió de DDR1 es concentrava en el prosencèfal, romboencèfal, mesencèfal i medul·la espinal, 2) en embrions de 15-16 dies (E15.5) aquesta expressió es concentrava en les zones proliferatives ventrals i 3) en embrions de 17-18 dies (E17.5) l'expressió de DDR1 es trobava en regions més localitzades com el caudat, el putamen i la zona ventricular del còrtex cerebral del telencèfal, en el tàlam dorsal del diencèfal, en el col·licle inferior del mesencèfal i, finalment, en el cerebel i en les estructures dorsals de la medul·la del prosencèfal. En cap estructura del diencèfal es va detectar expressió de DDR1.

En cervell adult de rata va observar que la major expressió de DDR1 es trobava en les regions de substància blanca i va corroborar així els resultats obtinguts en ratolí per Zerlin (Zerlin et al., 1993; Sánchez et al., 1994).

Bhatt i col·laboradors l'any 2000 van publicar l'únic estudi que fins a l'actualitat hi ha sobre la funció de DDR1 en el cerebel de ratolí. Durant el desenvolupament embrionari DDR1 és expressat per cèl·lules granulars de la capa externa del cerebel i la seva activació per unió del col·lagen és essencial pels processos d'elongació axonal. L'expressió de DDR1 en les cèl·lules granulars es manté en l'edat adulta, fet que suggereix un probable paper de DDR1 en el manteniment i extensió de les prolongacions axonals i regulació de la formació de sinapsis.

El nostre grup ha estudiat en detall l'expressió de DDR1 durant el neurodesenvolupament del ratolí i en l'adult mitjançant tècniques d'hibridació *in situ* i immunohistoquímica (Franco-Pons et al., 2006). Els resultats obtinguts amb

aquestes tècniques concorden amb els estudis esmentats anteriorment. No obstant això, es va observar en diferents estadis postnatsals del cervell que l'expressió de DDR1 segueix un patró espaciotemporal que se solapa al procés de mielinització i que aquesta expressió és màxima quan es produeix el pic en la mielinització postnatal. A més, es va identificar els oligodendròcits madurs com les cèl·lules que expressen DDR1 (Franco-Pons et al., 2006).

1.8.2.4. Paper de DDR1 en altres teixits

Com ja s'ha comentat repetidament en capítols anteriors, l'únic lligand que es coneix de DDR1 és el col·lagen, component majoritari de la matriu extracel·lular. Les funcions que es coneixen de DDR1 s'associen en aquesta matriu extracel·lular. Fins al present, DDR1 està implicat en:

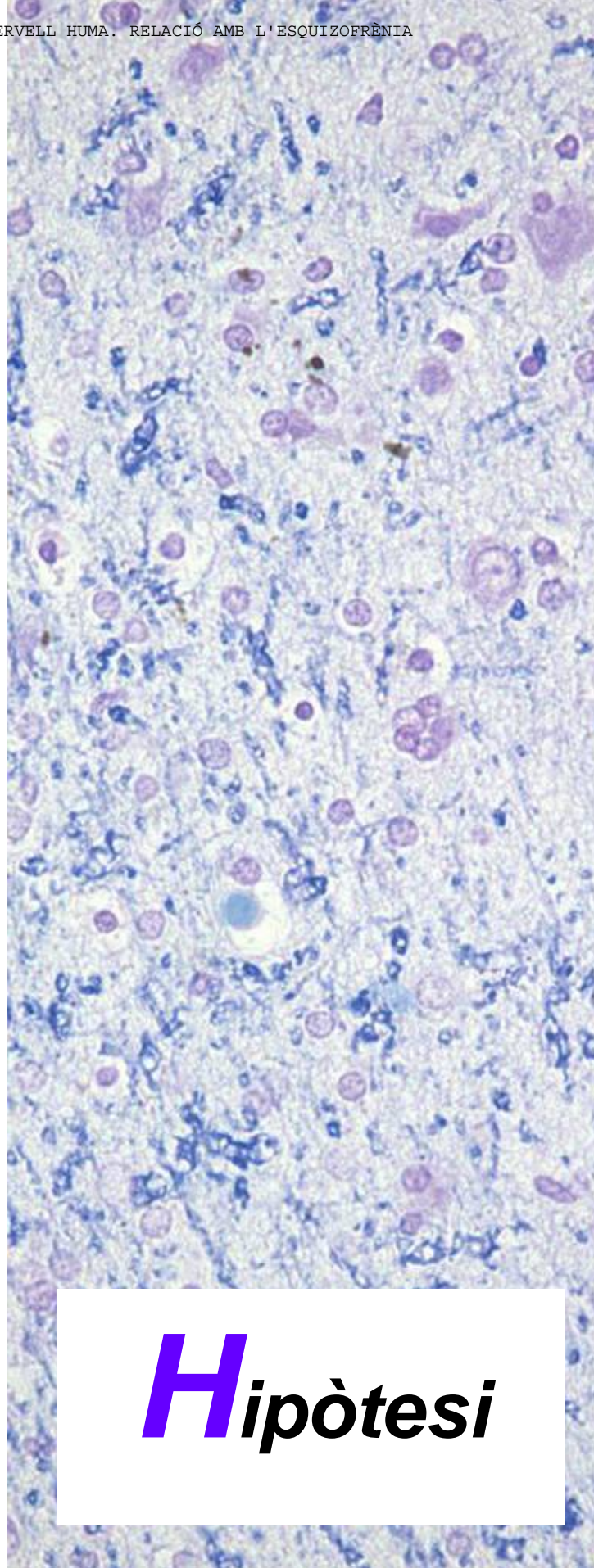
1. Processos de degradació de la matriu extracel·lular: L'activació de DDR1 per unió al col·lagen activa les metal·loproteïnases MMP-2 i MMP-9 (Hou et al., 2001; Hou et al., 2002; Matsuyama et al., 2005a; Matsuyama et al., 2005b). La sobreexpressió de DDR1 en diferents càncers està associat a la invasió de les cèl·lules tumorals a causa d'una major activitat d'aquestes metal·loproteïnases
2. Processos de proliferació i adhesió cel·lular: El col·lagen és un modulador de la proliferació de les cèl·lules musculars llises o mesangials. S'ha vist que cèl·lules mesangials aïllades del ratolí deficient per a DDR1 i estimulades amb col·lagen redueixen dràsticament la seva capacitat d'adhesió, en part a causa d'una menor activitat de les MMP-2 i MMP-9 en comparació amb les cèl·lules normals. Contràriament, les cèl·lules mesangials aïllades de ronyó presenten una major proliferació en aquests ratolins deficientes per a DDR1 (Hou et al., 2001; Curat i Vogel., 2002; Hou et al., 2002).
3. Processos de migració cel·lular: Les cèl·lules mesangials aïllades del ratolí deficientes per DDR1 presenten una menor capacitat de migració (Hou et al., 2002). La migració dels leucòcits requereix d'una interacció coordinada amb la matriu extracel·lular. La isoforma DDR1a promou la migració dels leucòcits en una matriu tridimensional de col·lagen. La isoforma DDR1b

sembla que actuaria de forma contrària, d'inhibidor d'aquesta migració (Kamohara et al., 2001).

4. Producció de quimioquines com la MCP-1, IL-8 i MIP- α a causa de l'activació del receptor per col·lagen en els macròfags alveolars durant els processos inflamatoris (Matsuyama et al., 2004).
5. Diferenciació cel·lular de monòcits a macròfags o cèl·lules dendrítiques (Matsuyama et al., 2003; Matsuyama et al., 2004), així com ja s'ha comentat prèviament, en l'elongació axonal de les cèl·lules granulars del cerebel (Bhatt et al., 2000).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



Hipòtesi

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

El gen DDR1 humà es troba en la regió cromosòmica 6p21, regió on diferents estudis genètics de lligament recolzen positivament la possible existència d'un o varis gens de susceptibilitat per l'esquizofrènia.

El gen DDR1 codifica per una receptor tirosina quinasa que s'expressa de forma molt important durant el neurodesenvolupament del cervell en zones proliferatives.

Recentment s'ha observat una important expressió de DDR1 en la substància blanca, concretament en un tipus cel·lular glial: els oligodendòcits. A més l'expressió d'aquest receptor segueix un patró espacio-temporal paral·lel al procés de mielinització.

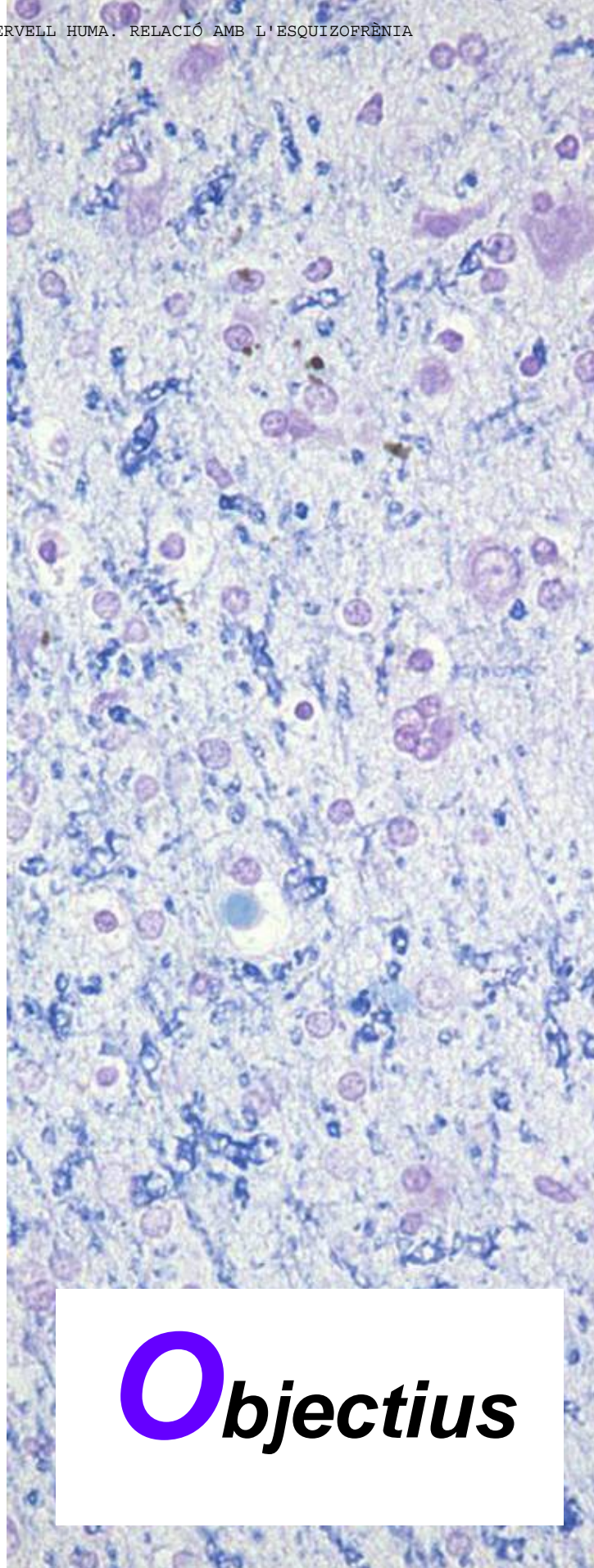
Acceptant la teoria causal del neurodesenvolupament per l'esquizofrènia junt amb recents evidències de la implicació dels oligodendròcits en la malaltia, ens plantegem la següent hipòtesi:

Plantegem l'estudi del DDR1 com a gen candidat de susceptibilitat per l'esquizofrènia, i concretament la seva implicació en el procés de mielinització mediat per l'oligodendroglià.

L'expressió de DDR1 en oligodendròcits humans contribueix en el procés de mielinització dels axons durant la formació de la substància blanca del SNC que s'estén fins a la etapa adulta. El paper de DDR1 en la proliferació i diferenciació dels oligodendròcits mielinitzants es pot alterar per la presència de mutacions en el gen DDR1, de manera que els portadors d'aquestes mutacions tindrien més probabilitat de desenvolupar esquizofrènia junt amb d'altres factors de risc genètics i ambientals.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



Objectius

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

La present tesi doctoral té com a objectiu general l'estudi detallat de l'expressió del DDR1 en cervell humà i estudiar la seva possible implicació en l'esquizofrènia.

Amb aquest supòsit ens plantegem tres objectius concrets:

- Objectiu 1. Estudiar la possible associació del receptor DDR1 i l'esquizofrènia en un estudi cas-control i la seva expressió en funció del genotip per l'SNP9 (rs1049623).
- Objectiu 2. Estudiar en detall l'expressió de DDR1 en talls histològics postmortem de cervell humà i caracteritzar el tipus cel·lular que l'expressa.
- Objectiu 3. Analitzar l'expressió del RNAm DDR1 en una mostra de pacients esquizofrènics i controls. També s'estudiarà la possible expressió diferencial de les 5 isoformes descrites de DDR1 entre pacients esquizofrènics i controls.

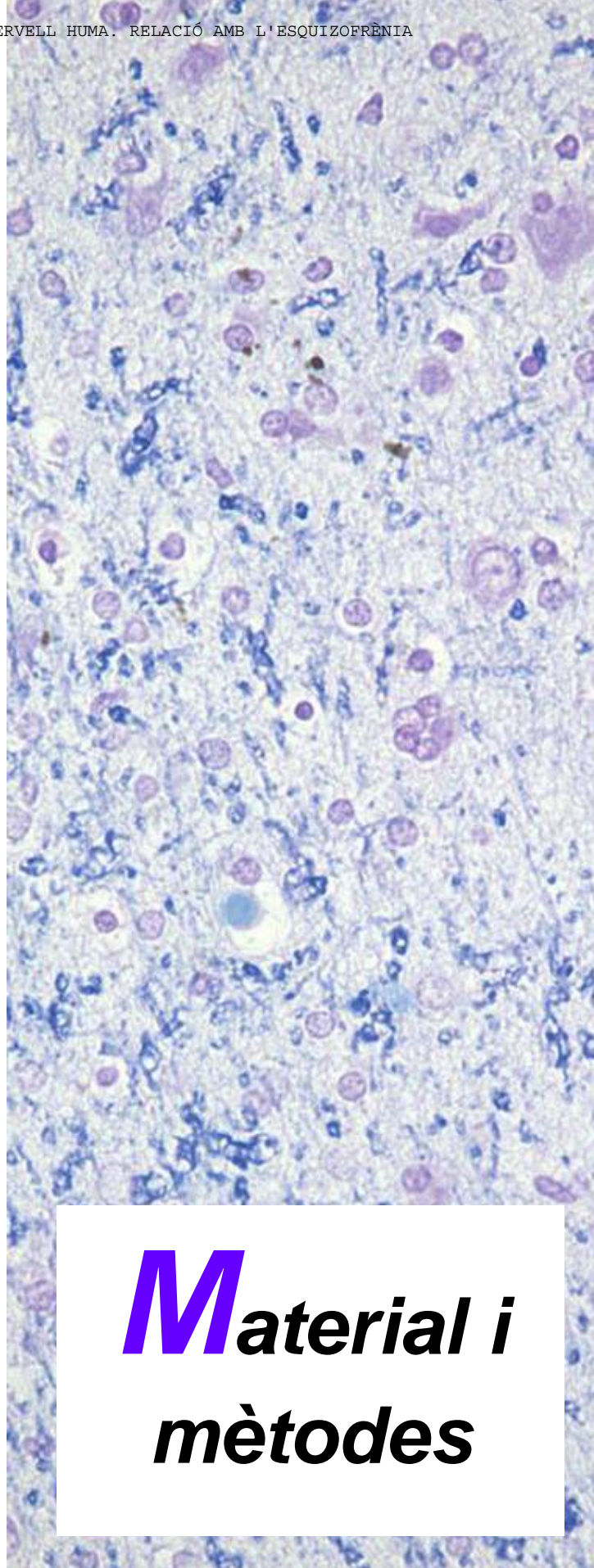
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



Material i
mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

4. 1. Material

Per estudiar la possible implicació del receptor domini discoidina 1 (DDR1) en l'esquizofrènia ens vàrem plantejar tres tipus d'estudis:

- Estudi 1: Avaluar la possible associació de DDR1 i l'esquizofrènia mitjançant una anàlisi d'associació de casos i controls.
- Estudi 2: Determinar l'expressió de DDR1 en cervell humà.
- Estudi 3: Analitzar quantitativament l'expressió de DDR1 en cervell de pacients esquizofrènics i de controls.

Tots els procediments descrits en aquesta tesi han seguit les pautes de la Declaració d'Hèlsinki i les Normes de la Bona Pràctica Clínica. L'estudi va ser aprovat per la Comissió d'Investigació de l'Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata i pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus.

4.1.1. Mostra de l'estudi 1

Aquest estudi va ser finançat pel Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI02498). La mostra analitzada va consistir en 389 pacients esquizofrènics (252 homes i 137 dones) reclutats a l'Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata de Reus, i 615 individus control (321 homes i 294 dones). Tots els participants, 1.004 individus en total, eren caucàsics nascuts a Espanya.

Pacients esquizofrènics

Els pacients van ser diagnosticats d'acord amb els criteris de la classificació DSM-IV. No es van incloure els pacients amb trastorn esquizoafectiu. Els pacients van ser informats de la naturalesa de l'estudi i van signar el document de Consentiment Informat. L'edat mitjana dels pacients és de 51,4 anys (rang 19 a 88) amb una mitjana de durada de la malaltia de 27 anys (rang d'1 a 64). La proporció d'homes i dones és de 59,3% i 40,7%, respectivament. Els pacients reclutats entre els anys 1966 i 1988 van ser avaluats i diagnosticats de forma consensual per dos psiquiatres. Els pacients reclutats entre els anys 2001 i 2004 van ser avaluats d'acord amb els criteris de l'entrevista estructurada SCAN (Vázquez Barquero, 1993). Les variables clíniques considerades com l'evolució de la malaltia, el tipus, i la simptomatologia predominant i els antecedents familiars de malaltia psicòtica van ser reagrupades en dues categories per fer l'anàlisi estadística.

Material i mètodes

A tots els pacients, en el moment de ser reclutats, se'ls va practicar una extracció de sang de la qual se'n van obtenir DNA, limfòcits i plasma. Tot aquest material està emmagatzemat al Biobanc IRCIS.

Individus control

La mostra control es va obtenir per mostreig aleatori de la població general, de manera que és una mostra representativa de la nostra població. Els participants van ser reclutats en 3 centres d'atenció primària (CAP) de la província de Tarragona. La mitjana d'edat és de 43,1 anys (rang de 18 a 75). La proporció d'homes i dones és de 54,9% i 45,1%, respectivament. Un metge va recollir la història clínica completa i detalls de l'estil de vida, hàbits i antecedents de cada individu. A més, cada participant va completar el qüestionari Goldberg (GHQ) de 28 ítems (Goldberg i Williams, 1988) per fer un sedàs de patologia psiquiàtrica. Els criteris d'inclusió van ser: puntuació GHQ<7 i no tenir antecedents personals de malaltia psiquiàtrica. Es va obtenir el consentiment informat dels individus per escrit i es va garantir l'anonimat de les dades.

A cada participant se li va fer una extracció de sang per obtenir diverses alíquotes de DNA, limfòcits, plasma i sèrum que estan emmagatzemades al Biobanc IRCIS.

RNA polyA⁺ de cervell humà

Per tal de comprovar l'expressió de DDR1 en cervell humà es va comprar RNA polyA⁺ humà de cervell de la casa comercial Clontech (BD Biosciences). Aquest RNA havia estat obtingut d'un homogenat de cervell de 6 individus normals, 3 homes (mitjana d'edat 55,6 anys) i 3 dones (mitjana d'edat 46 anys). Els 6 individus eren caucàsics i la causa de la seva mort havia estat per traumatisme.

4.1.2. Mostra dels estudis 2 i 3

Aquests dos estudis han estat finançats (Grant ID# 03R-392 i #05R-896) pel Stanley Medical Research Institute (SMRI, Chevy Chase, MD, EUA). Els espècimens de teixit cerebral humà emprats en aquests dos estudis van ser cedits per aquesta institució.

Teixit humà *post mortem*

Per a l'estudi 2 es van analitzar talls histològics frescos i talls parafinats de còrtex occipital humà *post mortem* del banc de mostres del Stanley Neuropathology Consortium (SMRI).

Per a la quantificació per RT-PCR de l'estudi 2 es va utilitzar RNA de còrtex frontal de 3 individus control de la Stanley Array Collection (SMRI).

Per realitzar l'estudi 3 es van utilitzar dues col·leccions. La primera col·lecció va consistir en 60 talls histològics frescos de còrtex occipital (Stanley Neuropathology Consortium, SMRI), dels quals 15 corresponen a pacients esquizofrènics, 15 a pacients amb trastorn bipolar, 15 a pacients amb depressió i 15 a individus control. L'SMRI obliga a analitzar totes les mostres, però en aquest estudi només mostrem els resultats per a pacients esquizofrènics i controls. La segona col·lecció va consistir en 105 RNA de còrtex dorsolateral prefrontal (DLPFC de l'anglès, àrea de Brodmann BA 46) del Stanley Array Collection (SMRI), dels quals 35 RNA corresponen a pacients esquizofrènics, 35 RNA a pacients amb trastorn bipolar i 35 RNA a individus control. En aquest treball no es mostren els resultats dels pacients amb trastorn bipolar.

Tota la part experimental dels estudis 2 i 3 es va realitzar amb les mostres codificades, és a dir, sense saber a quin grup diagnòstic pertanyien. Un cop finalitzada la part experimental es van enviar els resultats al Stanley Medical Research Institute que ens va enviar tant les variables clíniques de cadascun dels individus de les 2 col·leccions com les característiques fisicoquímiques i biològiques (pH, interval de refrigeració, pes o hemisferi cerebral) dels espècimens i la descodificació (Torrey et al., 2000).

Línies cel·lulars

Per tal de determinar si hi ha una expressió de DDR1 específica d'isoforma i dependent del tipus cel·lular, es van escollir les línies cel·lulars humanes següents: 2 línies de cèl·lules oligodendroglials (HOG16 i MO3.13), una línia cel·lular de càncer de còlon HCT116 i un cultiu cel·lular primari de cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC).

Les línies cel·lulars HOG16 i MO3.13 van ser subministrades pel banc de cèl·lules Eucell Banck (Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona, Espanya)

Material i mètodes

amb el permís del doctor G. Dawson (Universitat de Chicago, Chicago IL, EUA) i del doctor N. Cashman (Universitat de Toronto, Toronto, Canadà), respectivament. Ambdues línies cel·lulars són línies humanes d'oligodendròcits no diferenciats que sotmeses a un medi de diferenciació adquireixen un estadi de maduració amb expressió de diferents marcadors d'oligodendròcits madurs com l'MBP, MAG, CNPasa i MOBP, entre d'altres (Buntinx et al., 2003).

La línia cel·lular de càncer de còlon HCT116 es va comprar a ATCC (CCL-247, LGC Promochem SL). Aquesta línia cel·lular es va utilitzar com a control positiu per a l'expressió de les 5 isoformes de DDR1, tal com està descrit per Alves (Alves et al., 2001).

El cultiu cel·lular primari HUVEC va ser subministrat per la doctora M. Camacho (Hospital de Sant Pau, Barcelona, Espanya).

4.2. Metodologia emprada

4.2.1. Aïllament de DNA

L'extracció del DNA genòmic a partir de leucòcits de sang perifèrica dels individus de l'estudi 1 es va realitzar amb l'equip de purificació Puregene DNA (Gentra Systems). El DNA es va diluir a una concentració final de 50 ng/ μ l.

4.2.2. Aïllament d'RNA

Per a l'estudi 1, l'extracció d'RNA total dels limfòcits congelats es va realitzar pel mètode de Trizol (Invitrogen).

Per a l'estudi 2, l'RNA total de les línies cel·lulars HOG16, MO3.13 i HCT116 es va extreure utilitzant l'ABIPrism 6100 Nucleic Prepstation segons les instruccions d'Applied Biosystems. L'RNA total de les cèl·lules HUVEC es va extreure pel mètode de Trizol (Invitrogen).

Per a l'estudi 3, l'RNA total dels 60 teixits frescos de còrtex occipital es va aïllar pel mètode de Trizol.

La concentració i puresa de tots els RNA extrets es va estimar per espectrofotometria (absorvència 260 nm/280 nm).

Els 105 RNA proveïts per la Stanley Array Collection (SMRI) van ser també extrets amb el reactiu de Trizol. La concentració i integritat d'aquest RNA el van analitzar amb el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer.

4.2.3. Aïllament i criopreservació de limfòcits de sang perifèrica

Es van aïllar els limfòcits (PBL, de l'anglès *peripheral blood lymphocytes*) a partir de sang fresca heparinitzada utilitzant el reactiu Ficoll-PaqueTM (Amersham Biosciences). A continuació, es van resuspendre amb sèrum boví fetal (FBS) amb un 10% de dimetilsulfòxid (Sigma-Aldrich). Les alíquotes de les suspensions cel·lulars es van transferir a criotubs i es van congelar gradualment (1 °C/min) en un congelador de -80 °C. Posteriorment i en un marge de 24 hores els criotubs van ser transferits a un congelador de -150 °C. Les cèl·lules es van descongelar en el moment d'utilitzar-se per fer l'extracció RNA amb el reactiu Trizol (Invitrogen), tal com es descriu en l'apartat 4.2.2.

4.2.4. Quantificació d'RNAm mitjançant RT-PCR a temps real

A partir d'1 µg d'RNA total de cada mostra es va retrotranscriure (RT) a DNAc. L'RT es va realitzar seguint les instruccions de la casa comercial Invitrogen i es van utilitzar hexamers a l'atzar (de l'anglès, *random hexamers*) i la transcriptasa reversa SuperScript II Rnase H⁻ (Invitrogen).

L'expressió de l'RNAm dels diferents gens es va quantificar per PCR-Quantitativa utilitzant la tecnologia TaqMan en un ABI Prism 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Les reaccions es van realitzar per triplicat usant 5 µl de DNAc en un volum final de 25 µl.

Es van utilitzar *pre-designed Assays-on-Demand* comercials per a la quantificació de DDR1 total i del control endogen RNAr 18S (Applied Biosystems). El *pre-designed Assay-on-Demand* de DDR1 (Hs00233612_m1, Applied Biosystems) no discrimina cap de les 5 isoformes conegudes de DDR1. La sonda es localitza entre els exons 5 i 6 corresponents a la isoforma c de DDR1 (NP_054700.2), exons que no estan afectats pels mecanismes d'empalmament alternatiu que generen les diferents variants de DDR1. A més, el fet que la sonda es localitzi entre 2 exons ens assegura que no s'amplifiquin restes de DNA genòmic de les mostres.

Material i mètodes

Per a la quantificació de les 5 isoformes de DDR1 dels estudis 2 i 3 es van dissenyar 5 Custom Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Els primers i les sondes van ser dissenyades pel servei d'Applied Biosystems (File Builder v3.0) en llocs estratègics entre 2 exons per tal de discriminar les 5 isoformes i alhora evitar l'amplificació de restes de DNA genòmic (taula 1). A la figura 1 es detalla el segment del gen on hibriden les 5 sondes.

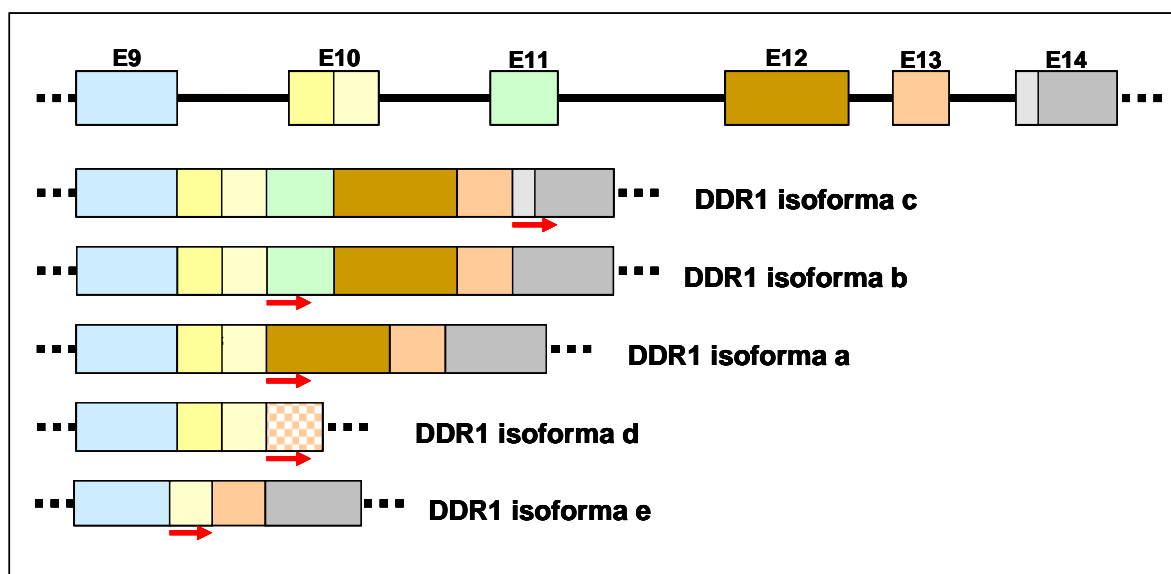


Figura 1. Esquema de les 5 isoformes de DDR1 i la localització de la sonda específica de cada *assay-by-design* (fletxa vermella). Cal destacar que l'assaig per a la isoforma b és comú també per a la isoforma c; per tant, es va calcular l'expressió de la isoforma b d'acord a la fórmula $\Delta Ct \text{ isoforma b} - \Delta Ct \text{ isoforma c}$. La resta d'assaigs són específics d'isoforma.

Es va verificar l'eficiència de cada assaig d'acord amb les instruccions d'Applied Biosystems en un banc de dilucions de 10^6 DNAC i aquest experiment de validació es va realitzar 3 vegades. Es va utilitzar com a control endogen l'RNAr 18S. Es van construir corbes estàndard de cada isoforma per confirmar l'eficiència de l'amplificació de cada assaig (vegeu la figura 2). Els resultats de la quantificació de les diferents isoformes es van expressar com a valors relatius a l'expressió de la isoforma DDR1a.

En l'estudi 3, a part de quantificar l'expressió de DDR1 total i les 5 isoformes de DDR1 també es va analitzar l'expressió de MAG i OLIG2. L'expressió d'aquests gens MAG i OLIG2 es va analitzar utilitzant els *pre-designed Assays-on-Demand* d'Applied Biosystems (Hs00159000_m1 i Hs00377820_m1, respectivament).

L'expressió de l'RNAm de cada mostra es va calcular d'acord amb la metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$ recomanada per la casa comercial Applied Biosystems.

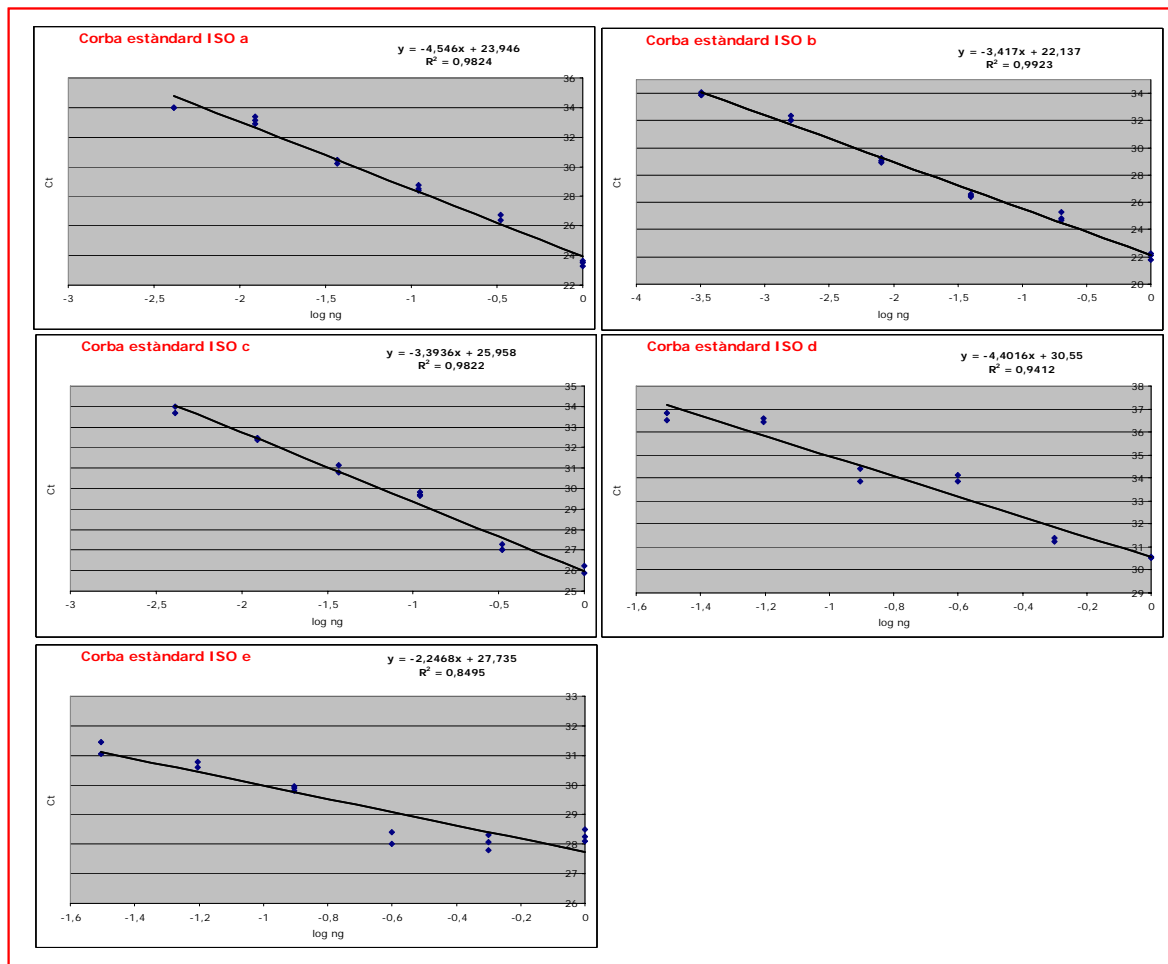


Figura 2. Corbes estàndard de cadascun dels *assays-by-design* específics de les 5 isoformes de DDR1 d'acord amb les instruccions de validació d'assajos d'Applied Biosystems. Cal destacar que tots els assajos assoleixen una R² mitjana de 0,9, tenint en compte que un assaig perfecte presenta una valor d' R² = 1.

4.2.5. Genotipat

Un total de 22 SNP distribuïts al llarg de >20 Kb del locus DDR1 van ser seleccionats a partir del rastreig mutacional realitzat prèviament pel nostre grup (C. Virgos, 2004) i de la base de dades de Celera (<http://www.celeradiscoverysystem.com>). D'aquests 22 SNP només 15 complien les condicions del sistema d'anàlisi de Sequenom Inc. Es va incloure un SNP addicional del gen veí GTF2H4.

Material i mètodes

La mostra de l'estudi 1 (N=1.004 individus) es va genotipar a la plataforma CEGEN de Santiago de Compostel·la. Es va utilitzar el sistema MassARRAYs (Sequenom Inc.) tal com està descrit (Costas et al., 2005).

Com a control de qualitat es va genotipar dues vegades l' SNP rs1049628 utilitzant l'assaig MassARRAY i també per una altra metodologia (SNPlex, Applied Biosystems) i la concordança va ser del 100%.

4.2.6. Seqüenciació

Per tal de comprovar l'especificitat i correcta discriminació dels 5 Custom Taqman Gene Expression Assays per a les isoformes de DDR1 es va verificar per seqüenciació que el producte d'RT-PCR a temps real de cada assaig correspon a la isoforma específica de DDR1.

Es va seqüenciar el producte d'RT-PCR a temps real dels 5 assaigs de DDR1 de 2 mostres de cDNA obtingudes de les línies cel·lulars oligodendroglials humanes HOG16 i MO3.13. En la reacció de seqüenciació es va utilitzar l'equip *dye-labelled Dideoxy Terminator Cycle Sequencing* (CEQ DTCS, Beckman Coulter) i els primers descrits en la taula 1. Els productes de PCR es van purificar per precipitació amb etanol. Les reaccions es van seqüenciar en un CEQ2000 DNA Analysis System (Beckman Coulter). La informació detallada de la tècnica està en l'annex 1.

Taula 1. Primers i sondes de les isoformes de DDR1

Assaig	Sonda TaqMan	Primer TaqMan Forward	Primer Taqman Reverse	Cadena DNA
DDR1a	ccactgtaggcagagcc	gctccctgtgtccccaat	ggcttctcaggctccatagtc	Reverse
DDR1b	ctctcggtgctgctc	ctccctgtgtccccaatgg	gcggtaggctggattga	Forward
DDR1c	cagcttctcctgttctc	ccagatgccaccaagaatgc	tcgacatgatcttcacctttcag	Forward
DDR1d	caggtgcaccagagcc	gctccctgtgtccccaat	gggtgtcgacctcaca	Reverse
DDR1e	ctcctcagcaaggctctag	tctggcggctgcactg	gtgcaccagagccattgg	Forward

4.2.7. Tècnica d'hibridació in situ

Preparació de la sonda

Per a la síntesi de la sonda sentit i la sonda antisentit, es va utilitzar un fragment de 911 pb de DNAC corresponent a la isoforma DDR1b humana clonada en un plasmidi pGEM-T (cedit pel doctor T. S. Ganesan, ICRF Laboratories, Institute of Molecular

Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK). La sonda sentit es va obtenir a partir de la linearització del plasmidi amb l'enzim *Nco*I i la posterior transcripció amb la polimerasa RNA SP6 (Megascript kit SP6, Ambion Inc). Paral·lelament, la sonda antisentit es va obtenir per linearització del plasmidi amb l'enzim *Not*I i la incubació amb la polimerasa RNA T7 (Megascript kit T7, Ambion Inc). Les sondes transcrites es van marcar amb digoxigenina-UTP (Roche Diagnostics).

Protocol d'hibridació in situ

Es va utilitzar el mateix protocol d'hibridació in situ descrit anteriorment (Alcántara et al., 1998; Franco-Pons et al., 2006) (vegeu l'annex 2) i que breument consisteix en els passos següents:

1. Preparació del teixit: Les seccions van ser desparafinades segons el protocol estàndard de desparafinar, que consisteix en una bateria de xilol I (10 min) + xilol II (5 min) + etanol absolut (5 min) + etanol 90% (5 min) + etanol 70% (5min) + aigua destil·lada (5 min). Les seccions fresques es van fixar amb paraformaldehid al 4% amb 0,1M de tampó fosfat (PFA 4%-PB 0,1M) tota la nit a 4°C.
2. Pretractament del teixit: Les seccions es van permeabilitzar amb Tritó X-100 al 0,5% i l'activitat peroxidasa endògena es va inactivar amb aigua oxigenada al 2%. A continuació es van tractar les seccions amb HCl 0,2N, es van postfixar amb PFA al 4% i es van bloquejar amb glicina al 0,2%.
3. Prehibridació del teixit: Les seccions es van prehibridar durant 3 hores a 60-61 °C amb el tampó d'hibridació (formamida desionitzada al 50% + solució salina de citrat sòdic (SSC) al 5X + SDS a l'1% + 250 µg/ml d'RNAt de llevat + 250 µg/ml de DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat).
4. Hibridació del teixit: Les seccions es van hibridar durant 14-16 h a 60-61 °C amb les sondes sentit i antisentit anteriorment descrites a una concentració de 1.000 µg/ml.
5. Rentats d'elevada astringència: Després de la hibridació, les seccions es van sotmetre a rentats d'astringència durant 1 hora i 30 minuts a 55 °C amb formamida al 50% i SSC al 5%, i 30 minuts amb NaCl 0,5M i Tris-HCl 10mM. Per tal d'eliminar fragments de sonda sense hibridar es van sotmetre les

seccions a un tractament amb RNasa A (Roche Diagnostics) a una concentració de 100 µg/ml durant 30 minuts a 55 °C.

6. Immunohistoquímica: Les seccions es van rentar i bloquejar amb una solució TBS al 0,1% Tween 20 i sèrum normal de cabra a l'1% (NGS 1%) durant 2 hores a temperatura ambient i posteriorment es van incubar tota la nit a 4 °C amb una solució composta per TBS al 0,1% Tween 20 + NGS 1% + anticòs antidigoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina a una dilució final de 1/2.000 (Roche Diagnostics).
7. Revelat: Les seccions es van rentar diverses vegades i es va detectar l'activitat fosfatasa alcalina amb una solució reveladora composta per tetrazolium nitroblue (NBT) i 5-brom-4-clor-3-indoïl-fosfat (BCIP) (Roche Diagnostics). La duració del revelat total d'aquestes seccions va ser de 6 a 8 hores per a les seccions parafinades i de 18 a 21 hores per a les seccions fresques. Un cop revelades les seccions es van rentar i muntar amb Mowiol (Calbiochem).

4.2.8. Immunohistoquímica

El procediment detallat de la tècnica per als talls frescos i per als talls parafinats de cervell estan descrites en els annexos 3 i 4, respectivament. Els talls frescos es van sotmetre a una fixació durant tota la nit en PFA al 4% en PB 0,1 M. Les seccions parafinades de còrtex occipital humà es van desparafinar amb xilols, es van rehidratar amb una bateria de dilucions decreixents d'etanols (del 100% fins al 50%) i finalment es van submergir en aigua destil·lada. A continuació es va procedir al desemascament antigènic de les seccions parafinades mitjançant un procés de xoc tèrmic amb tampó citrat pH 6 (Dako Corporation) durant 4 minuts a 95 °C i a una inactivació de l'activitat peroxidasa endògena amb metanol al 10% amb un 0,3% H₂O₂. En aquest punt totes les seccions, tant fresques com parafinades, van seguir el mateix procediment. Les seccions van ser bloquejades amb glicina al 0,2 M i lisina al 0,2 M durant 2 hores i incubats tota la nit a 4 °C amb l'anticòs primari diluït amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i un 8% de sèrum humà. Un cop finalitzada la incubació amb l'anticòs primari es van rentar les seccions amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i es van incubar amb el corresponent anticòs secundari biotinilat diluït amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i un 8% de sèrum humà durant 1 hora a temperatura ambient. La dilució

emprada de l'anticòs secundari va ser 1/200. Després de diversos rentats amb PBS 0,1M Tritó 0,5% es van incubar les seccions durant 1 hora i protegits de la llum amb una solució que contenia el complex avidina-biotina (Kit ABC, Vector). Aquest complex avidina-biotina es va preparar 30 minuts abans d'utilitzar-se a una dilució 1/200 en una solució amb PBS 0,1M i sèrum fetal boví al 0,1%. A continuació es van rentar les seccions amb PB 0,1M i es van revelar amb una solució composta pel cromogen DAB al 0,025%, tampó fosfat (PB) pH 7,4 i peròxid d'hidrògen al 0,01%. Un cop revelades les seccions es van rentar amb PBS 0,1M i es van muntar en medi Mowiol. Les característiques dels anticossos emprats estan detallats en la taula 2.

Taula 2. Descripció dels anticossos utilitzats en l'estudi 2

Tipus d'anticòs	Diana	Marcador de	Anticòs	Dilució
Anticossos primaris	DDR1 N-terminal (AA51-60)	-	WF. Vogel (Abduhlhussein et al. 2004)	1:50
	DDR1 C-terminal (AA894-913)	-	SC-532 (Santa Cruz Biotechnology, Madrid)	1:50
	MBP	Fibres de mielina	AB980 (Chemicon)	1:500
	GFAP	Astròcits	Z0334 (Dako, Barcelona)	1:500
	APC	Oligodendròcits	OP80 (Calbiochem, Barcelona)	1:10
	Factor Von Willebrand	Cèl·lules endotelials i megacariòcits	M0616 (Dako, Barcelona)	Prediluit
Anticossos secundaris	Rabbit anti goat	-	BA-5000 (Vector, Barcelona)	1:200
	Goat anti rabbit	-	BA-1000 (Vector, Barcelona)	1:200
	Horse anti mouse	-	BA-2000 (Vector, Barcelona)	1:200

4.2.9. Doble marcatge d'immunohistoquímica

Per dur a terme la tècnica de doble immunohistoquímica es va seguir el protocol descrit per Ferrer i col·laboradors (Ferrer et al., 1993). Tal com es descriu a l'apartat anterior, les seccions van ser incubades tota la nit amb la dilució específica per l'anticòs primari i es va visualitzar la immunoreacció amb el cromogen DAB. Un cop revelades les seccions es van rentar diverses vegades amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i

Material i mètodes

es van incubar amb la dilució específica del segon anticòs primari a 4 °C durant tota la nit. Posteriorment, es van rentar les seccions amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i es van incubar amb el corresponent anticòs secundari biotinitat (dilució 1/200) durant 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient. Les seccions es van rentar amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i es van revelar amb una solució composta per clorhidrat de benzidine al 0,01%, peròxid d'hidrògen al 0,05% en 0,01M de tampó fosfat i nitroprussiat de sodi al 0,03% (pH 6,5). Finalment, les seccions es van deshidratar i muntar en DPX. El primer anticòs primari es visualitza com un precipitat de color marró i el segon anticòs primari, com un precipitat granular de color blau. Les característiques dels anticossos emprats estan en la taula 1.

4.2.10. Doble marcatge d'hibridació in situ de DDR1 i immunohistoquímica

Per dur a terme aquesta tècnica es requereix de seccions prèviament hibridades amb la sonda de DDR1 antisentit i revelades amb NBT/BCIP. Sobre aquestes seccions es va realitzar la tècnica d'immunohistoquímica. Els talls hibridats es van rentar amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i es van incubar tota la nit a 4 °C amb la dilució específica de l'anticòs primari en una solució amb PBS 0,1M Tritó 0,5% i sèrum fetal de boví al 8%. La resta del procediment és igual al descrit a l'apartat 4.2.4. Les característiques dels anticossos emprats estan en la taula 2.

4.2.11. Cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars HOG16 i MO3.13 van créixer amb les mateixes condicions descrites per Buntinx (Buntinx et al., 2003). Aquestes cèl·lules es van cultivar en medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, 50 U/ml de penicil·lina i 50 µg/ml d'estreptomicina (Invitrogen) i es van incubar a 37 °C amb una humitat relativa del 100% i una concentració de CO₂ del 5%.

La línia cel·lular HUVEC es va cultivar amb les mateixes condicions descrites per Camacho (Camacho et al., 1995) en un medi 199 que contenia 20% de sèrum fetal boví suplementat amb 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvat sòdic, 100 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml estreptomicina, 10 USP/ml heparina i 30 µg/ml factor de creixement de cèl·lules endotelials.

Les cèl·lules de la línia HCT116 van créixer en un medi RPMI 1640 suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 400 U/ml penicil·lina i 40 U/ml gentamicina.

En totes les línies cel·lulars es va descartar la presència de micoplasmes amb l'equip comercial EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries).

4.3. Anàlisi de dades

4.3.1. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística de l'estudi 1 el va realitzar el doctor Xavier Costas a la plataforma CEGEN de Santiago de Compostel·la. Es van utilitzar els programes següents:

- Haploview 3.0: Anàlisi de l'equilibri Hardy-Weinberg, desequilibri de lligament i les associacions al·lèliques dels SNP individuals.
- COCAPHASE: Càlcul de freqüències haplotípiques i estudi d'associació d'haplotips.
- STRUCTURE 2.0: Anàlisi d'estratificació de la mostra.

Per als estudis 1 i 3 es van realitzar amb el paquet estadístic SPSS versió 13.0 les anàlisis següents:

- Anàlisi de regressió lineal: Per comparar els nivells d'expressió de l'RNAm entre grups (estudi 1 i estudi 3).
- Correlació de Pearson: Per analitzar l'existència de relació lineal entre les 5 isoformes de DDR1, DDR1 total, MAG i OLIG2 (estudi 3).

4.3.2. Anàlisi d'imatge i comptatge cel·lular

Totes les seccions cerebrals es van analitzar amb un microscopi Nikon Eclipse 600 i les seccions marcades positivament es van fotografiar digitalment a diferents augments, utilitzant objectius de baix augment (4X i 10X) per a la visualització general del teixit, i objectius d'alt augment (de 20X fins a 100X) per a estructures o cèl·lules més detallades.

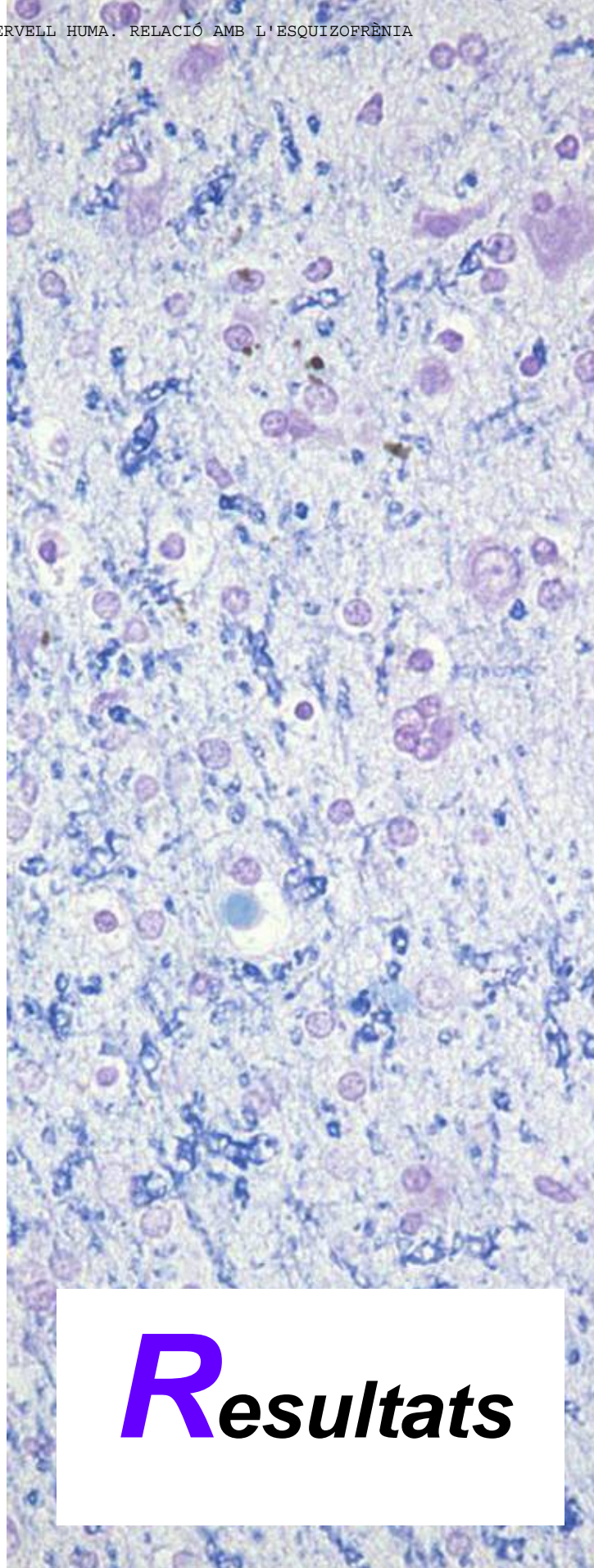
Per a l'estudi 2, la quantificació de les cèl·lules positives per DDR1 i els marcadors histològics APC i GFAP es van realitzar amb el programari AnaliSYSTEM (Soft Imaging System) seguint-ne les instruccions. Els resultats es van expressar com a

nombre cèl·lules/mm² (mitjana \pm desviació estàndard del comptatge independent de 3 persones del laboratori).

4.3.3. Identificació de seqüències senyal de transport d'RNA

La identificació de seqüències A2RE en els diferents transcrits de DDR1 el va realitzar el doctor Xavier Costas a la plataforma CEGEN de Santiago de Compostel·la. Es va utilitzar com a aproximació una matriu posicional de pes o d'importància (PWM, de l'anglès *position weight matrix*). PWM assigna dintre de la seqüència de referència un valor de pes o d'importància a la posició de cada nucleòtid, i es basa en la seva freqüència en la posició determinada. La puntuació total de cada seqüència particular s'obté pel sumatori dels corresponents valors de pes en cada posició. Per al nostre PWM es van seleccionar 5 seqüències A2RE de transport d'RNA en els oligodendròcits identificats en els gens MBP, MOBP, CA2, MAPT i APP (Barbarese et al., 1999). Es va utilitzar el programa Target Explorer (Sosinsky et al., 2003; http://trantor.bioc.columbia.edu/Target_Explorer/) i es van considerar les freqüències observades en aquestes seqüències com a nucleòtids a priori. Es va considerar com a punt de tall quan la diana assolia la mínima puntuació en les 5 seqüències A2RE considerades.

A partir de la web Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT; <http://rsat.ulb.ac.be/rsat>; van Helden, 2003) on hi ha una eina de modelatge de DNA es va intentar identificar la presència de la seqüència d'11 nucleòtids A2RE. Aquesta eina permet realitzar en la seqüència aparellada canvis d'aminoàcid, insercions i delecions. RSAT també es va utilitzar per generar més de 3.000 seqüències a l'atzar de la mateixa longitud i composició nucleotídica que el transcrit de DDR1 NM_013993. Totes aquestes seqüències es van analitzar de la mateixa manera que els transcrits de DDR1, per tal d'estimar la probabilitat de trobar per casualitat possibles seqüències de transport a través de les dues metodologies.



***R*Resultats**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

5.1. ESTUDI 1. Estudi d'associació del gen receptor domini discoidina 1 (DDR1) en l'esquizofrènia

5.1.1. Antecedents

L'aproximació a l'estudi de DDR1 en l'esquizofrènia es va iniciar l'any 1998, mitjançant la identificació de variants en el gen DDR1, en una mostra de 100 malalts esquizofrènics i la possible associació a la malaltia. Els resultats d'aquest estudi van constituir la tesi doctoral defensada l'any 2004 per la biòloga del nostre grup Carme Virgos. En total es van identificar 17 variants de DDR1, de les quals 16 eren SNP i 1, una deleció. Cal remarcar que 10 de les variants identificades no estaven descrites a la dbSNP i només 2 SNP (g13691A>G i g13674C>T) comportaven un canvi d'aminoàcid. Aquests es van triar per construir un haplotip per a l'estudi d'associació cas-control on la mostra consistia en 250 pacients esquizofrènics i 250 controls. A l'haplotip, a més, es van incloure 2 SNP (rs2229933 i rs8408) addicionals localitzats a prop dels extrems 5' i 3' del gen DDR1 i 1 SNP (rs1052693) del gen GTF2H4. Tots els SNP presentaven una freqüència al·lèlica major de 0,1 per l'al·lel minoritari i cap s'allunyava de l'equilibri Hardy-Weinberg. En la figura 1 es mostra la localització i posició relativa dels 5 SNP analitzats.

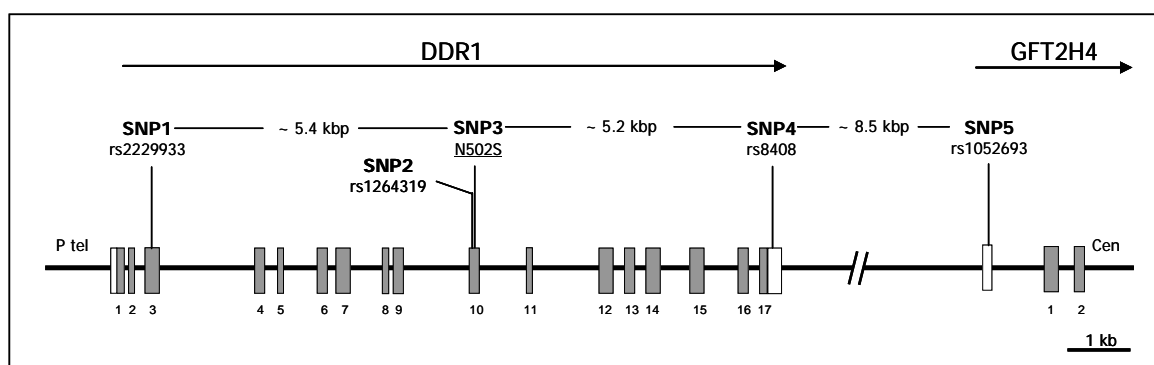


Figura 1. Esquema de les localitzacions dels 5 SNP estudiats en les regions DDR1 i GTF2H4. Les fletxes indiquen el sentit de la transcripció. Els rectangles blancs i grisos corresponen a les regions 5' i 3' UTR i exons, respectivament. Les línies verticals indiquen les posicions relatives per als diferents SNP. Nomenclatura dels SNP d'acord amb la dbSNP. P tel, p telòmer; Cen, centròmer (C. Virgos; Tesi doctoral 2004).

Resultats Estudi 1

No es van trobar diferències estadísticament significatives en la distribució genotípica o al·lèlica dels 5 SNP de l'haplotip en comparar pacients esquizofrènics amb controls. Tampoc es va trobar cap tipus d'associació dels 5 SNP genotipats amb cap variable clínica considerada, com el subtipus d'esquizofrènia, el tipus d'inici, el tipus i l'evolució de la malaltia, els antecedents familiars i el sexe. Cap de les variants va tenir efecte sobre l'edat d'inici de la malaltia.

En l'anàlisi d'haplotips no es van detectar diferències estadísticament significatives entre casos i controls. Malgrat tot, l'anàlisi de distribució de freqüències haplotípiques va detectar una major diversitat d'haplotips, estadísticament significativa, en els malalts més que en els controls. Tant en malalts com en controls es va observar que la quasi totalitat (>93%) de la distribució haplotípica es donava per 3 combinacions al·lèliques, i l'haplotip majoritari estava compost per l'al·lel més comú de cada locus. La resta d'haplotips estaven en freqüències menors a l'1,5%.

La proximitat física dels 5 SNP analitzats explica que en ambdós grups hi hagués un fort desequilibri de lligament (LD) entre els marcadors. En controls es va veure que ISNP3 (g13691A>G; N502S) presentava un fort LD amb els SNP1, SNP2, SNP4 i moderat amb l'SNP5. Mentre que en malalts, l'SNP3 presentava una associació debilitada amb la resta de variants.

L'anàlisi genètica d'estratificació de la mostra que es va fer pel mètode de Pritchard no va mostrar l'existència de subpoblacions en la mostra analitzada. Es van genotipar un total de 25 marcadors bial·lèlics escampats per diferents cromosomes amb una freqüència de l'al·lel minoritari >10%.

5.1.2. Objectius

Partint dels resultats anteriorment descrits ens vam plantejar el objectius següents:

1. Ampliar l'estudi d'associació cas-control en nombre d'individus estudiats i en nombre d'SNP en l'haplotip.
2. Analitzar l'expressió d'RNAm de DDR1 en cervell humà.
3. Analitzar si hi ha variació en el nivells d'expressió d'RNAm de DDR1 en PBL de 30 pacients esquizofrènics d'acord amb el seu genotip per a la variant rs1049623.

5.1.3. Resultats

Anàlisi d'associació de DDR1 entre casos i controls

Per tal de valorar si l'haplotip de DDR1 confereix risc per a l'esquizofrènia es va realitzar un estudi d'associació cas-control. En aquest estudi es van incloure un total de 16 SNP que cobreixen aproximadament 20 Kb del gen DDR1 i que estan en un bloc (figura 2). Tots els SNP inclosos en l'anàlisi estan en equilibri Hardy-Weinberg. Tal com es pot veure a la figura 3, d'aquests 16 SNP, 8 van ser identificats prèviament en l'anàlisi mutacional de DDR1 realitzat per la doctora Carme Virgos; i els 8 SNP restants provenen de la base de dades pública dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

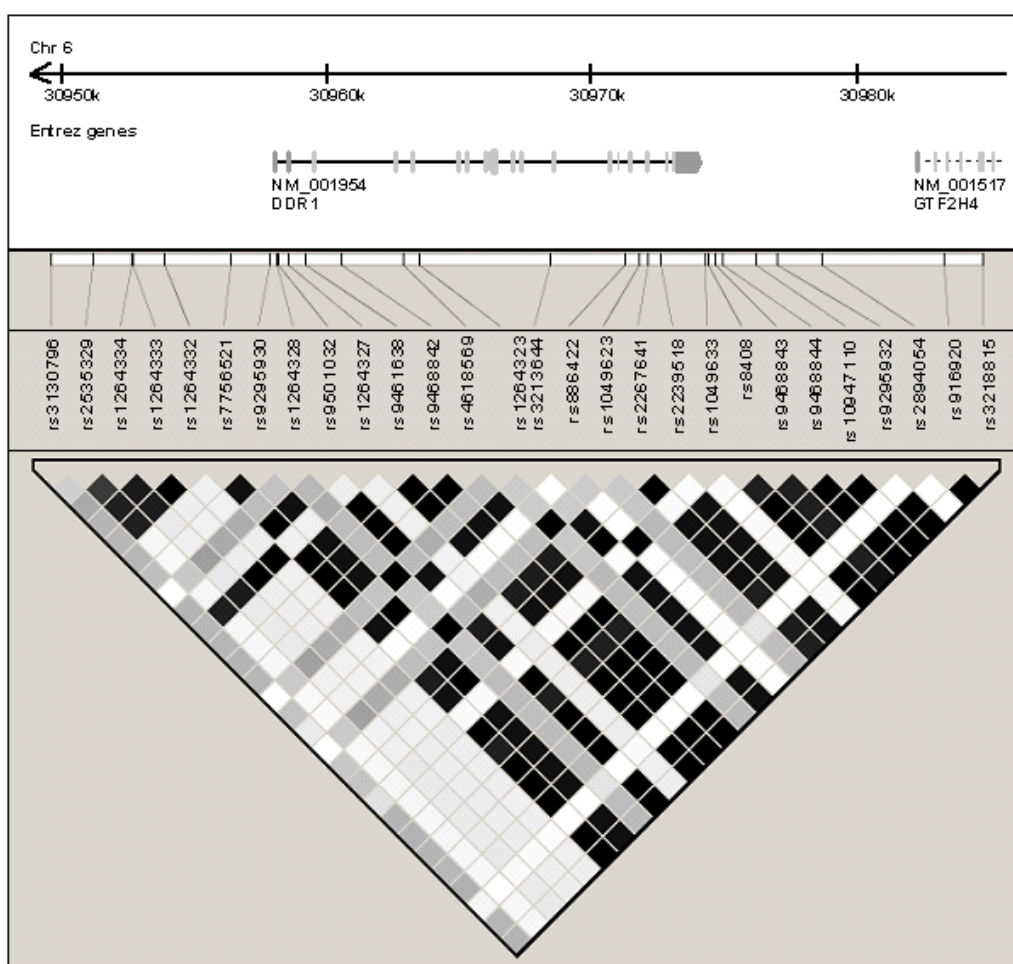


Figura 2. Gràfic d'LD d'un segment d'aproximadament 40 Kb al voltant de DDR1. Les dades provenen de HapMap phase II i es van analitzar amb el programa Haploview. Tota la regió es localitza en un bloc haplotípic segons la definició de Gabriel et al. i el programa Haploview. Els quadrats representen els valors d' r^2 , els més foscos representen els valors r^2 més alts.

Resultats Estudi 1

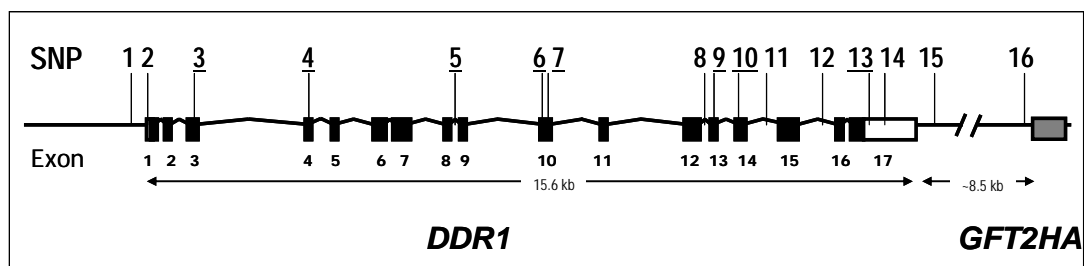


Figura 3. Posició relativa dels 16 SNP de l'haplotip del gen DDR1 humà escollit per a aquest estudi. Esquema de la localització dels 16 SNP d'acord amb l'estructura genòmica de DDR1 de la base de dades Vega Sanger. Per al gen GTF2H4 només es visualitza l'exó 1. Cal destacar l'SNP7 com a nova variant no reportada prèviament.

L'anàlisi d'associació cas-control entre les 16 variants analitzades i la malaltia va resultar positiva per l'SNP9 (rs1049623 A>G), que es localitza a l'exó 13 del gen DDR1, amb una OR=1,44 (IC 95%: 1,15-1,79) i una significació ajustada de $P=0,0016$ (vegeu la taula 1). L'anàlisi de permutacions per confirmar que no fos un fals positiu (100,000 permutacions) va mostrar que només l'SNP9 conservava la significació estadística amb una $P=0,0123$. També es va observar un efecte dosi dependent entre l'SNP9 i l'esquizofrènia, de forma que els portadors homozigots GG presenten una OR=2,26 (IC 95%: 1,30-3,91), mentre que els heterozigots GA presenten una OR=1,34 (IC 95%: 1,00-1,79). L'OR dels homozigots AA es va assumir com a 1.

L'estimació i l'anàlisi d'associació dels haplotips es va fer pel mètode de *sliding window* utilitzant 3 SNP consecutius. En la taula 2 es detallen els valors de significació (P) obtinguts de cadascun dels haplotips estimats. D'aquests resultats es van trobar 3 haplotips significatius amb valors de P no ajustats $< 0,05$. Aquests tres haplotips estan compostos pels SNP següents: SNP4-SNP5-SNP6, SNP8-SNP9-SNP10 i SNP9-SNP10-SNP11. L'haplotip format pels SNP 9-10-11 (rs1049623, rs2267641 i rs2239518) que és el que presenta l'associació més forta, va mantenir l'associació significativament després d'ajustar l'anàlisi per permutació ($P=0,0136$). Per tant, l'associació positiva de l'SNP9 individualment es confirma per l'haplotip 9-10-11.

Taula 1. Freqüències al·lèliques dels SNP analitzats en el locus DDR1

SNP ID	dbSNP	MFA (casos, controls)	Freqüència (casos, controls)	χ^2	P	P ^a	OR	95%CI
2	rs1264326	G,G	0,966; 0,966	0,008	NS	NS		
3	rs2229933	G,G	0,808; 0,850	5,639	0,0176	0,1159		
4	rs1049622	C,C	0,804; 0,844	5,188	0,0227	0,1573		
5	rs1264320	G,G	0,647; 0,630	0,555	NS	NS		
6	rs1264319	G,G	0,882; 0,895	0,800	NS	NS		
7	Nr	A,A	0,980; 0,980	0,004	NS	NS		
8	rs886422	G,G	0,958; 0,963	0,330	NS	NS		
9	rs1049623	A,A	0,712; 0,779	9,979	0,0016	0,0123	1,43	1,14-1,79
10	rs2267641	A,A	0,850; 0,881	3,935	0,0473	0,2817		
11	rs2239518	C,C	0,852; 0,873	1,731	NS	NS		
13	rs1049628	C,C	0,806; 0,843	4,471	0,0345	0,2080		
14	rs1049633	C,C	0,969; 0,968	0,007	NS	NS		
15	rs8408	T,T	0,806; 0,844	4,614	0,0317	0,1954		
16	rs1052693	C,C	0,805; 0,843	4,529	0,0333	0,2046		

^aValors de P ajustats per 100,000 permutacions; MFA= al·lel més freqüent; Nr= no reportat; SNP1 (rs1264327) es va excloure de l'anàlisi per problemes de genotipat i SNP12 (rs2301755) va resultar monomòrfic en la nostra població d'estudi.

Quan es va estratificar la mostra per sexe es va veure que l'associació entre l'SNP9 i l'esquizofrènia era molt més forta en els homes que no en tota la població analitzada (OR=2,03; IC 95%:1,51-2,73). En l'haplotip 9-10-11 també es va veure incrementada la significació en homes (P=0,0002 ajustada). En el cas de les dones no es va trobar cap tipus d'associació ni d'SNP individualment ni d'haplotip. Tampoc es va trobar cap associació estadísticament significativa amb les variables clíniques i l'SNP9.

Taula 2. Anàlisi estadística d'haplotips a través del mètode de *sliding window* de 3 SNP consecutius

SNP ID	dbSNP	p^a	p^b
2	rs1264326	-	
3	rs2229933	-	
4	rs1049622	0,1623	
5	rs1264320	0,0471	
6	rs1264319	0,0665	
7	Nr	-	
8	rs886422	-	
9	rs1049623	0,0112	
10	rs2267641	0,0037	0,0136
11	rs2239518	0,1147	
13	rs1049628	0,0556	
14	rs1049633	-	
15	rs8408	0,0615	
16	rs1052693	-	

^aValors de P dels haplotips de 3 SNP es mostren al centre; ^bValors de P del millor resultat després d'ajustar amb 100,000 permutacions; Nr= no reportat.

Anàlisi d'expressió de l'RNAm de DDR1 en cervell humà

Tal com s'ha mencionat en la introducció hi ha estudis que observen expressió de DDR1 en cervell murí (Zerlin et al., 1993; Sánchez et al., 1994). Contràriament, tret d'estudis fets amb teixit neoplàsic, la informació d'expressió de DDR1 en cervell humà és escassa. Per això, ens vàrem proposar determinar si en cervell humà l'expressió de DDR1 és important. Vam analitzar per la tècnica d'RT-PCR quantitativa l'expressió de DDR1 en una mostra d'RNA polyA⁺ de cervell humà i en limfòcits de sang perifèrica (PBL) com a cèl·lules control. Es va emprar un assaig de DDR1 que detecta totes les isoformes. Tal com es pot observar a la figura 4, els

nostres resultats van mostrar que en els *pools* d'RNA poly A⁺ de cervell humà l'expressió de DDR1 és 18 vegades superior que en limfòcits (P=0,0001).

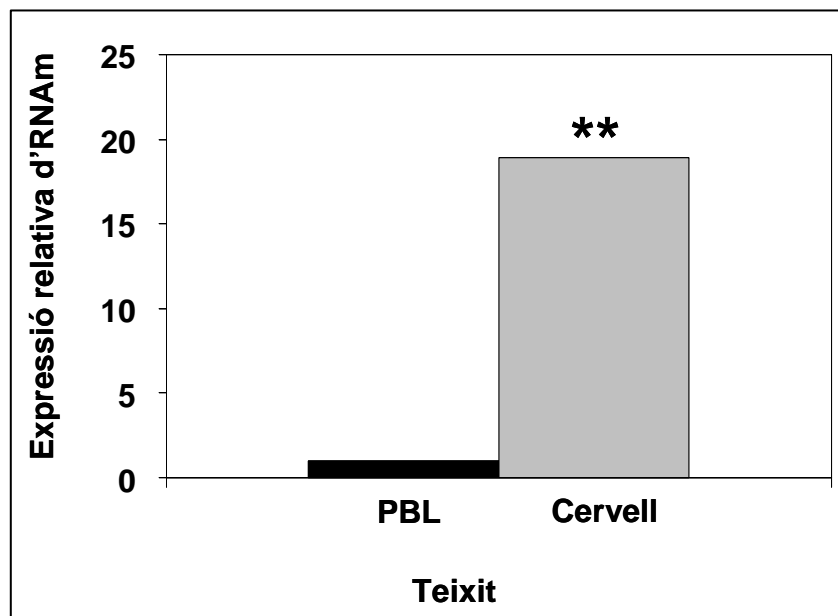


Figura 4. Expressió relativa d'RNAm de DDR1 en cervell humà i en limfòcits de sang perifèrica (PBL). Observem de forma significativa 18 vegades més expressió d'RNAm de DDR1 en cervell que en el *pools* d'RNA de limfòcits (P=0,0001).

Anàlisi d'expressió de l'RNAm de DDR1 en funció del genotip de l'SNP9

Havent observat una associació entre l'al·lel G de l'SNP9 i l'esquizofrènia ens va semblar interessant estudiar l'expressió de DDR1 a partir d'RNAm extret del cervell de pacients esquizofrènics en funció del genotip SNP9. No disposàvem de teixit cerebral dels pacients esquizofrènics de l'estudi 1, però sí que disposàvem d'una alíquota de limfòcits de sang perifèrica de la qual es pot extreure RNA. Per tant, a partir dels limfòcits de 30 pacients esquizofrènics classificats d'acord amb el seu genotip per l'SNP9, es van quantificar les còpies d'RNAm de DDR1 de cadascun d'ells. Es va realitzar una anàlisi de regressió on la variable dependent va ser l'expressió relativa de DDR1 i les variables independents, el sexe, l'edat i el genotip de l'SNP9. Tal com es pot veure a la figura 5, vam observar que els pacients esquizofrènics heterozigots (AG) tenen nivells d'RNA inferiors als homozigots AA. Els homozigots per l'al·lel G (GG) són els individus que presenten menors nivells d'expressió d'RNAm de DDR1. L'anàlisi de regressió va mostrar una associació

Resultats Estudi 1

estadísticament significativa entre l'expressió de DDR1 i l'SNP9 ($P=0,003$). El sexe no va presentar cap tipus de significació ($P=0,085$); malgrat tot, sembla que els homes tendeixin a tenir menors nivells d'expressió de DDR1 en comparació amb les dones (figura 5). L'edat dels pacients tampoc va donar cap associació significativa amb els nivells d'expressió de DDR1 ($P=0,152$).

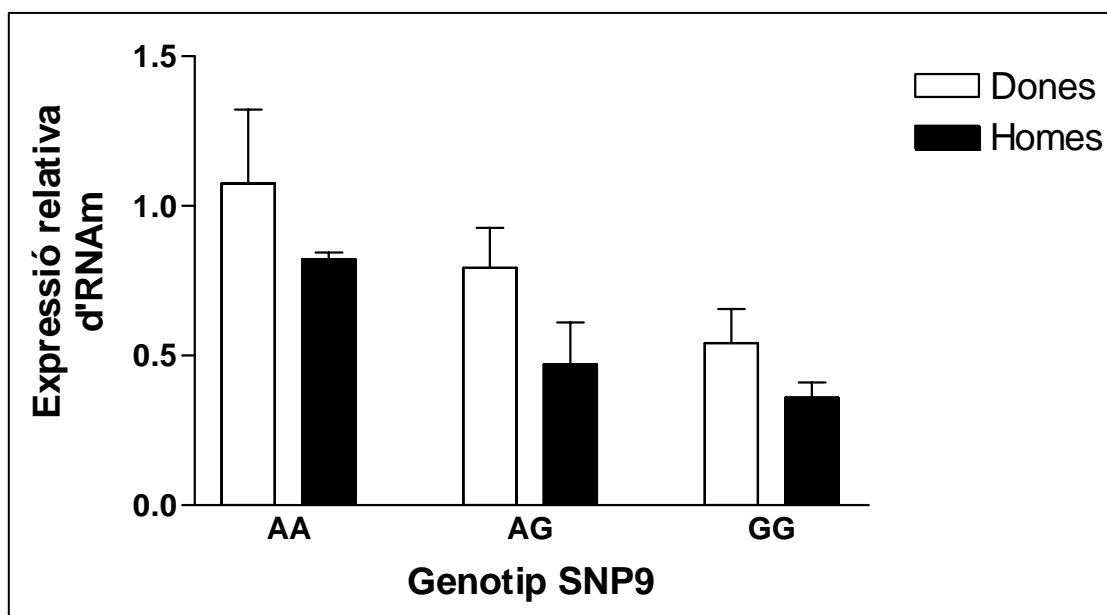


Figura 5. Expressió relativa d'RNAm de PBL de pacients esquizofrènics d'acord amb el sexe i el genotip per l'SNP9. Cada valor individual està calculat respecte la mitjana del valor dels homozigots AA. L'anàlisi de regressió lineal mostra una associació significativa de $P=0,003$ entre l'expressió de DDR1 i el genotip de l'SNP9. S'observa menor nivell d'expressió en homes respecte a les dones. La variable sexe i edat no surten estadísticament significatives dins l'equació ($P=0,085$ i $P=0,152$, respectivament). Els pacients homozigots GG ($N=10$) presenten menor expressió de DDR1 en comparació amb els pacients heterozigots GA ($N=10$), els quals al mateix temps presenten menors nivells d'expressió que els individus homozigots AA ($N=10$, $P=0,003$).

5.2. ESTUDI 2. Expressió de DDR1 en cervell humà

5.2.1. Antecedents

Com ja s'ha comentat en la introducció hi ha bàsicament dos treballs que estudien l'expressió de DDR1 durant el desenvolupament embrionari de cervell de rata i ratolí (Zerlin et al., 1993; Sanchez et al., 1994). L'estudi detallat d'expressió gènica durant el desenvolupament prenatal i postnatal en ratolins es va realitzar en el nostre grup (Neus Franco, tesi doctoral 2006). La determinació del patró d'expressió de DDR1 es va realitzar mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* utilitzant una sonda d'RNA marcada amb digoxigenina i el fenotip de les cèl·lules que expressen DDR1 es va realitzar per la tècnica de doble marcatge d'hibridació *in situ* i immunohistoquímica (Franco-Pons et al, 2006). Els resultats d'aquest estudi es poden resumir com:

- Patró d'expressió difús de DDR1 en les àrees proliferatives durant l'embriogènesi (edat embrionària E18 dies) del cervell de ratolí.
- Patró d'expressió cel·lular definit de DDR1, majoritàriament en els tractes de la substància blanca, durant l'etapa postnatal del cervell de ratolí.
- Coincidència espacio-temporal del patró d'expressió cel·lular definit amb el procés de la mielinització.
- Col·localització de les cèl·lules positives per DDR1 amb els marcadors immunohistoquímics d'oligodendròcits madurs carnosina i APC.

Els resultats obtinguts en el model murí va plantejar un possible paper funcional de DDR1 en el procés de mielinització.

5.2.2. Objectius

L'evidència de la possible implicació de DDR1 en el procés de mielinització observat en el model murí ens va conduir a estudiar l'expressió del receptor DDR1 en cervell humà amb els objectius següents:

1. Detectar la presència i distribució de l'RNAm de DDR1 per la tècnica d'hibridació *in situ* en talls de còrtex humà.
2. Detectar la presència i distribució de la proteïna DDR1 en talls de còrtex humà.
3. Fer estudis de col·localització amb marcadors específics de cèl·lules de cervell per delimitar els tipus cel·lulars que expressen DDR1.

Resultats Estudi 2

5.2.3. Resultats

Expressió d'RNAm en seccions occipitals de cervell

Per tal de determinar el patró d'expressió de DDR1 en cervell humà es va realitzar la tècnica d'hibridació *in situ* (ISH) en seccions occipitals de còrtex cerebral proveïts per l'SMRI. No es va detectar cap tipus de senyal quan es va utilitzar la sonda de DDR1b sentit com a control negatiu.

La hibridació *in situ* amb tractament amb RNasa A ens mostrava un marcatge de DDR1b en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, tant de la substància gris com de la substància blanca (vegeu figura 1).

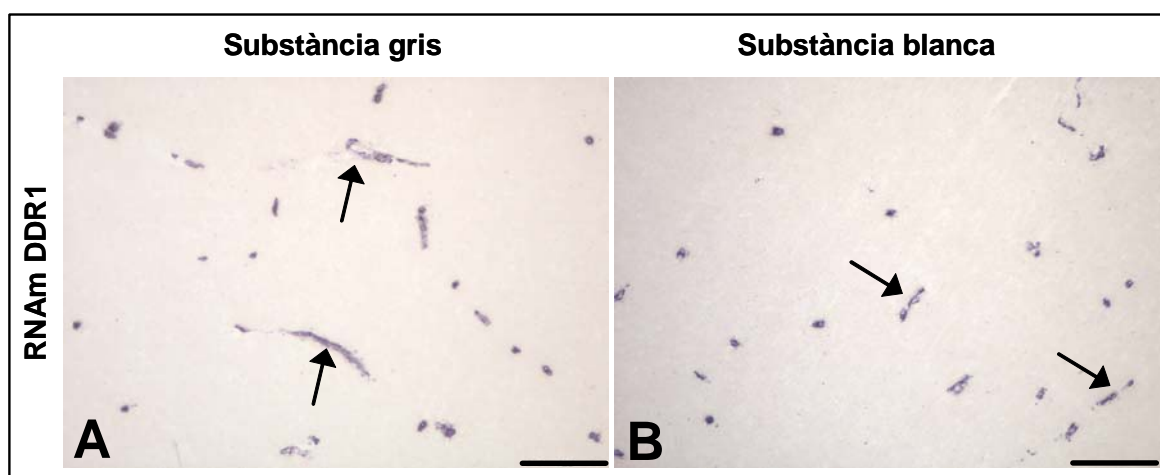


Figura 1. Hibridació *in situ* de teixit fresc de còrtex occipital humà. Observem un intens i exclusiu marcatge de vasos sanguinis (indicat amb fletxes) tan en la substància gris (A) com en la substància blanca del teixit (B). Barra d'augment: 100 µm.

Per tal de comprovar l'especificitat de la sonda es va realitzar una detecció simultània d'RNA i proteïna de DDR1 en un mateix tall cerebral mitjançant un doble marcatge per hibridació *in situ* / immunohistoquímica. Tal com es pot visualitzar en la figura 2 el senyal obtingut amb la sonda d'RNAm de DDR1 col·localitza amb el precipitat de color marró resultant de la immunohistoquímica amb un anticòs que reconeix la part extracel·lular de DDR1 (DDR1 C-terminal, vegeu característiques de l'anticòs en taula 2 de la secció de Material i mètodes). Com que el marcatge obtingut amb la ISH era compatible amb cèl·lules endotelials es va realitzar de forma paral·lela un doble marcatge per hibridació *in situ* / immunohistoquímica utilitzant com anticòs un marcador de cèl·lules endotelials com és el factor von Willebrand o

F8. La col·localització obtinguda ens va confirmar l'expressió de DDR1b en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis en cervell humà (vegeu figura 2).

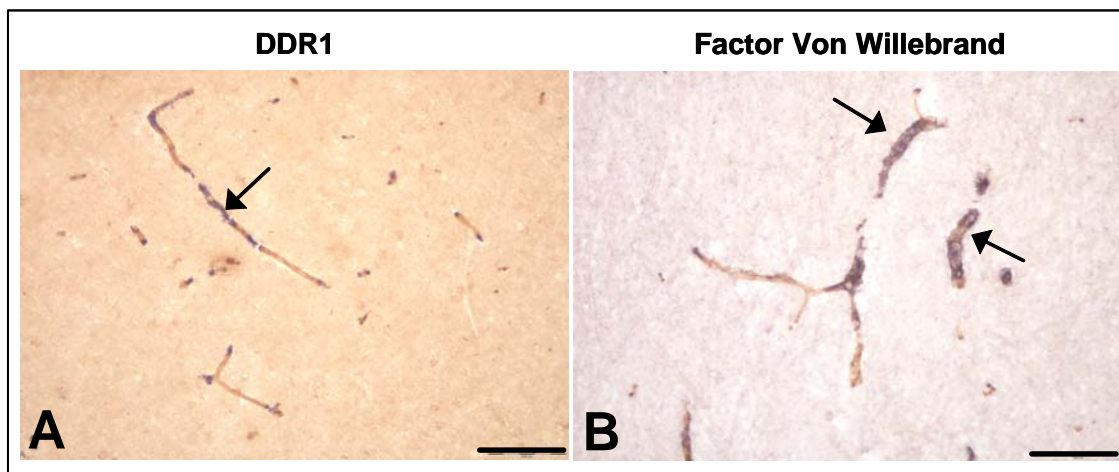


Figura 2. Marcatge combinat d'hibridació *in situ* de DDR1 i immunohistoquímica pels marcadors DDR1 i Factor Von Willebrand en còrtex occipital humà. **(A)**. La colocalització observada del RNAm de DDR1 (blau) amb l'anticòs C-terminal de DDR1 (marron) va confirmar l'especificitat de la sonda. **(B)**. La colocalització de DDR1 amb el marcador Factor Von Willebrand (fletxes) confirma el marcatge de cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis tan de la substància gris com de la substància blanca. Barra d'augment: 100 µm.

La sonda de 911 pb que es va utilitzar per realitzar la tècnica d'hibridació *in situ* es correspon als exons 9 fins al 14. Aquests exons reconeixen les regions transmembrana (exó 9), juxtamembrana (exons 10-12) i tirosina quinasa (exons 13-14). Tal com s'ha comentat en la introducció és en la regió juxtamembrana on tenen lloc la majoria de processos d'empalmament (de l'anglès, *splicing*) alternatiu que generen les diferents isoformes. A la figura 3 podem veure que la nostra sonda de 911 pb de DDR1b no és 100% homòloga a la resta d'isoformes.

La tècnica d'hibridació *in situ* inclou un pas de tractament amb RNAsa A. És ben conegut que l'RNAsa A és un potent hidrolitzador d'RNA de cadena simple (RNAss). El fet que la nostra sonda DDR1b no és 100% homòloga per a totes les isoformes de DDR1 ens va plantejar la qüestió de realitzar la tècnica d'ISH obviant aquest pas d'RNAsa A i així poder comprovar la possibilitat que hi hagués expressió de DDR1 isoforma dependent de teixit. Les imatges obtingudes de la ISH sense tractament amb RNAsa A van mostrar que a part del marcatge endotelial hi havia un marcatge de fibres de mielina en la substància blanca (figura 4). Aquest mateix protocol d'ISH

Resultats Estudi 2

sense tractament amb RNAsa A utilitzant la sonda sentit de control negatiu no es va obtenir cap tipus de senyal.

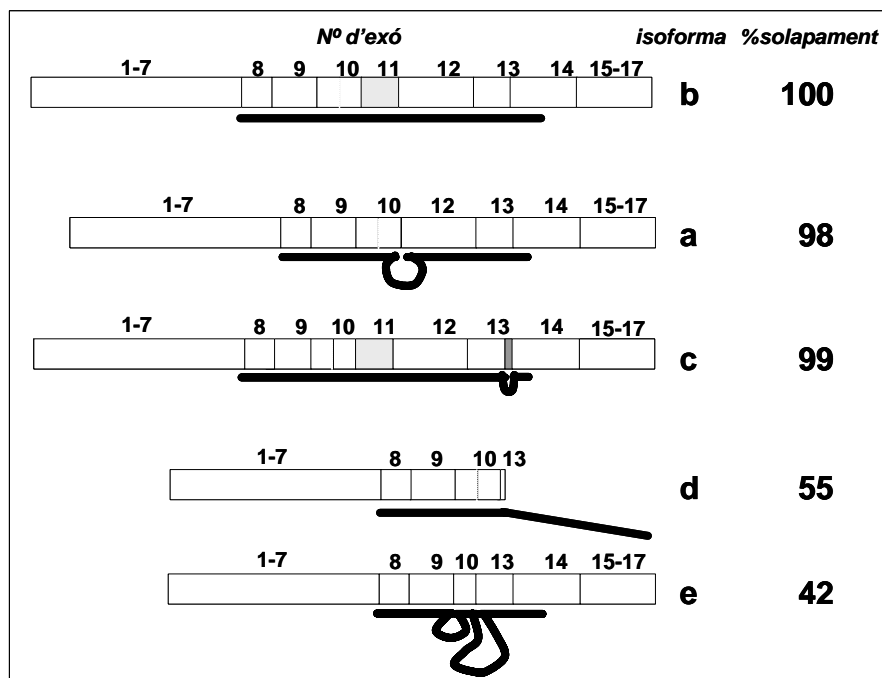


Figura 3. Esquema dels 5 transcrits de DDR1 i el seu solapament respecte la sonda de 911 pb de DDR1b. La sonda de DDR1 reconeix els dominis transmembrana (exó 9), juxtamembrana (exons 10-12) i tirosina quinasa (exons 13-15) del receptor DDR1.

En aquestes seccions hibridades sense RNAsa A també vam realitzar la tècnica de doble marcatge amb els anticossos DDR1 C-terminal i factor von Willebrand (figura 5). No vam trobar col-localització en les fibres de mielina en cap dels dos anticossos i únicament es va observar doble marcatge en les cèl·lules endotelials de la substància blanca i grisa.

Resumint, els nostres resultats són els següents: a) Detecció d'RNAm de DDR1b en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis tan de la substància blanca com grisa i b) Detecció d'un RNAm de DDR1 sensible a l'RNAsa A en les fibres de mielina de la substància blanca.

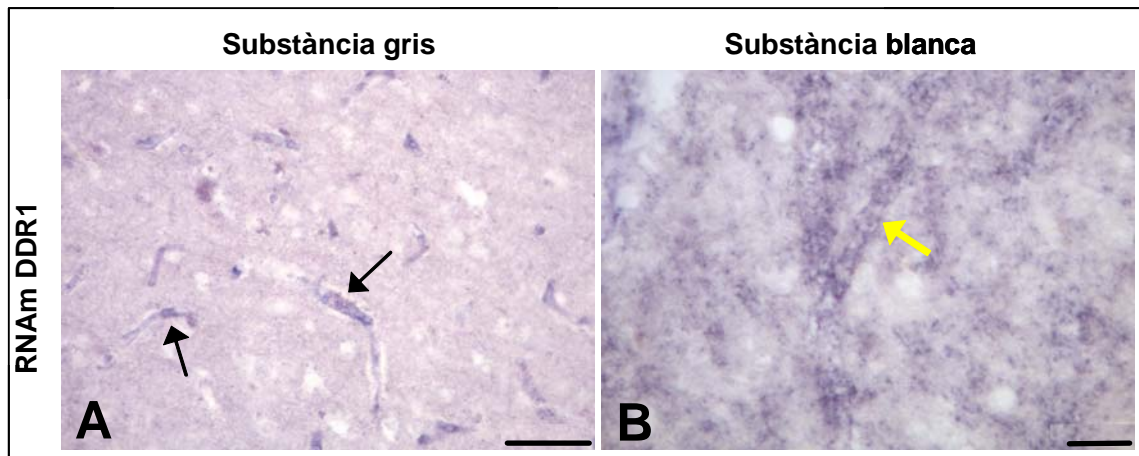


Figura 4. Hibridació *in situ* sense tractament amb RNAsa A en còrtex occipital humà. En la substància gris només trobem marcatge de cèl·lules endotelials (fletxes negres). Cal destacar el marcatge de fibres de mielina (fletxa groga) que s'observa en la substància blanca del teixit. Barra d'augment: 100 µm.

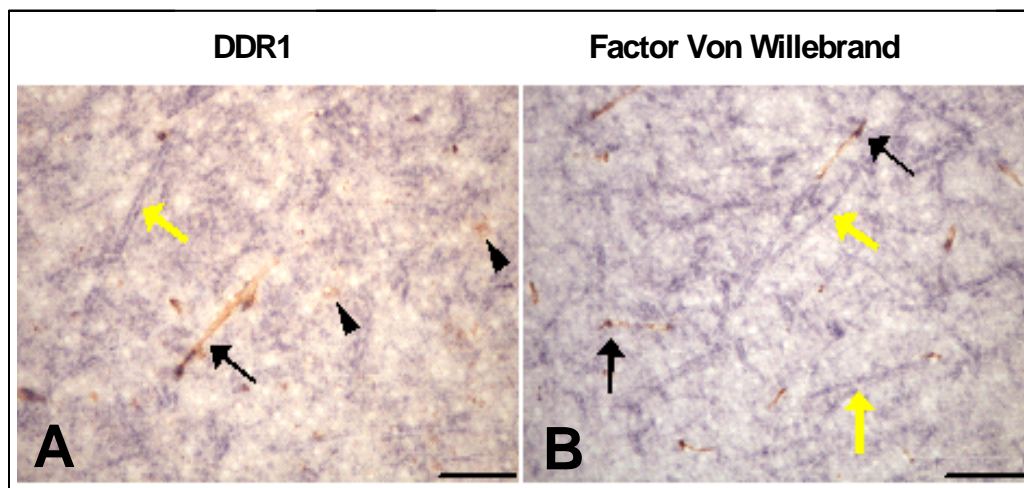


Figura 5. Marcatge combinat d'hibridació *in situ* de DDR1 i immunohistoquímica pels marcadors DDR1 i factor von Willebrand en còrtex occipital humà. Les dues imatges corresponen a la substància blanca del teixit. Les fletxes negres indiquen la col·localització observada pels dos marcadors. No es va observar col·localització del marcatge en les fibres de mielina (fletxes grogues). En el cas del marcador immunohistoquímic de DDR1 C-terminal s'observa un marcatge cel·lular aïllat (puntes de fletxes). Barra d'augment: 100 µm.

Presència de la seqüència A2RE en DDR1 humà

La presència d'RNAm de DDR1 en els fibres de mielina, ens va plantejar la possibilitat que pogués ser transportat en forma de grànuls d'RNA cap als processos dels oligodendròcits per traduir-se, tal com s'ha descrit per una proteïna important de la mielina, l'MBP (Boccacio et al., 2000). En els últims anys s'ha vist que diferents RNA missatgers que són transportats cap als processos cel·lulars presenten una seqüència de transport d'RNA de 21 nucleòtids coneguda com A2RE. A2RE és reconeguda per una ribonucleoproteïna nuclear A2 (hnRNPA2), la qual és responsable d'aquest transport (Smith, 2004). Per tant ens vam plantejar que si l'RNAm de DDR1 és transportat cap als processos dels oligodendròcits, la seqüència de DDR1 pot presentar elements similars a A2RE. Es van utilitzar dues estratègies diferents per identificar elements A2RE en DDR1 per tal d'evitar trobar falsos positius. La primera estratègia va consistir a fer una aproximació PWM per identificar elements A2RE sencers. Estudis realitzats en el transport de l'RNAm de l'MBP han vist que hi ha un subsegment d'11 nucleòtids d'A2RE (A2RE11) que és igualment efectiu que l'A2RE sencer per modular aquest transport. La segona estratègia es va basar en la recerca de seqüències molt similars als 11 nucleòtids d'A2RE11. Ambdues estratègies van identificar un element A2RE en l'RNAm de DDR1 (vegeu figura 6). Aquest element A2RE es localitza en un marc de lectura obert (de l'anglès *open reading frame* o ORF) de l'exó 14 i que és comú per les isoformes a, b, c i e de DDR1. També vam trobar que només 27 seqüències de 3000 a l'atzar, de la mateixa longitud i composició que l'RNAm DDR1 presenten l'element A2RE identificat per les dues estratègies, i que representen una probabilitat de 0,009. Aquests resultats suggereixen que el suposat element A2RE identificat en DDR1 no és accidental i que pot actuar com una veritable seqüència transportadora d'RNA.

MBP	:	GC-CAA-GGAGCCAGAGAGCATG	:	21
MOBP	:	AC-CCC-CGAGACACAGAGCATG	:	21
CAII	:	GCA CAACGGA-CCAGAGAAC-TG	:	21
TAU	:	GC-CAA-GCAGGGAAA-AGC-TG	:	19
APP	:	GC-CAA-GCACCGAGAGAGAATG	:	21
DDR1	:	GCTCAA-GGACCCAAACATCATT	:	22

Figura 6. Alineament de la seqüència A2RE identificada en DDR1 amb altres elements A2RE identificats i implicats en el transport d'RNA cap als processos distals dels oligodendròcits (Barbarese et al., 1999). L'element A2RE de DDR1 identificat es localitza en la posició 2293-2314 de la seqüència NM_013993 que correspon a la isoforma a de DDR1. Els quadres negres indiquen un 100% d'homologia entre les 6 seqüències alineades. Els quadres de color gris fosc indiquen discrepàncies amb només una de les 6 seqüències. Els quadres de color gris clar mostren diferències amb 2 o 3 seqüències. En blanc s'indica més de 3 discrepàncies d'alineament entre les seqüències. MBP= *myelin basic protein*; MOBP= *myelin-associated oligodendrocyte basic protein*; CAII= *carbonic anhydrase II*; TAU= *tau protein*; APP= *amyloid precursor protein*.

Anàlisi Quantitatiu i Qualitatiu del RNA de DDR1

Per la tècnica d'RT-PCR a temps real vam quantificar l'expressió de l'RNAm de les 5 isoformes conegudes de DDR1 en el còrtex cerebral humà de 3 individus. Vam observar que la isoforma més abundant en cervell humà era DDR1b, seguit de DDR1c i DDR1a (figura 7A). L'expressió de les isoformes d i e de DDR1 va ser inferior a 1.

Com que els nostres resultats de la hibridació *in situ* ens mostraven dues associacions diferents: isoforma b de DDR1 i les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis i un altre isoforma de DDR1 i les cèl·lules responsables de sintetitzar mielina que són els oligodendròcits, ens vam plantejar quantificar l'expressió de les 5 isoformes de DDR1 en les línies cel·lulars humanes d'oligodendròcits HOG16 i MO3.13, la línia cel·lular endotelial HUVEC i la línia cel·lular de carcinoma de còlon. Aquesta última línia es va utilitzar com a control positiu d'expressió de les 5 isoformes de DDR1 (Alves et al., 2001). Els resultats d'aquest experiment estan representats en la figura 7. Vam veure que DDR1b és la isoforma que més s'expressa en totes les línies cel·lulars, i presenta uns nivells d'expressió deu vegades superior en les cèl·lules HUVEC en comparació el còrtex humà. Quan els valors d'expressió de DDR1b es van treure vam veure que DDR1c és la segona

Resultats Estudi 2

isoforma de DDR1 més abundant (figura 7C). Cal destacar que l'expressió de DDR1c és 4 vegades superior en còrtex humà que en la resta de línies cel·lulars. La tercera isoforma més abundant és DDR1a amb una valor d'1 ja que es va considerar com el valor de referència. Les isoformes DDR1d i DDR1e van presentar valors d'expressió menors d'1 en totes les línies cel·lulars analitzades.

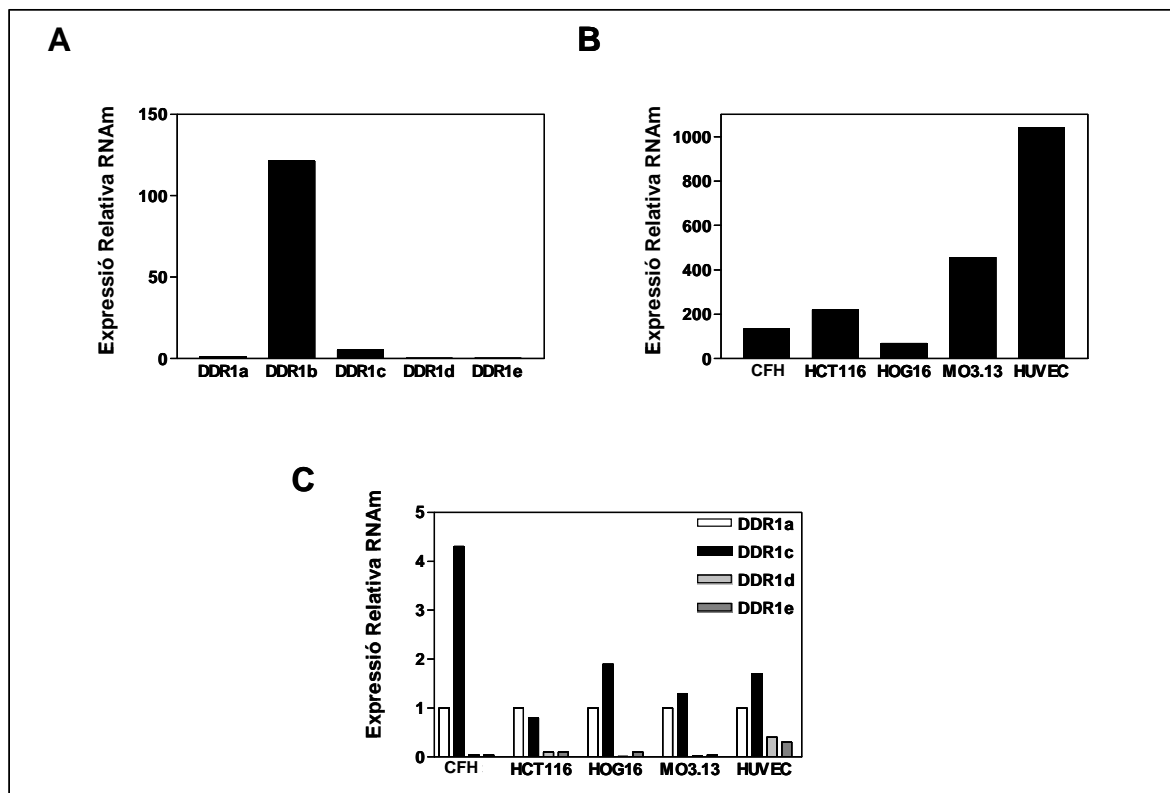


Figura 7. Expressió de les 5 isoformes de DDR1 per RT-PCR a temps real en còrtex frontal humà i diferents línies cel·lulars. **(A)** Expressió relativa d'RNAm de les 5 isoformes de DDR1 en còrtex frontal humà (CFH). **(B)** Expressió relativa de la isoforma b de DDR1 en HFC i diferents línies cel·lulars. HCT116 correspon a una línia cel·lular de càncer de còlon, HOG16 i MO3.13 són 2 línies cel·lulars humanes d'oligodendròcits i HUVEC són cèl·lules primàries endotelials de vena umbilical. A destacar que les cèl·lules HUVEC són les que expressen més quantitat de DDR1b. **(C)** Expressió de les isoformes a, c, d i e de DDR1 en tots els espècimens analitzats. En aquesta gràfica no es troben representats els valors d'expressió de la isoforma b. Observem major expressió de la isoforma c de DDR1 en HFC en comparació amb la resta de línies cel·lulars. En totes les gràfiques els nivells d'expressió de l'RNAm van ser normalitzats d'acord amb el nivell d'expressió del gen endogen RNAr 18S i relatius a la isoforma a de DDR1.

Expressió de proteïna DDR1 en cervell humà

Es van utilitzar 2 anticossos diferents de DDR1 per estudiar la seva expressió proteica en cervell humà: un anticòs que reconeix la part extracel·lular N-terminal de DDR1 i un altre anticòs que reconeix la part intracel·lular o C-terminal de DDR1 (vegeu taula 2 de l'apartat Material i mètodes). Com es pot visualitzar a la figura 8 vam obtenir dos patrons de marcatge diferents. Amb l'anticòs DDR1 C-terminal es va observar un marcatge exclusiu de fibres de mielina i absència de marcatge de cèl·lules endotelials de vasos sanguinis. Aquest marcatge de fibres de mielina coincideix amb el marcatge de fibres de la substància blanca obtingut mitjançant la hibridació *in situ* sense tractament amb RNAsa A. A més aquest patró de marcatge de fibres obtingut amb l'anticòs DDR1 C-terminal és paral·lel al patró que s'obté amb l'anticòs MBP (resultats no mostrats). Tal com es pot veure en la figura 8 l'anticòs DDR1 C-terminal marca intensament la substància blanca (A i B) i les fibres de mielina de la substància grisa (A i C). Per contra amb l'anticòs DDR1 N-terminal es va observar un marcatge restrictiu de cèl·lules endotelials de vasos sanguinis en la substància grisa, patró molt similar a l'obtingut amb la hibridació *in situ* (figura 8 D, E i F). No obstant això, en la substància blanca a part del marcatge endotelial també es va observar un marcatge cel·lular de morfologia estel·lar i mida compatible amb la morfologia de cèl·lules glials (astròcits i oligodendròcits).

Resultats Estudi 2

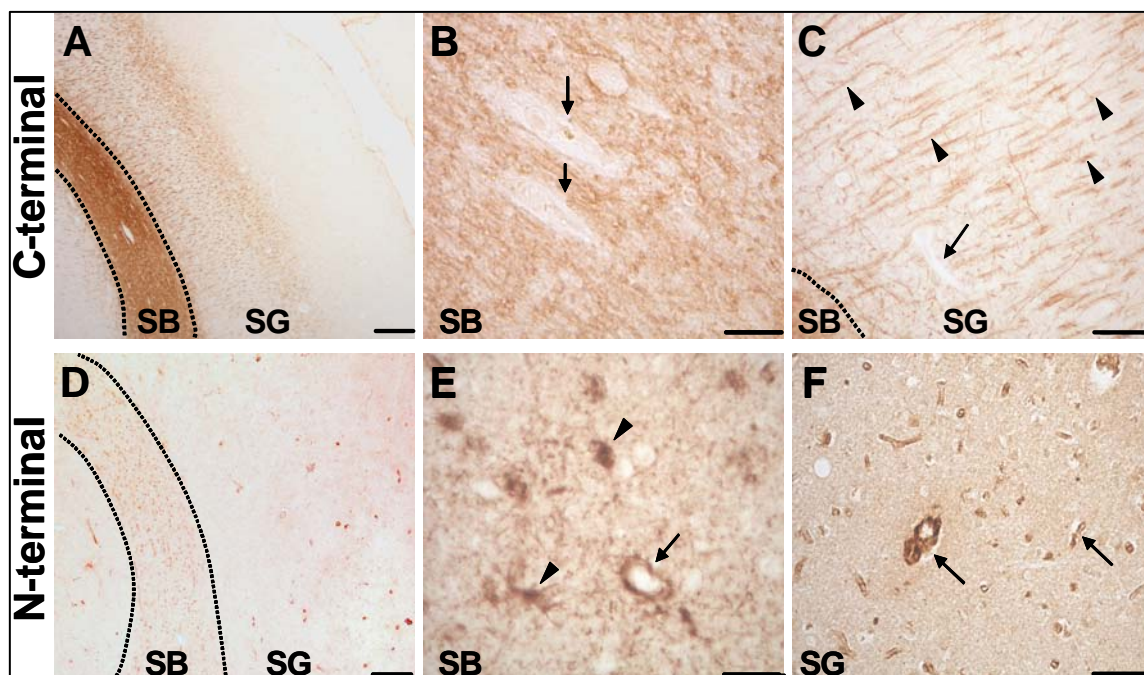


Figura 8. Immunohistoquímica de DDR1 en còrtex occipital humà. Les figures A, B i C mostren l'immunohistoquímica realitzada amb un anticòs que reconeix la part C-terminal (extracel·lular) de DDR1. Les figures D, E i F mostren un marcatge immunohistoquímic d'un anticòs que reconeix la part N-terminal o intracel·lular de DDR1. En la figura A es mostra un marcatge de fibres de mielina en les substàncies blanca i grisa. En les figures B i C les fletxes indiquen l'absència de marcatge dels vasos sanguinis i els cap de fletxa mostren en detall les fibres de mielina marcades. En la figura E els caps de fletxa mostren el marcatge de cossos cel·lulars de la substància blanca per part d'un anticòs anti-DDR1 N-terminal. En les figures E i F les fletxes indiquen el marcatge de vasos sanguinis en la substància grisa i blanca del teixit. Barres d'augment: 400 µm per la figura A, 200 µm per la figura D, 50 µm per les figures B i C i 20 µm per la figura E.

Estudis de colocalització per DDR1

Per tal de caracteritzar les cèl·lules que expressen DDR1 es va realitzar un estudi de col·localització amb diferents marcadors histològics. Es va utilitzar la tècnica de doble marcatge per immunohistoquímica (vegeu figura 9).

El marcatge de fibres de mielina per part de l'anticòs DDR1 C-terminal es va comparar amb el marcador de mielina per excel·lència, l'MBP. Els nostres resultats van ser positius, amb una clara col·localització de marcatge entre els dos marcadors. Els respectius controls negatius no van donar senyal de col·localització.

La morfologia estel·lar i mida de les cèl·lules marcades amb l'anticòs DDR1 N-terminal és compatible amb la morfologia d'astròcits i d'oligodendròcits. Es van utilitzar dos marcadors histològics per aquests dos tipus cel·lulars per tal de realitzar

els estudis de col·localització. Es va emprar com a marcador d'astròcits la GFAP (de l'anglès, *glial fibrillar acidic protein*) i com a marcador d'oligodendròcits madurs l'APC (de l'anglès, *adenomatous polyposis coli*). Els resultats de doble marcatge per la GFAP ens va mostrar que el 47% de les cèl·lules DDR1 positives colocalitzaven amb GFAP. La immunohistoquímica directa amb l'anticòs anti-GFAP dona un nombre de cèl·lules en la substància blanca molt més alt (resultats no mostrats). Per tant els nostres resultats indiquen que DDR1 està present només en algunes cèl·lules GFAP positives de la substància blanca. Per una altra banda pel marcador immunohistoquímic d'oligodendròcits APC vam obtenir que un 53% de les cèl·lules positives per DDR1 de la substància blanca col·localitzaven amb aquest marcador. Aquests resultats indiquen que alguns oligodendròcits expressen la part extracel·lular de DDR1 en el seu cos cel·lular.

En síntesi trobem:

- Marcatge per part de l'anticòs DDR1 C-terminal en les extensions dels oligodendròcits que formen la mielina.
- Marcatge per part de l'anticòs DDR1 N-terminal en alguns astròcits (cèl·lules GFAP positives) i alguns cossos d'oligodendròcits.

Resultats Estudi 2

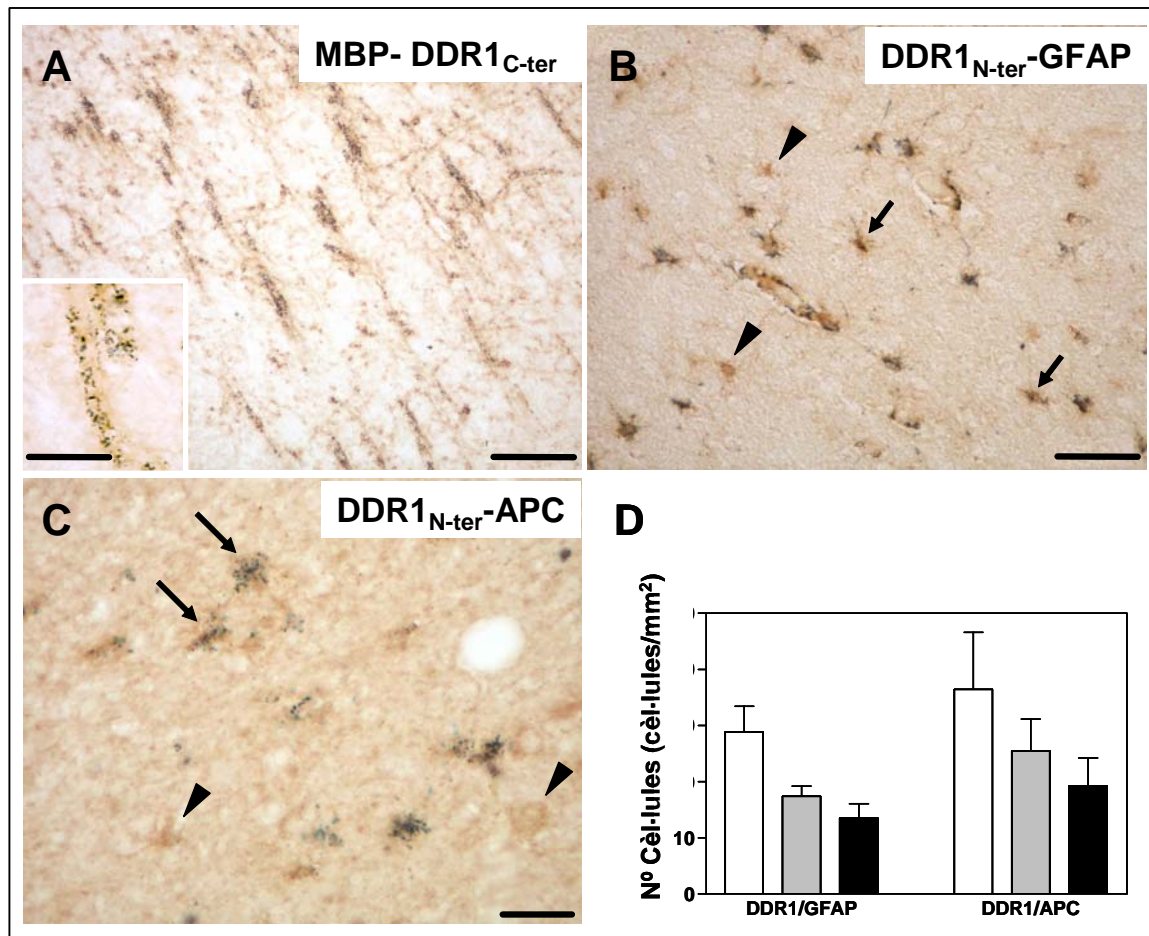


Figura 9. Doble immunohistoquímica per DDR1 i els marcadors de mielina (MBP), d'astròcits (GFAP) i d'oligodendròcits (APC). **(A)** Col·localització dels anticossos MBP i DDR1 C-terminal en les fibres de mielina. **(B)** Col·localització dels anticossos DDR1 N-terminal i GFAP en la substància blanca. Les fletxes indiquen les cèl·lules positives per DDR1 i GFAP. Els caps de fletxa indiquen les cèl·lules positives per DDR1 que no col·localitzen amb GFAP. **(C)** Col·localització dels anticossos DDR1 N-terminal i APC (fletxes). L'absència de col·localització amb l'APC es marca amb cap de fletxa. **(D)** Diagrames de barres del contacte de cèl·lules positives per DDR1 (barres blanques), per GFAP o APC (barres grises) i cèl·lules col·localitzades DDR1-GFAP o DDR1-APC (barres negres). Barres d'augment: 50 µm per les figures A i B, 20 µm per la figura C.

5.3. ESTUDI 3. Anàlisi quantitativa d'expressió de DDR1 en malalts esquizofrènics i controls

5.3.1. Antecedents

L'estudi d'associació del gen DDR1 en l'esquizofrènia (estudi 1 d'aquesta tesi doctoral) ens indica que DDR1 està associat a la malaltia. Dels 16 SNP analitzats vam observar una forta associació dosi-efecte de l'SNP9 (rs1049623) amb l'esquizofrènia. Aquest fet es va confirmar en mantenir-se una forta associació amb l'haplotip format pels SNP 9, 10 i 11. L'anàlisi d'expressió de DDR1 en funció del genotip per a l'SNP9 ens va mostrar que els malalts esquizofrènics portadors del genotip de risc per a l'SNP9 presentaven estadísticament menors nivells d'expressió d'RNAm de DDR1 en limfòcits.

En ratolins el patró d'expressió de DDR1 va mostrar una coincidència a nivell espacio-temporal de les cèl·lules positives per DDR1 amb el procés de mielinització (Franco-Pons et al., 2006).

L'estudi d'expressió de DDR1 en cervell humà (estudi 2 d'aquesta tesi doctoral) ens mostra que els oligodendròcits, que són responsables de la síntesi de mielina en l'SNC, contenen RNAm de DDR1 (evidenciat per hibridació *in situ*) i expressen el receptor en les extensions que formen la mielina i en el soma d'algunes cèl·lules (evidenciat per immunohistoquímica). Quantitativament, es va observar que en cervell la isoforma majoritària era la DDR1b, seguida de la isoforma DDR1c.

Aquestes observacions, tant a nivell murí com humà, ens reforcen la hipòtesi de la possible implicació del receptor DDR1 en el procés de mielinització.

Com ja s'ha comentat a la introducció, hi ha múltiples evidències provinents d'estudis de neuroimatge i d'estudis genètics o d'expressió gènica, que el procés de mielinització es troba alterat o danyat en l'esquizofrènia.

5.3.2. Objectius

D'acord amb els resultats obtinguts en els estudis 1 i 2 d'aquesta tesi doctoral, juntament amb els resultats observats en el model murí, ens vam plantejar el objectius següents:

1. Estudiar la relació de l'expressió d'RNAm de DDR1 amb l'expressió d'RNAm dels gens d'oligodendròcits MAG i OLIG2 en RNA procedent de cervell humà.

Resultats Estudi 3

2. Comparar la correlació dels gens en un grup de pacients esquizofrènics i en un grup de controls.
3. Comparar la quantitat relativa d'RNAm de DDR1, MAG i OLIG2 en RNA procedent de cervell de pacients esquizofrènics i de controls.
4. Estudiar la relació de l'expressió d'RNAm de les isoformes de DDR1 i l'expressió d'RNAm dels gens MAG i OLIG2 en RNA procedent de cervell humà.
5. Comparar la quantitat relativa d'RNAm de les 5 isoformes de DDR1 en cervell de pacients esquizofrènics i de controls.

5.3.3. Resultats

Anàlisi de correlació entre els gens MAG, OLIG2 i DDR1 total

Es va quantificar l'expressió de l'RNAm dels gens DDR1 total, MAG i OLIG2 en 30 mostres de còrtex occipital humà del *Neuropathology Consortium* de l'SMRI, per RT-PCR a temps real. Amb els valors d'expressió de cada gen relativa a un control endogen (RNAr 18S) i a una mostra agafada arbitràriament com a referència (mitjana de l'expressió en controls). Amb aquests valors es va voler explorar el grau d'associació entre l'expressió de gens que en la bibliografia s'han reportat com a gens dels oligodendròcits i el nostre gen candidat DDR1. Aquesta associació es va estudiar mitjançant el coeficient de correlació de Pearson.

Tal com es pot veure en la taula 1, els resultats van mostrar una forta correlació positiva entre els nivells d'expressió de l'RNAm de DDR1 total amb els nivells d'expressió d'RNAm dels gens MAG i OLIG2, i van donar uns valors de correlació de Pearson de 0,714 i 0,843, respectivament, i una significació en ambdós casos $P < 0,001$.

També es va calcular el coeficient de correlació de Pearson en el grup de pacients esquizofrènics i en controls per separat, i es va trobar una correlació estadísticament significativa dels 3 gens DDR1 total, MAG i OLIG2 (taula 1). En el grup de pacients esquizofrènics els valors dels coeficients de correlació són més alts ($r > 0,92$ amb una significació $P < 0,001$). Per contra, en el grup d'individus control els valors d' r són lleugerament més baixos i en el cas de la correlació entre els gens DDR1 i MAG l'associació no va resultar estadísticament significativa ($r = 0,419$, ns).

Taula 1. Anàlisi de correlació dels gens DDR1 total, MAG i OLIG2 en còrtex occipital humà procedent de controls i pacients esquizofrènics

Grup	Gens	DDR1	MAG	OLIG2
Total (N=30)	DDR1		0,714*	0,843*
	MAG	0,714*		0,844*
	OLIG2	0,843*	0,844*	
Control (N=15)	DDR1		0,419	0,729*
	MAG	0,419		0,693*
	OLIG2	0,729*	0,693*	
Esquizofrènics (N=15)	DDR1		0,920*	0,924*
	MAG	0,920*		0,936*
	OLIG2	0,924*	0,936*	

La correlació estadísticament significativa ($P \leq 0,01$) s'indica en negreta. Els asteriscs indiquen correlacions estadísticament significatives de $P \leq 0,001$.

Comparació de l'expressió relativa dels gens MAG, OLIG2 i DDR1 total en cervell humà de pacients esquizofrènics i controls

Amb els valors d'expressió relativa que es van obtenir, tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, es va fer la comparació entre el grup de malalts esquizofrènics i els controls per anàlisi de regressió lineal. En la figura 1 es mostren les medianes de l'expressió de DDR1, MAG i OLIG2 en el grup de pacients esquizofrènics i en el de controls. Malgrat que en la figura s'observa que els nivells d'expressió de DDR1 total estaven disminuïts en pacients esquizofrènics en comparació als individus control, l'anàlisi de regressió va mostrar que les diferències no eren estadísticament significatives. De forma similar, i d'acord amb els resultats previs reportats per altres grups, vam obtenir una menor expressió del gen OLIG2 en comparar el grup de pacients esquizofrènics respecte el grup control. L'anàlisi de regressió lineal d'expressió dels 3 gens si consideràvem com a variables independents les variables clíniques i biològiques de les mostres de cadascun dels individus analitzats tampoc van assolir la significació estadística.

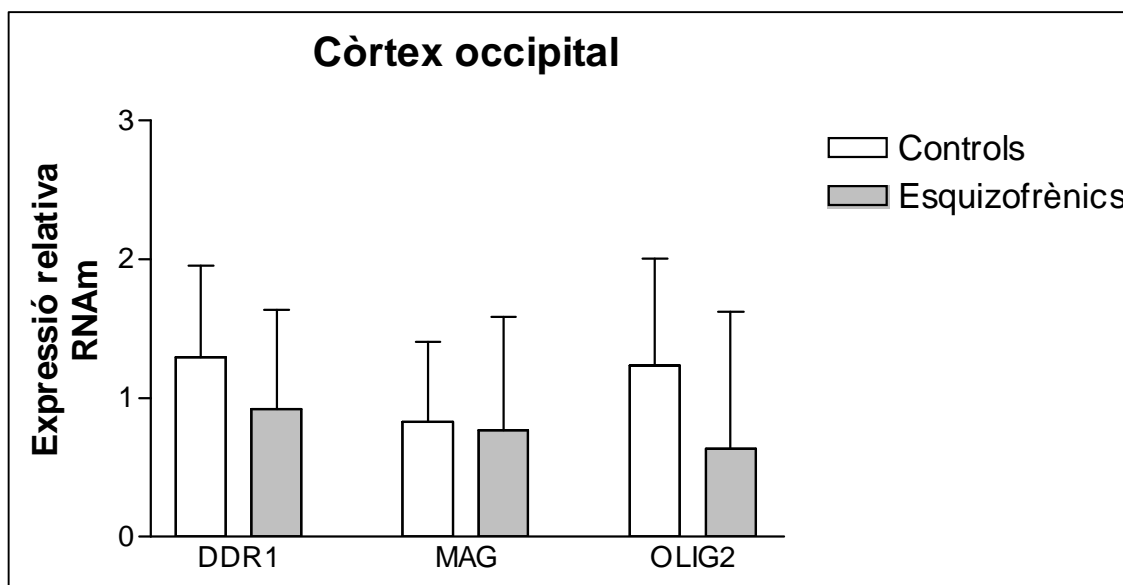


Figura 1. Expressió relativa de DDR1 total, MAG i OLIG2 en el còrtex occipital en una mostra d'individus control (n=15) i pacients esquizofrèncics (n=15). La quantificació es va normalitzar respecte el control endogen RNAr 18S. Els diagrames de caixes representen la mediana \pm SEM.

Anàlisi de correlació de les isoformes de DDR1 amb els gens MAG i OLIG2 en còrtex occipital

En les mateixes mostres, es va quantificar l'expressió de l'RNAm per a cada una de les isoformes de DDR1 i amb els valors obtinguts es va fer una anàlisi de correlació de Pearson amb l'expressió de DDR1 total, MAG i OLIG2 per veure com s'associaven. Els resultats d'aquesta anàlisi estan en la taula 2. L'anàlisi de Pearson conjunta de casos i controls ens va mostrar que la isoforma a de DDR1 només correlaciona amb MAG. Les isoformes b i d de DDR1 no es correlacionen ni amb DDR1 total, ni amb MAG, ni amb OLIG2. Per contra, les isoformes c i e de DDR1 estan positivament correlacionades amb els 3 gens.

A l'hora d'analitzar aquesta associació pel grup d'individus control vam trobar que les isoformes DDR1c i DDR1e mantenen valors de correlació estadísticament significatius amb MAG. Els valors d'r per l'associació de DDR1c i DDR1e amb els gens DDR1 total i OLIG2 són molt similars als obtinguts en tota la mostra, però perden la significació estadística. Per a les isoformes DDR1b i DDR1d no obtenim cap tipus de correlació amb els 3 gens, tal com passava amb tota la mostra. Finalment, la isoforma DDR1a malgrat mantenir uns valors de correlació amb el gen MAG similars als observats en tota la mostra, la significació estadística es perd.

En el grup de pacients esquizofrènics els valors d'r segueixen un patró similar conjunt total, però només es mantenen com a correlacions positives estadísticament significatives les DDR1a amb MAG, DDR1c amb DDR1 total i DDR1e amb OLIG2. Igualment que les anàlisis anteriors, no es va trobar cap tipus de correlació entre les isoformes b i d de DDR1 amb DDR1 total, MAG ni OLIG2.

En resum, en el còrtex occipital trobem:

- § DDR1a només correlaciona amb MAG en els grups d'anàlisi de casos i controls conjuntament i casos individualment. En els controls, malgrat que es perd la significació, presenta un valor r de correlació similar.
- § En cap cas DDR1b i DDR1d correlacionen amb DDR1 total, MAG ni OLIG2.
- § DDR1c presenta una correlació estadísticament significativa:
 - § En casos i controls amb els 3 gens DDR1 total, MAG i OLIG2.
 - § En controls amb MAG, malgrat tot presenta valors pròxims a la significació amb el gen DDR1 total.
 - § En casos amb DDR1 total, però, obtenim uns valors de correlació propers a la significació amb MAG i OLIG2.
- § DDR1e presenta una correlació estadísticament significativa:
 - § En casos i controls amb els 3 gens DDR1 total, MAG i OLIG2.
 - § En controls amb MAG.
 - § En casos amb OLIG2.

Taula 2. Anàlisi de correlació de les 5 isoformes de DDR1 i amb els gens DDR1 total, MAG i OLIG2 en còrtex occipital humà de controls i pacients esquizofrènics

Grup	Gens	DDR1a	DDR1b	DDR1c	DDR1d	DDR1e
Total (N=30)	DDR1	0,073	-0,092	0,466	0,212	0,431
	MAG	0,532*	0,133	0,392	0,059	0,585*
	OLIG2	0,272	0,030	0,394	0,070	0,597*
Control (N=15)	DDR1	0,031	-0,099	0,445	0,288	0,318
	MAG	0,507	-0,033	0,525	0,012	0,563
	OLIG2	0,212	0,016	0,447	0,053	0,508
Esquizofrènics (N=15)	DDR1	0,013	-0,056	0,562	0,095	0,463
	MAG	0,535	0,433	0,275	0,051	0,529
	OLIG2	0,295	0,093	0,356	0,013	0,616

La correlació estadísticament significativa ($P \leq 0,05$) s'indica en negreta. Els asteriscs indiquen correlacions estadísticament significatives de $P \leq 0,01$.

Anàlisi de correlació entre les isoformes de DDR1 en còrtex occipital i DLPFC

L'anàlisi d'expressió de les 5 isoformes de DDR1 (DDR1a-e) es va realitzar en una segona mostra de cervell humà, en aquest cas es tractava d'una mostra de 70 espècimens de còrtex prefrontal dorsolateral (DLPFC) també proveïda per l'SMRI.

Vam analitzar l'associació entre les isoformes per anàlisi de correlació de Pearson, en les dues regions cerebrals i els resultats d'aquesta anàlisi estan en la taula 3.

Els resultats en ambdues regions cerebrals analitzades són similars i destaca que en el DLPFC en general els valors d'r tenen valors de P inferiors (més significatius).

En el còrtex occipital de tota la mostra, la isoforma a correlaciona de forma significativa amb les isoformes b, d i e. La isoforma b, correlaciona positivament i significativa amb la isoforma a i negativament amb la isoforma c. La isoforma DDR1c, a més de correlacionar negativament amb la isoforma b, correlaciona positivament i de forma significativa amb les isoformes d i e. Les isoformes d i e

mostren un patró d'associació molt similar: tenen r positives i significatives només amb les isoformes a i c.

En el DLPFC de tota la mostra, obtenim r amb valors positius i estadísticament significatius per a la isoforma a amb les isoformes c, d i e. La isoforma b només correlaciona de forma estadísticament significativa i negativa amb DDR1c. DDR1d només correlaciona significativament amb DDR1a. La isoforma e s'associa amb r positives i significatives amb les isoformes a i c.

Quan estratifiquem la mostra per grups de casos i controls, tant en còrtex occipital com en DLPFC, els valors d' r es mantenen força similars amb algunes variacions de la significació.

Si comparem els valors d' r , entre còrtex occipital i DLPFC, les diferències més importants són que la isoforma a no correlaciona amb la isoforma b en DLPFC i sí que ho fa en còrtex occipital; DDR1c no correlaciona amb DDR1a en còrtex occipital i sí que mostra r estadísticament significativa en DLPFC.

En síntesi trobem:

- § La isoforma a s'associa positivament amb totes les isoformes, amb algunes diferències depenent del lòbul cerebral estudiat.
- § La isoforma b només s'associa inversament i significativa amb la isoforma c.
- § La isoforma c s'associa negativament i de forma estadísticament significativa amb la isoforma b i positivament amb les altres.
- § Les isoformes d i e, de manera global, mostren correlació positiva significativa amb DDR1a i DDR1c.

Taula 3. Anàlisi de correlació de les 5 isoformes de DDR1 entre aquestes en còrtex occipital i DLPFC de controls i pacients

C.Occip.	Gens	DDR1a	DDR1b	DDR1c	DDR1d	DDR1e	DLPFC	Gens	DDR1a	DDR1b	DDR1c	DDR1d	DDR1e
Total (N=30)	DDR1a		0,360*	0,186	0,259	0,342*	Total (N=70)	DDR1a		0,134	0,398*	0,312	0,268
	DDR1b	0,360*		-0,544*	-0,144	-0,161		DDR1b	0,134		-0,591*	-0,107	-0,108
	DDR1c	0,186	-0,544*		0,291	0,422*		DDR1c	0,398*	-0,591*		0,033	0,361*
	DDR1d	0,259	-0,144	0,291		0,144		DDR1d	0,312	-0,107	0,033		0,113
	DDR1e	0,342*	-0,161	0,422*	0,144			DDR1e	0,268	-0,108	0,361*	0,113	
Control (N=15)	DDR1a		0,410	0,196	0,115	0,713*	Control (N=35)	DDR1a		0,083	0,508*	0,239	0,323
	DDR1b	0,410		-0,544	-0,315	-0,027		DDR1b	0,083		-0,544*	-0,016	-0,061
	DDR1c	0,196	-0,544		0,385	0,555		DDR1c	0,508	-0,544*		-0,063	0,354
	DDR1d	0,115	-0,315	0,385		0,417		DDR1d	0,239	-0,016	-0,063		0,277
	DDR1e	0,713*	-0,027	0,555	0,417			DDR1e	0,323	-0,061	0,354	0,277	
Esq. (N=15)	DDR1a		0,773*	-0,063	0,142	0,105	Esq. (N=35)	DDR1a		0,189	0,283	0,360	0,215
	DDR1b	0,773*		-0,479	0,020	-0,215		DDR1b	0,189		-0,652*	-0,183	-0,151
	DDR1c	-0,063	-0,479		0,463	0,589		DDR1c	0,283	-0,652*		0,118	0,361
	DDR1d	0,142	0,020	0,463		0,336		DDR1d	0,360	-0,183	0,118		-0,007
	DDR1e	0,105	-0,215	0,589	0,336			DDR1e	0,215	-0,151	0,361	-0,007	

La correlació estadísticament significativa ($P \leq 0,05$) s'indica en negreta. Els asteriscs indiquen correlacions estadísticament significatives de $P \leq 0,01$. Esq.: pacients esquizofrènics

Comparació de l'expressió relativa de les 5 isoformes de DDR1 en cervell humà de pacients esquizofrènics i controls

En comparar els valors d'expressió per anàlisi de regressió lineal de cada isoforma entre el grup de pacients esquizofrènics i el grup d'individus control les diferències no van resultar estadísticament significatives, ni en el còrtex occipital ni en el DLPFC. Tal com es mostra en la figura 2, les medianes de l'expressió relativa de cada isoforma són molt similars en pacients i en controls.

Per a la isoforma c de DDR1 vam observar dos patrons d'expressió diferent segons la regió cerebral analitzada. Així, en la regió de còrtex occipital els pacients esquizofrènics presentaven una expressió de l'RNAm DDR1c un 30% inferior respecte als individus control (mediana \pm SEM; grup control=1,06 \pm 0,68, grup pacients esquizofrènics=0,715 \pm 0,70). Com ja s'ha comentat, aquesta diferència no va ser estadísticament significativa. Un patró similar es va observar per a les isoformes d i e. Contràriament, en la regió DLPFC dels malalts esquizofrènics no es van detectar diferències d'expressió de DDR1c entre pacients esquizofrènics i individus control (mediana \pm SEM; grup control=3,05 \pm 1,60 i grup de pacients esquizofrènics=3,05 \pm 1,42).

Els valors d'expressió absoluts de DDR1b són els més elevats en ambdues regions cerebrals, seguits dels d'expressió de les isoformes DDR1c i DDR1a. En més detall, la relació de l'expressió DDR1a-DDR1b-DDR1c-DDR1d i e és: 1-30-1-1 en còrtex occipital i 1-180-3-0,1 en DLPFC.

Per tant, els nostres resultats es poden resumir com:

- § No s'han trobat diferències estadísticament significatives en l'expressió de les isoformes de DDR1 entre grups de pacients i controls.
- § DDR1b és la isoforma més expressada en el còrtex occipital i la regió DLPFC.
- § Quantitativament trobem 6 vegades més expressió de DDR1b en la regió DLPFC que en el còrtex occipital. Per a DDR1c l'expressió és 3 vegades superior en DLPFC que en el còrtex occipital.
- § En el còrtex occipital l'expressió de les isoformes a, c, d i e és aproximadament d'1.

- En la regió DLPFC trobem que després de DDR1b la isoforma més expressada és DDR1c, seguit de DDR1a i, finalment, DDR1d i DDR1e (valors inferiors d'1).

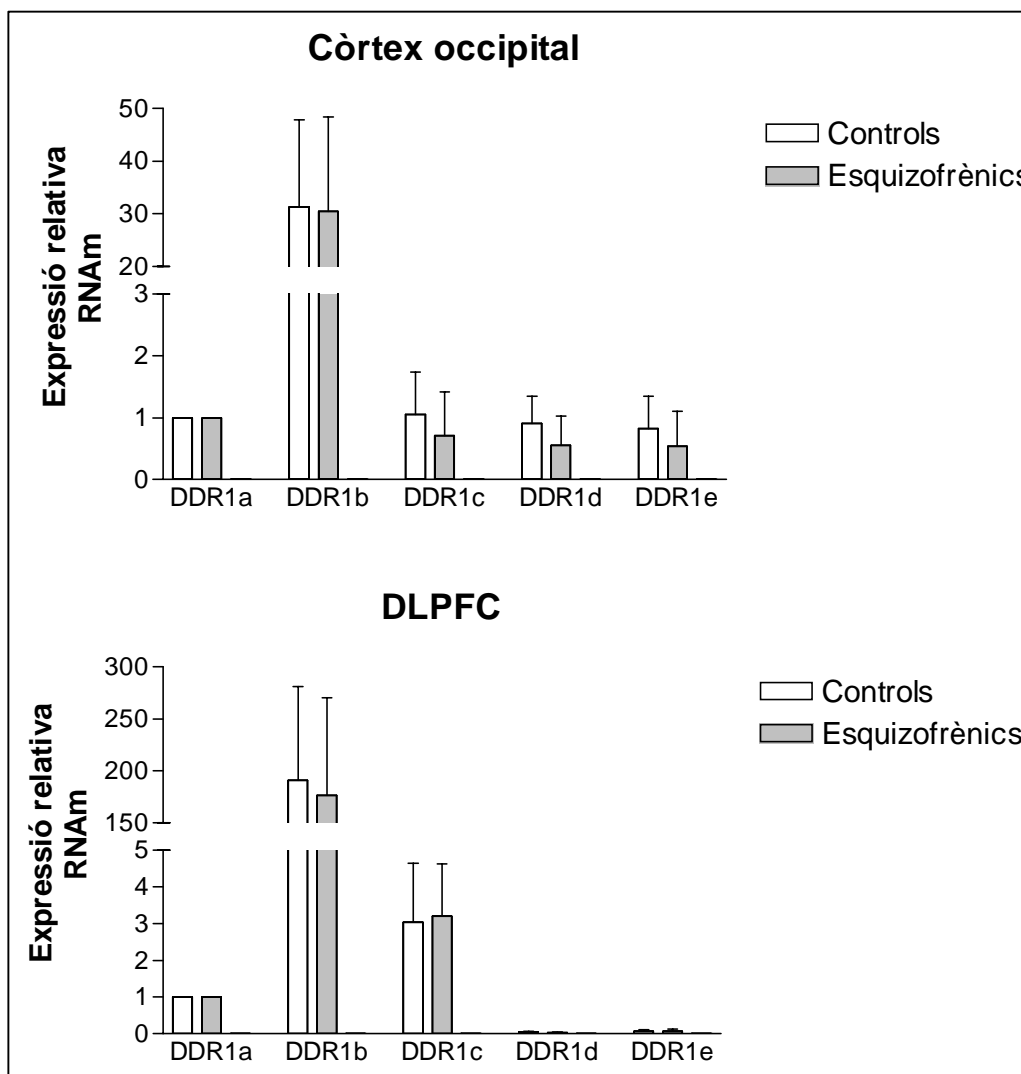


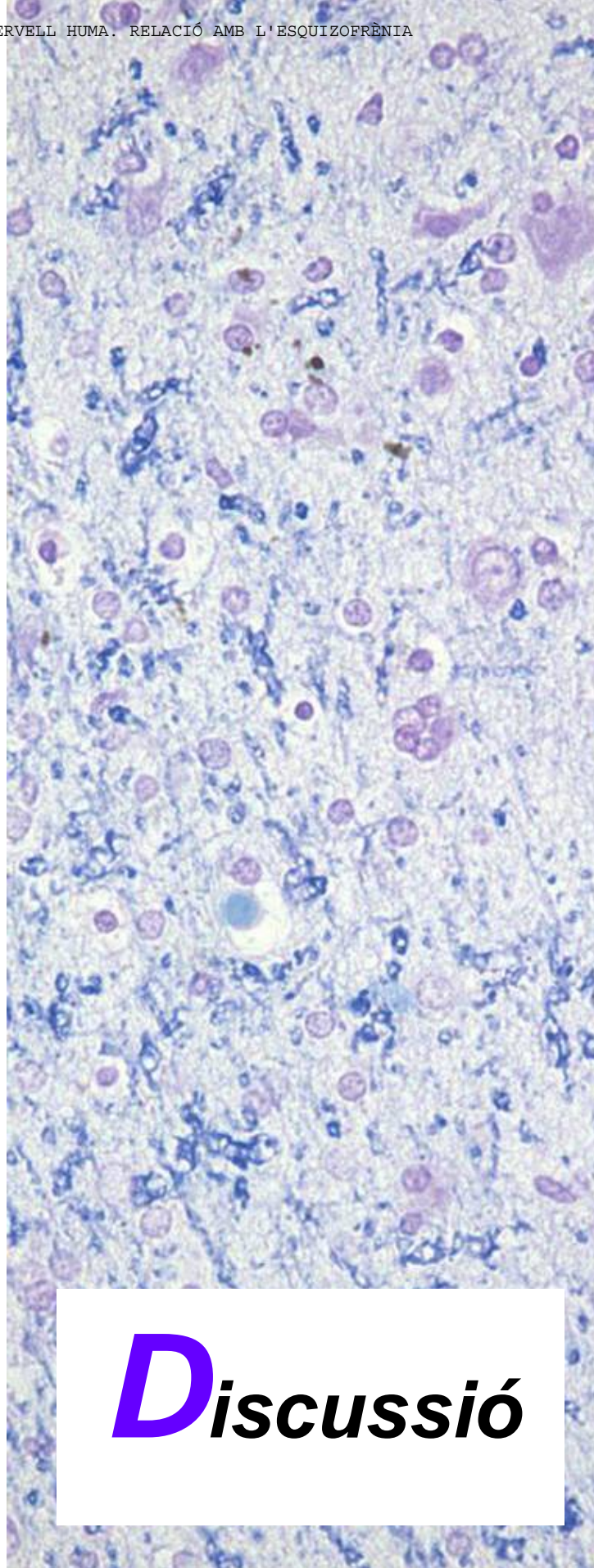
Figura 2. Expressió relativa de les isoformes a-e de DDR1 en el còrtex occipital i DLPFC en una mostra d'individus control i pacients esquizofrènics. La quantificació es va normalitzar respecte el control endogen RNAr 18S. Els valors d'expressió són relatius respecte la isoforma DDR1a (DDR1a=1). Els diagrames de caixes representen la mediana \pm SEM.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



D ***Discussió***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

En aquest estudi proposem el receptor DDR1 com un nou gen candidat de susceptibilitat per a l'esquizofrènia. En el moment que el nostre grup es va plantejar estudiar DDR1 com a gen candidat per a l'esquizofrènia, DDR1 només havia estat implicat en diferents tipus de càncers i la seva expressió gènica i proteica en l'SNC no estava caracteritzada. Agafats de la teoria del neurodesenvolupament per a l'esquizofrènia vàrem pensar que un gen com DDR1 podia ser un bon nou candidat per a la malaltia. Els motius que justificaven la nostra hipòtesi bàsicament eren els següents:

- El fet que DDR1 tingués una regió molt similar als receptors TRK relacionats amb el desenvolupament del cervell (Vogel, 1999).
- Patró d'expressió diferencial de DDR1 durant el neurodesenvolupament de rata i ratolí (Zerlin et al., 1993; Sánchez et al., 1994).
- Estimulació de DDR1 per col·lagen. S'havia demostrat en rates que el col·lagen modulava la proliferació i diferenciació de neurones a l'SNC (Levitt et al., 1997).

Amb el convenciment que havíem trobat un bon candidat vàrem iniciar dos estudis: per una part, la caracterització en detall de l'expressió de DDR1 en cervell de ratolí i, per una altra, un rastreig del gen DDR1 humà per cercar mutacions i polimorfismes que després ens permetessin fer un estudi d'associació de casos i controls. Aquests dos estudis van donar lloc a les tesis de Carme Virgos (2004) i Neus Franco (2006).

Els resultats de l'estudi en ratolí ens van portar a un resultat inesperat: DDR1 s'expressava majoritàriament en oligodendròcits i no a neurones que era el que esperàvem. Vàrem detectar una possible associació del gen amb l'esquizofrènia. Aquests resultats varen donar un gir molt important a la nostra investigació: calia centrar-se en la substància blanca del cervell i no en la substància grisa. Val a dir que simultàniament varen començar a aparèixer en la literatura altres estudis que mostraven que en l'esquizofrènia hi havia defectes en la mielina i que l'expressió dels gens que la sintetitzen estaven disminuïts (Hakak et al., 2001; Tkachev et al., 2003; Aston et al., 2004).

Discussió estudi 1

Aquest treball és la continuació del treball previ del nostre grup (Virgos, 2004) on es van identificar variants o SNP presents en el gen DDR1 en una població de 100 pacients esquizofrènics i es va valorar la seva associació amb la malaltia a nivell al·lèlic i haplotípic. Per a aquest estudi es va ampliar la mostra analitzada tant de pacients (N=389) com d'individus control (N=615), així com el nombre d'SNP del gen DDR1 analitzats (N=16). En síntesi, trobem que dels 16 SNP analitzats, l'SNP9 individualment o en forma d'haplotip és responsable d'una associació estadísticament significativa amb l'esquizofrènia. Molts estudis d'associació han donat resultats positius que després han resultat falsos. Els nostres resultats d'acord amb Colhun (Lancet, 2003) compleixen diversos requisits per ser un veritable resultat positiu:

1. La significació es manté després de corregir la P per permutació múltiple.
2. Es va descartar estratificació de la mostra per la tècnica de Pritchard.
3. Es va observar un efecte dosi dependent, és a dir els individus homozigots per l'al·lel de risc (individus SNP9 GG) tenen més risc de patir la malaltia que els GA, assumint que els AA no tenen risc. $OR_{GG}=2,26$; IC95%:1,30-3,91 i $OR_{AG}=1,34$, IC95%:1,00-1,79; assumint $OR_{AA}=1$.
4. Es va observar una possible funcionalitat de la variant o desequilibri de lligament entre l'SNP i una variant funcional, ja que l'expressió de DDR1 en limfòcits de pacients esquizofrènics canvia en funció del genotip.

Sorprenentment quan es va estratificar la mostra en funció de la variable gènere, ens vam trobar que els homes presenten una major associació genotípica de l'SNP9 individual amb l'esquizofrènia. De fet, es pot veure que la significació de tota la mostra l'aportaven els homes, ja que en les dones es perd l'associació. En homes control la freqüència de l'al·lel G de l'SNP9 està menys representada en comparació amb les dones control (0,190 vers 0,252) sense assolir una significació estadística (P ajustada=0,0878). Hi ha estudis previs on descriuen l'existència d'associació genètica restrictiva a un dels dos sexes (Shifman et al., 2002; Hennah et al., 2003; Mukai et al., 2004). De forma interessant, Shifman i col·laboradors l'any 2002 també troben diferents freqüències entre homes i dones control. Aquest fet podria deure's a diferències fenotípiques pròpies de la malaltia que s'observen entre homes i dones.

Hi ha un altre fet que podria explicar un fals positiu dels nostres resultats: una associació positiva del gen DDR1 amb l'esquizofrènia podria ser deguda al desequilibri de lligament (LD) del nostre gen DDR1 i altres gens candidats que es localitzen en el cromosoma 6p i que s'ha vist que estan associats a la malaltia, com és el cas dels gens MOG, TNF, NOTCH4 i el complex gènic HLA. En aquest estudi s'hauria de descartar aquesta possibilitat, ja que DDR1 està separat dels respectius blocs haplotípics per punts calents de recombinació. A més, el complex HLA, que es caracteritza per ser una de les regions més complexes a nivell d'LD, s'ha vist que no està associat amb l'esquizofrènia en un estudi de població alemanya afectada per la malaltia (Schwab et al., 2002).

Com ja s'ha comentat, un dels fets que més recolza un resultat positiu en una anàlisi d'associació genètica és que es pugui demostrar que la variant o SNP associat és funcional. És a dir, que tenir l'al·lel de risc suposa una pèrdua o guany d'una funció biològica involucrada amb la malaltia. Per tal de poder demostrar que l'SNP9 tenia alguna implicació funcional, ens vam plantejar d'estudiar l'expressió del gen per RT-PCR a temps real en les úniques mostres biològiques d'RNA de què disposàvem: limfòcits de sang perifèrica. L'anàlisi de l'expressió de DDR1 en funció del genotip per la variant rs1049623 (SNP9) va evidenciar diferències. Els pacients portadors del genotip de risc GG per a l'SNP9 presenten menors nivells d'RNAm de DDR1. A més, tot i que l'anàlisi no va resultar estadísticament significativa, en homes l'expressió de DDR1 va ser inferior que en dones. La interpretació d'aquests resultats d'expressió de DDR1 en limfòcits s'ha de fer amb cautela, però malgrat tot les nostres observacions suggereixen l'existència d'una mutació funcional, actualment desconeguda, que afectaria el sistema de regulació transcripcional, disminuint la transcripció o incrementant el grau de degradació de l'RNAm, o bé potser tots dos fets alhora.

El nostre grup ha estudiat en detall l'expressió de DDR1 en cervell de ratolí i s'ha observat una forta expressió de DDR1 en els oligodendròcits de la substància blanca que coincideix amb el procés de mielinització (Franco-Pons et al., 2006). Si aquest patró d'expressió té lloc de forma similar en cervell humà es podria implicar DDR1 en el procés de mielinització, procés que s'ha vist alterat en els pacients esquizofrènics

(Bartzokis et al., 2002; Davis et al., 2003). Hi ha múltiples estudis de neuroimatge i de microscòpia electrònica que descriuen alteracions a nivell cortical i subcortical de la substància blanca en pacients esquizofrènics (Uranova et al., 2001; Hof et al., 2002; Hof et al., 2003; Uranova et al., 2004). A nivell molecular s'ha vist una menor expressió de gens de mielina i d'oligodendròcits en regions de còrtex prefrontal de pacients esquizofrènics (Hakak et al., 2001; Tkachev et al., 2003; Katsel et al., 2005). Cal remarcar que el procés de mielinització que té lloc entre el final de l'adolescència i l'inici de l'etapa adulta es concentra en els lòbuls frontal i temporal del cervell, regions crítiques en el desenvolupament de la malaltia (Bartzokis et al., 2002; Woo et al., 2005), període que coincideix amb les primeres manifestacions de l'esquizofrènia. Per altra banda, els pacients amb leucodistròfia metacromàtica, malaltia que es caracteritza per presentar problemes de formació de la mielina, presenten sovint episodis clínics de psicosi, esquizofrènia i altres alteracions associades que es manifesten en l'adolescència i l'inici de l'etapa adulta (Black et al., 2003).

En resum, els resultats d'aquest estudi indiquen que DDR1 està associat a l'esquizofrènia i que aquesta associació té lloc de forma més prominent en homes. Ben cert és que els resultats d'aquest treball han de ser replicats en altres poblacions, per tal de confirmar si DDR1 està associat a la malaltia. La replicació en altres mostres poblacionals de bagatge genètic diferent, així com l'estudi in vitro del seu mecanisme molecular ens permetria confirmar la implicació de DDR1 en l'esquizofrènia.

Discussió estudi 2

L'expressió en ratolins de DDR1 en oligodendròcits madurs, juntament amb un patró d'expressió espaciotemporal paral·lel al procés de mielinització (Franco-Pons et al., 2006) ens va conduir a realitzar un estudi detallat de l'expressió d'aquest receptor en cervell humà. Fins al moment no hi ha publicacions sobre l'expressió detallada de DDR1 en cervell humà, encara que hi ha estudis en gliomes cerebrals on DDR1 està sobreexpressat (Weiner et al., 2000; Yamanaka et al., 2006).

Mitjançant les tècniques d'hibridació *in situ* i immunohistoquímica, hem identificat DDR1 en diferents estructures en el còrtex cerebral humà: 1) en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de la substància grisa i blanca trobem expressió del receptor sencer corresponent majoritàriament a la isoforma b, 2) en el soma d'alguns astròcits i oligodendròcits de la substància blanca també observem expressió del receptor DDR1 sencer, majoritàriament isoforma b, i 3) en la mielina trobem expressió del receptor, però no detectem el domini discoidina extracel·lular (extrem N-terminal).

El tret més interessant en relació amb l'esquizofrènia que es desprèn d'aquest estudi és l'expressió de DDR1 en la mielina en cervell humà. Dos són els blocs de resultats que ens mostren que DDR1 és un important constituent de la mielina:

1. Presència d'RNAm de DDR1 dins les fibres de mielina (resultats de la hibridació *in situ*), i la presència en la seqüència DDR1 d'un element A2RE (responsable del transport de l'RNA dins els oligodendròcits des del soma fins a les extensions que formen les beines de mielina).
2. El patró de marcatge immunohistoquímic amb l'anticòs DDR1 C-terminal és similar i se sobreposa amb el marcatge immunohistoquímic de l'MBP, proteïna estructural de la mielina.

Per la tècnica d'hibridació *in situ* vàrem observar marcatge d'RNAm de DDR1 en les fibres de mielina. Aquest patró de marcatge d'RNAm en les fibres de mielina ja s'havia descrit prèviament per altres proteïnes de la mielina com l'MBP (Colman et al., 1982; Verity et al., 1988; Schaeren-Wiemers et al., 1993). A nivell proteic, però, també detectem DDR1 en les cèl·lules APC positives que segurament són oligodendròcits. Aquest fet és comparable amb el que succeeix per a l'MBP i, per tant, podria ser una explicació raonable dels nostres resultats de DDR1. Un estudi d'hibridació *in situ* per a l'MBP ha revelat l'existència de dos patrons de marcatge diferent del seu RNAm al llarg del temps: un patró restrictiu al soma dels oligodendròcits i un altre patró més difús en les fibres de mielina. Aquests dos patrons de marcatge diferents són compatibles amb el transport d'RNAm intracel·lular descrit per l'MBP, el qual en un principi roman associat amb els

Discussió

ribosomes en el soma dels oligodendròcits i després és transportat cap als processos oligodendroglials durant la mielinització (Verity et al., 1988).

Fa uns anys que se sap que l'RNAm de l'MBP conté la seqüència A2RE responsable del transport de l'RNAm cap als processos dels oligodendròcits, on es tradueix per formar les lamel·les de mielina (Barbarese et al., 1999; Boccaccio, 2000; Smith, 2004; Carson and Barbarese, 2005). Hi ha altres RNA que es localitzen durant els primers estadis del desenvolupament en el soma dels oligodendròcits i que en l'etapa adulta són transportats cap als processos oligodendroglials on es tradueixen in situ. Són els RNA de les proteïnes MOBP, CAII, MAPT i APP (Carson et al., 2001). Els nostres resultats bioinformàtics ens confirmen la presència d'un element A2RE en el transcrit de DDR1.

El marcatge de mielina només es detecta amb un anticòs contra la part C-terminal de DDR1. Aquest fet ens suggereix que en la mielina el receptor DDR1 pateix un procés de trencament (de l'anglès, *shedding*), on la part extracel·lular o N-terminal s'allibera i la part intracel·lular roman ancorada a la mielina en forma de receptor truncat. Hi ha 2 estudis previs que descriuen el procés de trencament del receptor DDR1 induït per la unió del seu lligand (Vogel, 2002; Slack., 2006). Una altra explicació a l'absència de la part N-terminal de DDR1 en la mielina seria un possible procés d'empalmament alternatiu en la regió 5' del receptor que formaria una isoforma de DDR1 sense part N-terminal, isoforma que no s'ha descrit en humans. Recentment, s'ha descrit en rata l'existència d'una isoforma de DDR1 resultant de l'empalmament alternatiu dels exons 1-5 codificants del domini discoidina i de la regió *stalk* (Mullenbach, 2006).

Ara bé, malgrat l'absència de marcatge de fibres de mielina per part de l'anticòs DDR1 N-terminal hem observat que hi ha un marcatge específic d'aquest anticòs en el soma d'alguns oligodendròcits. Per tant, en aquesta discussió s'ha d'afegir que a l'igual que succeeix amb d'altres proteïnes de mielina, segurament hi ha un paper específic de cada isoforma de DDR1 durant el procés de mielinització. Per una banda, DDR1 podria estar participant en el procés de contacte axó-oligodendròcit que succeeix a l'inici de la mielinització; i per un altra banda, DDR1 també participaria en

el procés d'aproximació de membranes citoplasmàtiques d'oligodendròcits que té lloc durant la compactació de la mielina.

Malgrat que s'han de realitzar més estudis funcionals sobre el possible paper de DDR1 en la mielina, suposem que DDR1 podria estar participant en el procés de contacte membrana-membrana previ a la compactació de la mielina. Concretament, DDR1 pot estar participant en el procés de contacte axó-membrana plasmàtica de l'oligodendròcit o bé en l'aproximació de les membranes plasmàtiques oligodendròcit- oligodendròcit durant la compactació de la mielina.

Els animals deficientes per DDR1 presenten, aparentment, un cervell anatòmicament normal. Són animals que creixen amb normalitat, però són més petits que els animals salvatges (Vogel et al., 2001). S'ha vist que els oligodendròcits dels animals deficientes per l'MBP o MOBP inicien les primeres etapes de la mielinització, però la seva mielina no és compacta. De forma similar, DDR1 segurament no és imprescindible per a la síntesi de mielina, però sí que potser que la seva absència pot implicar que la mielina estigui menys compactada o més susceptible al dany exterior. Calen realitzar estudis més detallats en ratolins deficientes per DDR1, per tal d'esbrinar el paper de DDR1 en la mielina.

Pel que fa a l'expressió de DDR1 en les cèl·lules endotelials dels vasos, fins al moment l'únic lloc on s'ha descrit expressió de DDR1 és en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de la còrnia humana. Nosaltres en ratolins (Franco-Pons et al., 2006) no detectem expressió de DDR1 en cèl·lules endotelials ni per hibridació *in situ* ni per immunohistoquímica. En aquest estudi hem detectat expressió de DDR1, majoritàriament isoforma b, en les cèl·lules endotelials de cervell humà i en la línia cel·lular HUVEC, que també són cèl·lules humanes. L'anàlisi immunohistoquímica va detectar la part extracel·lular, que conté el domini d'unió a col·lagen, o N-terminal de DDR1 en les cèl·lules endotelials de cervell humà i no es va detectar senyal C-terminal. Probablement, les cèl·lules endotelials contenen el receptor DDR1 sencer en la seva membrana citoplasmàtica. Per interpretar per què no detectem senyal amb l'anticòs C-terminal de DDR1 podem pensar que aquest només reconeix una

Discussió

conformació específica del seu epítop contingut entre els aa894 i 913, causada, per exemple, per la fosforilació de les tirosines de la posició 740 i/o 881.

El paper de DDR1 en les cèl·lules endotelials podria ser activant una cascada de senyal intracel·lular un cop unit al seu lligand, el col·lagen, o alternativament, actuant com una molècula d'adhesió cel·lular.

També hem observat expressió del receptor sencer de DDR1 en el soma d'alguns astròcits i oligodendròcits, però en tota la població. Això suggereix que el receptor s'expressa en el soma d'aquests dos tipus cel·lulars en determinades circumstàncies. Les circumstàncies podrien ser activació per molècules exògenes com els factors de creixement, citoquines o estímuls externs. S'ha descrit, per exemple, que la radiació ionitzant induïx l'expressió de la isoforma b de DDR1 en els astròcits de rata (Sakuma et al., 1996).

En conclusió, els nostres resultats relacionen, per primera vegada, el receptor DDR1 amb el procés de mielinització en cervell humà. A més, sembla que hi ha un patró d'expressió diferencial dependent d'isoforma. És cert que calen realitzar més estudis funcionals per tal de determinar el paper específic que juga aquest receptor en el cervell humà, tant en els oligodendròcits, i per conseqüència en la mielinització, com en els altres tipus cel·lulars.

Discussió estudi 3

En els últims anys, diversos estudis de neuroimatge i de microscòpia electrònica han evidenciat l'existència d'alteracions de la mielina en els individus afectats per l'esquizofrènia (Buchanan et al., 1998; Uranova et al., 2001). Aquests resultats s'han vist recolzats per estudis de quantificació de gens d'oligodendròcits i de la mielina en aquests malalts (Hakak et al., 2001; Tkachev et al., 2003, Aston et al., 2004; Sugai et al., 2004; Dracheva et al., 2005; Katsel et al., 2005).

Com que la nostra hipòtesi principal és la possible implicació del receptor domini discoidina 1 (DDR1) en el procés de mielinització, procés que està alterat en l'esquizofrènia, en aquest estudi hem analitzat l'expressió quantitativa d'RNAm de DDR1 en una mostra de pacients esquizofrènics en comparació amb individus

control. A més, s'ha inclòs en aquest estudi l'anàlisi d'expressió de dos dels gens més replicats en altres poblacions, on s'ha vist que presenten una expressió disminuïda en pacients esquizofrènics i que estan implicats directament en el procés de mielinització (Hakak et al. 2001; Tkachev et al., 2003, Aston et al., 2004; Sugai et al., 2004; Dracheva et al., 2005; Katsel et al., 2005). Aquests gens són la MAG i l'OLIG2.

Com a punt de partida d'aquest estudi es va mirar la correlació que hi havia entre els nivells d'expressió de DDR1 i de les proteïnes de mielina MAG i OLIG2. Reinforcant la nostra hipòtesi de la implicació de DDR1 en la mielinització, es va veure que DDR1 correlaciona fortament tant amb MAG com amb OLIG2, i presenta inclòs uns valors superiors de correlació en la mostra de pacients esquizofrènics. La comparació de medianes d'expressió dels gens van evidenciar menors nivells d'expressió dels gens DDR1 i OLIG2 en els pacients esquizofrènics en comparació amb els individus control; malgrat que aquestes diferències no van assolir la significació estadística. Les causes de l'absència de significació estadística per a MAG i OLIG2 poden ser diverses: diferent regió cerebral analitzada, ús de diferents controls endògens, diferent tecnologia emprada i mida de la mostra estudiada. La majoria dels estudis d'expressió gènica realitzats fins al moment analitzen l'àrea del còrtex prefrontal dorsolateral (DLPFC).

En el nostre estudi es va incloure una altra regió del cervell humà: la regió occipital. Hi ha dos treballs publicats (Katsel et al., 2005; Haroutunian et al., 2007) on es reporta que hi ha una expressió gènica diferencial entre les regions del cervell. Tots dos grups, a més, troben que el grup de gens de la mielina i d'oligodendròcits presenten els nivells d'expressió més alterats en els pacients esquizofrènics i, concretament, coincideixen que la regió més afectada, quant a expressió, és la regió frontal del cervell. L'expressió d'aquests mateixos gens es va trobar disminuïda en altres regions cerebrals, entre les quals cal destacar la regió de còrtex occipital. Per tant, els nostres resultats en còrtex occipital on no s'assoleix una disminució significativa per al gen DDR1 total i OLIG2, i sobretot per a MAG pot ser específica de regió.

Discussió

També s'ha de tenir en compte que en tot estudi on s'utilitza material cerebral *post mortem* és crític considerar com afecta en l'anàlisi de l'expressió gènica els paràmetres *pre* i *postmortem* dels espècimens. Un dels paràmetres més importants a tenir en compte és el valor del pH del cervell en el moment de fer l'extracció necròpsica (Li et al., 2004; Mexal et al., 2006). En el nostre estudi no vam trobar cap tipus d'efecte dels valors del pH dels cervells analitzats en l'expressió gènica. Altres paràmetres importants són l'interval *post mortem* (PMI), és a dir, el temps que passa entre la mort del donant i el moment de l'extracció del cervell o l'exposició als antipsicòtics. Cap d'aquests paràmetres va afectar els nivells d'expressió de les nostres mostres. Per tant, la menor expressió que s'observa en les nostres mostres és independent dels paràmetres clínics o biològics *pre* o *post mortem*.

Tal com ja s'ha comentat a la introducció, MAG és una glicoproteïna sintetitzada pels oligodendròcits mielinitzants que està implicada en la formació i manteniment de les beines de mielina (Schachner et al., 2000). OLIG2 és un factor de transcripció implicat en la determinació cel·lular dels oligodendròcits i en la seva maduració (Ligon et al., 2006). Els nostres resultats de correlació entre els nivells d'expressió de DDR1 total amb MAG i OLIG2 en el còrtex occipital de pacients esquizofrènics ens suggereixen que DDR1 pot estar implicat en el procés de mielinització. En ratolins hem vist que DDR1 s'expressa seguint un patró espaciotemporal a la mielinització i s'han identificat els oligodendròcits madurs com les cèl·lules responsables d'expressar DDR1 (Franco-Pons et al., 2006). En humans, tal com es descriu a l'estudi 2 d'aquesta tesi, hem vist expressió de DDR1 en diversos tipus cel·lulars, entre aquests oligodendròcits i, a més, el marcatge immunohistoquímic amb un anticòs anti-DDR1 que reconeix la part C-terminal del receptor va resultar ser exclusiu de mielina.

L'anàlisi d'expressió de les 5 isoformes de DDR1 en dues regions cerebrals diferents, còrtex occipital i DLPFC, ens permet aprofundir més en l'estudi de la possible implicació de DDR1 en el procés de mielinització. Aquesta anàlisi també ens permet verificar els resultats obtinguts en l'estudi 2, on sembla que hi ha una expressió de DDR1 isoforma dependent de teixit. Fins a l'actualitat no s'ha descrit cap estudi d'expressió de les isoformes de DDR1 en cervell humà. Els nostres

resultats de correlació mostren que les isoformes a i c de DDR1 estan positivament correlacionades amb els nivells d'expressió dels gens MAG i OLIG2, mentre que aquesta correlació no es va observar per a la isoforma b de DDR1. A més, s'ha vist que en cervell humà adult OLIG2 s'expressa en la substància blanca (Arnett et al., 2004). La forta correlació observada entre la isoforma a de DDR1 i OLIG2 es podria interpretar com que ambdós gens presenten una activitat coordinada o d'estimulació de la diferenciació cel·lular dels oligodendròcits, tal com s'ha vist que passa amb OLIG2 i Fyn. Està descrit que en resposta a un procés de desmielinització hi ha una activació en l'expressió d'RNAm de gens com OLIG2 i Fyn per part dels oligodendròcits progenitors per tal d'activar les vies metabòliques necessàries de remielinització dels axons (Zhao et al., 2005). L'absència de correlació de la isoforma DDR1b amb els gens MAG i OLIG2 observat en aquest estudi ens corrobora el probable paper diferenciat de les isoformes de DDR1 en el cervell humà i que concretament aquesta isoforma no està implicada ni en la diferenciació dels oligodendròcits ni en el procés de mielinització. A més, hem vist que DDR1b és la isoforma que s'expressa de forma majoritària en les cèl·lules endotelials de cervell humà i en les cèl·lules HUVEC.

L'anàlisi de correlació de les isoformes de DDR1 va mostrar resultats paral·lels en ambdues regions cerebrals, i va presentar una associació més forta en la regió DLPFC. Cal destacar l'associació inversa i significativa de DDR1b amb DDR1c, mentre que DDR1c també presenta una associació significativa i positiva amb la resta d'isoformes. Tal com succeeix amb DDR1c, la isoforma a de DDR1 presenta un patró similar d'associació positiva amb la resta d'isoformes. En aquest cas, però, s'observa que DDR1a només correlaciona amb DDR1b en el còrtex occipital i no en DLPFC. En el cas de les isoformes minoritàries, DDR1d i DDR1e, només estan associades amb les isoformes a i c de DDR1.

En el nostre estudi no es van assolir diferències estadísticament significatives en els nivells d'expressió de cap de les 5 isoformes analitzades entre els diferents grups diagnòstics. Malgrat tot, es va observar que els pacients esquizofrènics presenten quantitativament menors nivells d'expressió de la isoforma c de DDR1 en la regió de còrtex occipital. Les isoformes minoritàries de DDR1, d i e, estan disminuïdes en el

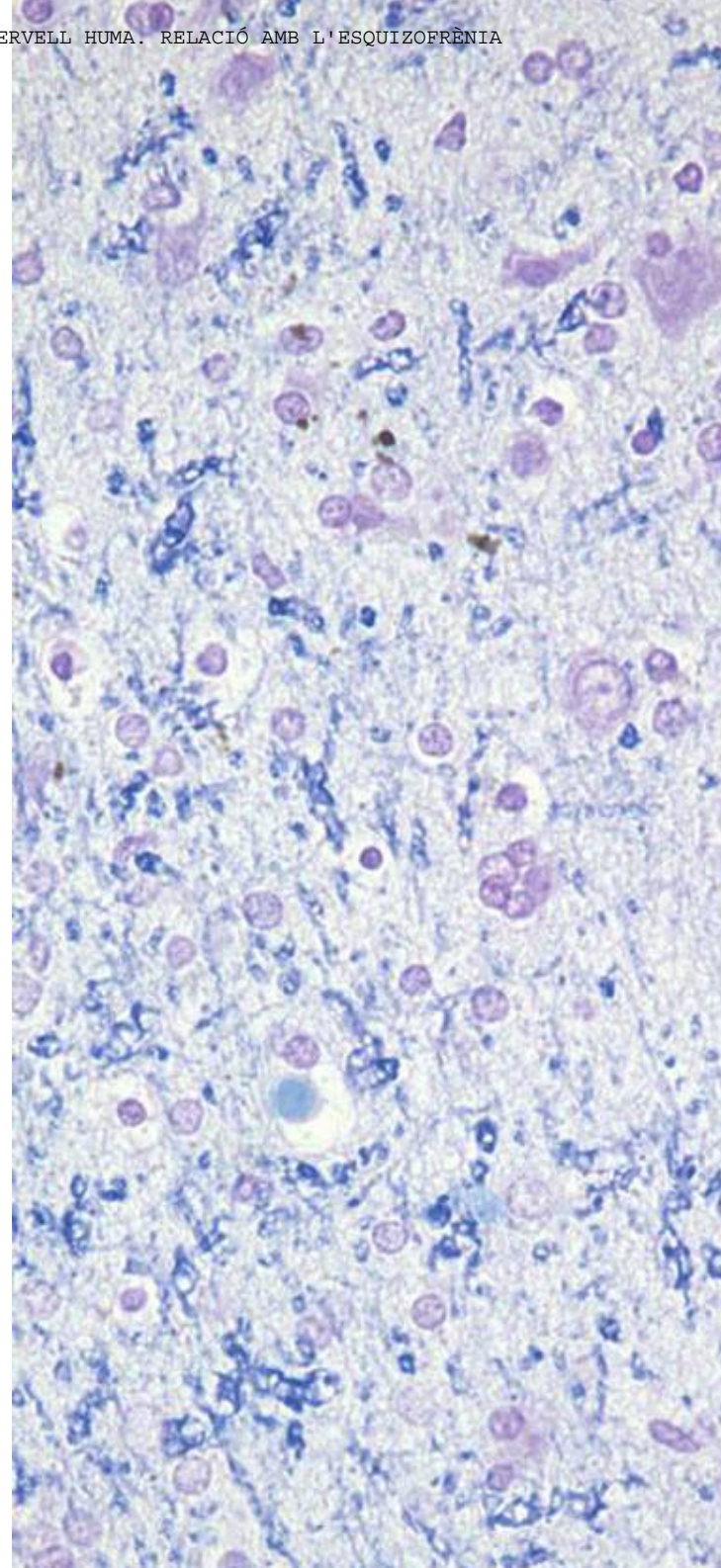
Discussió

grup de pacients respecte els controls i s'aprecien diferències dels nivells d'expressió entre les dues regions cerebrals analitzades.

A més, observem uns majors nivells d'expressió de les isoformes de DDR1 en la regió DLPFC que en el còrtex occipital. En ambdues zones cerebrals la isoforma més expressada és la DDR1b seguit de les isoformes DDR1c i DDR1a. Les isoformes DDR1d i DDR1e presenten uns nivells d'expressió inapreciables en DLPFC en comparació amb la regió occipital del cervell. Proporcionalment trobem en la regió DLPFC uns nivells d'expressió de $DDR1b > DDR1c > DDR1a$ ($180 > 3 > 1$), aquesta proporció varia en la regió occipital encara que l'ordre d'expressió de les isoformes no ($30 > 1,5 > 1$ per a les isoformes DDR1b, DDR1c i DDR1a, respectivament). Com ja s'ha comentat anteriorment, la majoria d'estudis d'expressió gènica relacionats amb l'esquizofrènia troben alteracions en l'expressió dels gens de la mielina en la regió DLPFC. A més, s'ha vist que l'expressió alterada dels gens de la mielina té lloc de forma regional (Dracheva et al., 2006; Katsel et al., 2005). Així, no és d'estranyar que trobem una major expressió de les isoformes b, c i a de DDR1 en la regió DLPFC que en el còrtex occipital.

S'ha descrit en gliomes que les isoformes a i b de DDR1 tenen funcions diferents en la invasió i adhesió cel·lular (Ram et al., 2005). En humans hi ha 4 isoformes diferents de la proteïna de mielina MBP. Cadascuna d'aquestes isoformes de l'MBP es caracteritzen per presentar una expressió i funcionalitat regulada tant en el temps com en el lloc cel·lular durant el procés de la mielinització (Kamholz et al., 1988; de Vries et al., 1997; Pedrazza, 1997). Per tant, sembla viable pensar que en el cervell humà cadascuna de les 5 isoformes de DDR1 pot presentar una funcionalitat diferent.

Si DDR1 és un receptor implicat activament en el procés de la mielinització, es podria facilitar encara més l'estudi de la patogènesi de l'esquizofrènia i d'altres malalties o alteracions del neurodesenvolupament cerebral humà.



Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

Generals

1. L'estudi d'associació cas-control del gen DDR1 indica que DDR1 està associat a l'esquizofrènia. Hem identificat una forta associació dosi-efecte de l'SNP9 (rs1049623) amb la malaltia que es manté en l'haplotip format pels SNP 9, 10 i 11. A més, hem observat que els pacients esquizofrènics portadors de l'al·lel de risc per l'SNP9 presenten estadísticament menors nivells d'expressió d'RNAm de DDR1 en limfòcits.
2. L'estudi d'expressió en cervell humà ens mostra que les prolongacions dels oligodendròcits que formen la mielina expressen tant l'RNAm com la proteïna del receptor DDR1. A més, hem observat que l'RNAm de DDR1 conté la seqüència A2RE, seqüència responsable del transport d'RNA missatgers cap als processos cel·lulars d'oligodendròcits. DDR1b s'expressa en l'endoteli de vasos sanguinis. El soma d'alguns astròcits i d'alguns oligodendròcits també expressen DDR1.
3. L'anàlisi quantitativa d'expressió de DDR1 en malalts esquizofrènics i controls ens mostren que les isoformes de DDR1 presenten una expressió específica i diferencial en el cervell humà. Hem identificat les isoformes a i c de DDR1 com les isoformes implicades en el procés de mielinització, funcionalitat que es descarta per la isoforma b de DDR1. A més, observem una menor expressió d'RNAm de DDR1 total, MAG i OLIG2 en pacients esquizofrènics en comparació amb els individus control, malgrat que no s'assoleix una significació estadística.

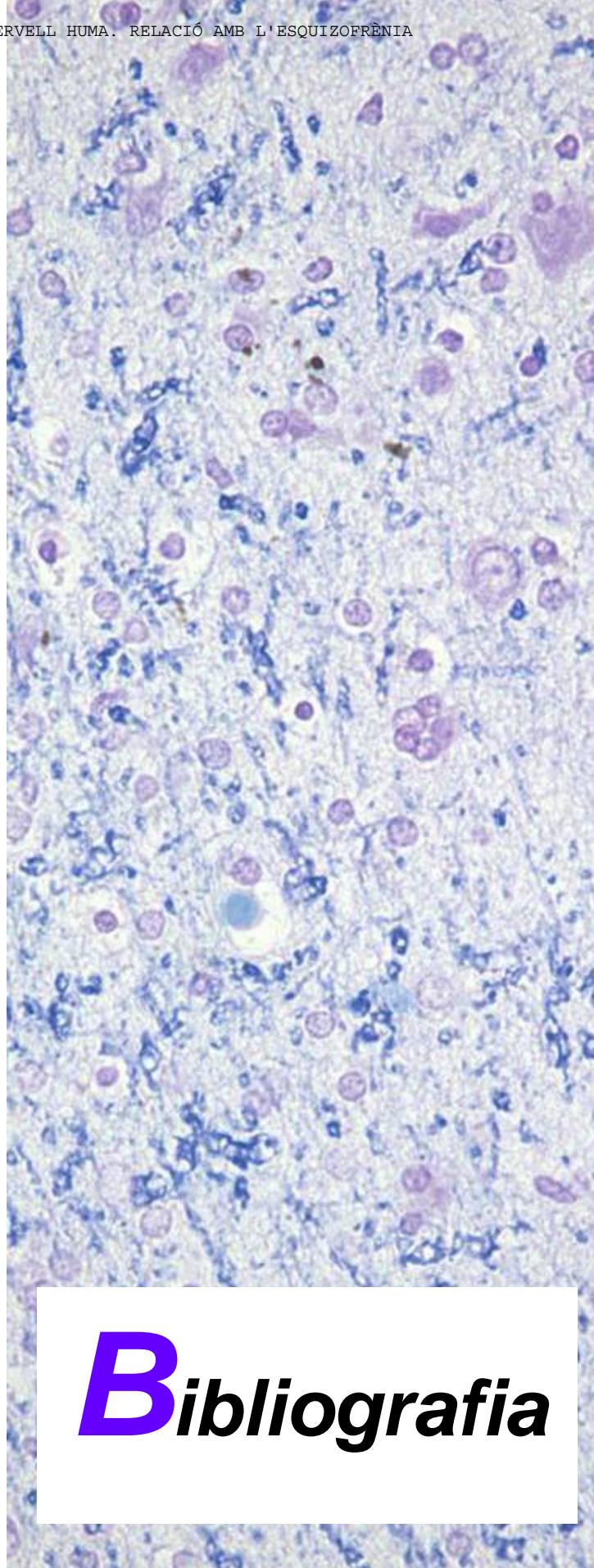
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



Bibliografia

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

- Abdulhussein, R., McFadden, C., Fuentes-Prior, P. & Vogel, W.F. (2004) Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor. *J. Biol. Chem.*, 279, 31462-31470.
- Agartz, I., Sedvall, G.C., Terenius, L., Kulle, B., Frigessi, A., Hall, H. & Jonsson, E.G. (2006) BDNF gene variants and brain morphology in schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 141, 513-523.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C. & Soriano, E. (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci.*, 18, 7779-7799.
- Alexander, S., Sydow, L.M., Wessels, D. & Soll, D.R. (1992) Discoidin proteins of dictyostelium are necessary for normal cytoskeletal organization and cellular morphology during aggregation. *Differentiation*, 51, 149-161.
- Alves, F., Saupe, S., Ledwon, M., Schaub, F., Hiddemann, W. & Vogel, W.F. (2001) Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: Differential expression in human colon cancer cell lines. *FASEB J.*, 15, 1321-1323.
- Alves, F., Vogel, W., Mossie, K., Millauer, B., Hofler, H. & Ullrich, A. (1995) Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene*, 10, 609-618.
- Antonarakis, S.E., Blouin, J.L., Pulver, A.E., Wolyniec, P., Lasseter, V.K., Nestadt, G., Kasch, L., Babb, R., Kazazian, H.H. & Dombroski, B. (1995) Schizophrenia susceptibility and chromosome 6p24-22. *Nat. Genet.*, 11, 235-236.
- Ardekani, B.A., Nierenberg, J., Hoptman, M.J., Javitt, D.C. & Lim, K.O. (2003) MRI study of white matter diffusion anisotropy in schizophrenia. *Neuroreport*, 14, 2025-2029.
- Arnett, H.A., Fancy, S.P., Alberta, J.A., Zhao, C., Plant, S.R., Kaing, S., Raine, C.S., Rowitch, D.H., Franklin, R.J. & Stiles, C.D. (2004) bHLH transcription factor

Bibliografia

- Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science*, 306, 2111-2115.
- Aston, C., Jiang, L. & Sokolov, B.P. (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol. Psychiatry*, 10, 309-322.
- Aston, C., Jiang, L. & Sokolov, B.P. (2004) Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J. Neurosci. Res.*, 77, 858-866.
- Bailer, U., Leisch, F., Meszaros, K., Lenzinger, E., Willinger, U., Strobl, R., Gebhardt, C., Gerhard, E., Fuchs, K., Sieghart, W., Kasper, S., Hornik, K. & Aschauer, H.N. (2000) Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 42, 175-182.
- Barbarese, E., Brumwell, C., Kwon, S., Cui, H. & Carson, J.H. (1999) RNA on the road to myelin. *J. Neurocytol.*, 28, 263-270.
- Barker, K.T., Martindale, J.E., Mitchell, P.J., Kamalati, T., Page, M.J., Phippard, D.J., Dale, T.C., Gusterson, B.A. & Crompton, M.R. (1995) Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene*, 10, 569-575.
- Bartzokis, G., Nuechterlein, K.H., Lu, P.H., Gitlin, M., Rogers, S. & Mintz, J. (2003) Dysregulated brain development in adult men with schizophrenia: A magnetic resonance imaging study. *Biol. Psychiatry*, 53, 412-421.
- Bartzokis, G. (2002) Schizophrenia: Breakdown in the well-regulated lifelong process of brain development and maturation. *Neuropsychopharmacology*, 27, 672-683.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, 81, 871-927.

- Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R., Ulmer, H., Mayringer, I., Dilitz, E., Deisenhammer, F. & Reindl, M. (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N. Engl. J. Med.*, 349, 139-145.
- Berger, T. & Frotscher, M. (1994) Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: An immunocytochemical study with the monoclonal rip antibody. *J. Neurocytol.*, 23, 61-74.
- Berry, N., Jobanputra, V. & Pal, H. (2003) Molecular genetics of schizophrenia: A critical review. *J. Psychiatry Neurosci.*, 28, 415-429.
- Bhat, R.V., Axt, K.J., Fosnaugh, J.S., Smith, K.J., Johnson, K.A., Hill, D.E., Kinzler, K.W. & Baraban, J.M. (1996) Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia. *Glia*, 17, 169-174.
- Bhat, R.V., Baraban, J.M., Johnson, R.C., Eipper, B.A. & Mains, R.E. (1994) High levels of expression of the tumor suppressor gene APC during development of the rat central nervous system. *J. Neurosci.*, 14, 3059-3071.
- Bhatt, R.S., Tomoda, T., Fang, Y. & Hatten, M.E. (2000) Discoidin domain receptor 1 functions in axon extension of cerebellar granule neurons. *Genes Dev.*, 14, 2216-2228.
- Birling, M.C., Roussel, G., Nussbaum, F. & Nussbaum, J.L. (1993) Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Neurochem. Res.*, 18, 937-945.
- Black, D.N., Taber, K.H. & Hurley, R.A. (2003) Metachromatic leukodystrophy: A model for the study of psychosis. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 15, 289-293.
- Bloch, B., Popovici, T., Levin, M.J., Tuil, D. & Kahn, A. (1985) Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ

Bibliografia

- hybridization and immunohistochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 6706-6710.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-365.
- Boccaccio, G.L. (2000) Targeting of mRNAs within the glial cell cytoplasm: How to hide the message along the journey. *J. Neurosci. Res.*, 62, 473-479.
- Bodian, D. (1965) A suggestive relationship of nerve cell RNA with specific synaptic sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 53, 418-425.
- Bogler, O., Wren, D., Barnett, S.C., Land, H. & Noble, M. (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, 6368-6372.
- Boin, F., Zanardini, R., Pioli, R., Altamura, C.A., Maes, M. & Gennarelli, M. (2001) Association between -G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 6, 79-82.
- Borg, J.P., Marchetto, S., Le Bivic, A., Ollendorff, V., Jaulin-Bastard, F., Saito, H., Fournier, E., Adelaide, J., Margolis, B. & Birnbaum, D. (2000) ERBIN: A basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat. Cell Biol.*, 2, 407-414.
- Bray, N.J., Preece, A., Williams, N.M., Moskvina, V., Buckland, P.R., Owen, M.J. & O'Donovan, M.C. (2005) Haplotypes at the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene locus mediate risk for schizophrenia through reduced DTNBP1 expression. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 1947-1954.
- Brunner, C., Lassmann, H., Waehneltd, T.V., Matthieu, J.M. & Lington, C. (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J. Neurochem.*, 52, 296-304.

- Buchsbaum, M.S., Tang, C.Y., Peled, S., Gudbjartsson, H., Lu, D., Hazlett, E.A., Downhill, J., Haznedar, M., Fallon, J.H. & Atlas, S.W. (1998) MRI white matter diffusion anisotropy and PET metabolic rate in schizophrenia. *Neuroreport*, 9, 425-430.
- Buntinx, M., Vanderlocht, J., Hellings, N., Vandenabeele, F., Lambrichts, I., Raus, J., Ameloot, M., Stinissen, P. & Steels, P. (2003) Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: Morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J. Neurocytol.*, 32, 25-38.
- Butt, A.M., Ibrahim, M., Ruge, F.M. & Berry, M. (1995) Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody rip. *Glia*, 14, 185-197.
- Camacho, M., Godessart, N., Anton, R., Garcia, M. & Vila, L. (1995) Interleukin-1 enhances the ability of cultured human umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J. Biol. Chem.*, 270, 17279-17286.
- Cannon, T.D., Hennah, W., van Erp, T.G., Thompson, P.M., Lonqvist, J., Huttunen, M., Gasperoni, T., Tuulio-Henriksson, A., Pirkola, T., Toga, A.W., Kaprio, J., Mazziotta, J. & Peltonen, L. (2005) Association of DISC1/TRAX haplotypes with schizophrenia, reduced prefrontal gray matter, and impaired short- and long-term memory. *Arch. Gen. Psychiatry*, 62, 1205-1213.
- Cannon, T.D., van Erp, T.G., Huttunen, M., Lonqvist, J., Salonen, O., Valanne, L., Poutanen, V.P., Standertskjold-Nordenstam, C.G., Gur, R.E. & Yan, M. (1998) Regional gray matter, white matter, and cerebrospinal fluid distributions in schizophrenic patients, their siblings, and controls. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55, 1084-1091.
- Carenini, S., Montag, D., Cremer, H., Schachner, M. & Martini, R. (1997) Absence of the myelin-associated glycoprotein (MAG) and the neural cell adhesion molecule (N-CAM) interferes with the maintenance, but not with the formation of peripheral myelin. *Cell Tissue Res.*, 287, 3-9.

B*ibliografia*

- Carre, J.L., Goetz, B.D., O'Connor, L.T., Bremer, Q. & Duncan, I.D. (2002) Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neurosci. Lett.*, 330, 17-20.
- Carson, J.H. & Barbarese, E. (2005) Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biol. Cell.*, 97, 51-62.
- Carson, J.H., Cui, H., Krueger, W., Schlepchenko, B., Brumwell, C. & Barbarese, E. (2001) RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results Probl. Cell Differ.*, 34, 69-81.
- Carson, J.H., Kwon, S. & Barbarese, E. (1998) RNA trafficking in myelinating cells. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8, 607-612.
- Carter, C.J. (2006) Schizophrenia susceptibility genes converge on interlinked pathways related to glutamatergic transmission and long-term potentiation, oxidative stress and oligodendrocyte viability. *Schizophr. Res.*, 86, 1-14.
- Cazzullo, C.L., Smeraldi, E. & Penati, G. (1974) The leucocyte antigenic system HL-A as a possible genetic marker of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry*, 125, 25-27.
- Chambers, J.S. & Perrone-Bizzozero, N.I. (2004) Altered myelination of the hippocampal formation in subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochem. Res.*, 29, 2293-2302.
- Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F. & Schwab, M.E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 403, 434-439.
- Colhoun, H.M., McKeigue, P.M. & Davey Smith, G. (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*, 361, 865-872.
- Colman, D.R., Kreibich, G., Frey, A.B. & Sabatini, D.D. (1982) Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol.*, 95, 598-608.

- Copland, C., Dracheva, S. (2002) mRNA expression of three isoforms of myelin associated glycoprotein (MAG) in patients with schizophrenia. Abstracts of the Society of Neuroscience, 28,494.
- Costas, J., Torres, M., Cristobo, I., Phillips, C. & Carracedo, A. (2005) Relative efficiency of the linkage disequilibrium mapping approach in detecting candidate genes for schizophrenia in different european populations. *Genomics*, 86, 280-286.
- Curat, C.A. & Vogel, W.F. (2002) Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13, 2648-2656.
- Curat, C.A., Eck, M., Dervillez, X. & Vogel, W.F. (2001) Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding. *J. Biol. Chem.*, 276, 45952-45958.
- Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I., Buchsbaum, M., Harvey, P.D., Hof, P.R., Buxbaum, J. & Haroutunian, V. (2003) White matter changes in schizophrenia: Evidence for myelin-related dysfunction. *Arch. Gen. Psychiatry*, 60, 443-456.
- Dawson, M.L., Levine, J.M. & Reynolds, R. (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors? *J. Neurosci. Res.*, 61, 471-479.
- De Marchis, S., Melcangi, R.C., Modena, C., Cavaretta, I., Peretto, P., Agresti, C. & Fasolo, A. (1997) Identification of the glial cell types containing carnosine-related peptides in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, 237, 37-40.
- de Vries, H., de Jonge, J.C., Schrage, C., van der Haar, M.E. & Hoekstra, D. (1997) Differential and cell development-dependent localization of myelin mRNAs in oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 47, 479-488.
- DeLisi, L.E., Shaw, S.H., Crow, T.J., Shields, G., Smith, A.B., Larach, V.W., Wellman, N., Loftus, J., Nanthakumar, B., Razi, K., Stewart, J., Comazzi, M., Vita, A., Heffner, T. & Sherrington, R. (2002) A genome-wide scan for linkage

B*ibliografia*

- to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry*, 159, 803-812.
- DeLisi, L.E., Sakuma, M., Tew, W., Kushner, M., Hoff, A.L. & Grimson, R. (1997) Schizophrenia as a chronic active brain process: A study of progressive brain structural change subsequent to the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res.*, 74, 129-140.
- Devine, J.M., Tsang, A.S. & Williams, J.G. (1982) Differential expression of the members of the discoidin I multigene family during growth and development of *dictyostelium discoideum*. *Cell*, 28, 793-800.
- Di Marco, E., Cutuli, N., Guerra, L., Cancedda, R. & De Luca, M. (1993) Molecular cloning of *trkE*, a novel *trk*-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues. *J. Biol. Chem.*, 268, 24290-24295.
- Di Trapani, G., Gregori, B., Servidei, S., Ricci, E., Sabatelli, M. & Tonali, P. (1997) Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Clin. Neuropathol.*, 16, 195-200.
- Diehl, H.J., Schaich, M., Budzinski, R.M. & Stoffel, W. (1986) Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 9807-9811.
- Dracheva, S., Davis, K.L., Chin, B., Woo, D.A., Schmeidler, J. & Haroutunian, V. (2006) Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients. *Neurobiol. Dis.*, 21, 531-540.
- Dracheva, S., Elhakem, S.L., McGurk, S.R., Davis, K.L. & Haroutunian, V. (2004) GAD67 and GAD65 mRNA and protein expression in cerebrocortical regions of elderly patients with schizophrenia. *J. Neurosci. Res.*, 76, 581-592.

- Ellison, J.A. & de Vellis, J. (1995) Amoeboid microglia expressing GD3 ganglioside are concentrated in regions of oligodendrogenesis during development of the rat corpus callosum. *Glia*, 14, 123-132.
- Espinosa de los Monteros, A., Pena, L.A. & de Vellis, J. (1989) Does transferrin have a special role in the nervous system? *J. Neurosci. Res.*, 24, 125-136.
- Fan, J.B., Tang, J.X., Gu, N.F., Feng, G.Y., Zou, F.G., Xing, Y.L., Shi, J.G., Zhao, S.M., Zhu, S.M., Ji, L.P., Sun, W.W., Zheng, Y.L., Liu, W.Q., Breen, G., St Clair, D. & He, L. (2002) A family-based and case-control association study of the NOTCH4 gene and schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 7, 100-103.
- Fanous, A.H., van den Oord, E.J., Riley, B.P., Aggen, S.H., Neale, M.C., O'Neill, F.A., Walsh, D. & Kendler, K.S. (2005) Relationship between a high-risk haplotype in the DTNBP1 (dysbindin) gene and clinical features of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 162, 1824-1832.
- Ferrer, I., Pastor, P., Rey, M.J., Munoz, E., Puig, B., Pastor, E., Oliva, R. & Tolosa, E. (2003) Tau phosphorylation and kinase activation in familial tauopathy linked to deln296 mutation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 29, 23-34.
- Ferri, N., Carragher, N.O. & Raines, E.W. (2004) Role of discoidin domain receptors 1 and 2 in human smooth muscle cell-mediated collagen remodeling: Potential implications in atherosclerosis and lymphangiomyomatosis. *Am. J. Pathol.*, 164, 1575-1585.
- Filbin, M.T. (1996) The muddle with MAG. *Mol. Cell. Neurosci.*, 8, 84-92.
- Foehr, E.D., Tatavos, A., Tanabe, E., Raffioni, S., Goetz, S., Dimarco, E., De Luca, M. & Bradshaw, R.A. (2000) Discoidin domain receptor 1 (DDR1) signaling in PC12 cells: Activation of juxtamembrane domains in PDGFR/DDR/TrkA chimeric receptors. *FASEB J.*, 14, 973-981.
- Franco-Pons, N., Virgos, C., Vogel, W.F., Urena, J.M., Soriano, E., del Rio, J.A. & Vilella, E. (2006) Expression of discoidin domain receptor 1 during mouse

B*ibliografia*

- brain development follows the progress of myelination. *Neuroscience*, 140, 463-475.
- Fredman, P., Magnani, J.L., Nirenberg, M. & Ginsburg, V. (1984) Monoclonal antibody A2B5 reacts with many gangliosides in neuronal tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 233, 661-666.
- Friedman, B., Hockfield, S., Black, J.A., Woodruff, K.A. & Waxman, S.G. (1989) In situ demonstration of mature oligodendrocytes and their processes: An immunocytochemical study with a new monoclonal antibody, rip. *Glia*, 2, 380-390.
- Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M. & Martini, R. (1995) Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur. J. Neurosci.*, 7, 511-515.
- Fujita, N., Kemper, A., Dupree, J., Nakayasu, H., Bartsch, U., Schachner, M., Maeda, N., Suzuki, K. & Popko, B. (1998) The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. *J. Neurosci.*, 18, 1970-1978.
- Gallo, V. & Armstrong, R.C. (1995) Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. *J. Neurosci.*, 15, 394-406.
- Garcia-Ladona, F.J., Huss, Y., Frey, P. & Ghandour, M.S. (1997) Oligodendrocytes express different isoforms of beta-amyloid precursor protein in chemically defined cell culture conditions: In situ hybridization and immunocytochemical detection. *J. Neurosci. Res.*, 50, 50-61.
- Ghandour, M.S. & Skoff, R.P. (1991) Double-labeling in situ hybridization analysis of mRNAs for carbonic anhydrase II and myelin basic protein: Expression in developing cultured glial cells. *Glia*, 4, 1-10.
- Ghandour, M.S., Langley, O.K., Vincendon, G., Gombos, G., Filippi, D., Limozin, N., Dalmaso, D. & Laurent, G. (1980) Immunochemical and

immunohistochemical study of carbonic anhydrase II in adult rat cerebellum: A marker for oligodendrocytes. *Neuroscience*, 5, 559-571.

Goldberg, D.P., William P. (1988). *A user's guide to the GHQ*. Windsor: NFER-Nelson

GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T. & Strittmatter, S.M. (2000) Identification of the nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature*, 403, 439-444.

Gravel, M., Peterson, J., Yong, V.W., Kottis, V., Trapp, B. & Braun, P.E. (1996) Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol. Cell. Neurosci.*, 7, 453-466.

Gregorio, S.P., Mury, F.B., Ojopi, E.B., Sallet, P.C., Moreno, D.H., Yacubian, J., Tavares, H., Santos, F.R., Gattaz, W.F. & Dias-Neto, E. (2005) Nogo CAA 3'UTR insertion polymorphism is not associated with schizophrenia nor with bipolar disorder. *Schizophr. Res.*, 75, 5-9.

Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N. & Nave, K.A. (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*, 280, 1610-1613.

Grinspan, J.B. & Franceschini, B. (1995) Platelet-derived growth factor is a survival factor for PSA-NCAM+ oligodendrocyte pre-progenitor cells. *J. Neurosci. Res.*, 41, 540-551.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L. & Robertson, M. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66, 589-600.

B*ibliografia*

- Gur, R.E., Cowell, P.E., Latshaw, A., Turetsky, B.I., Grossman, R.I., Arnold, S.E., Bilker, W.B. & Gur, R.C. (2000) Reduced dorsal and orbital prefrontal gray matter volumes in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 57, 761-768.
- Gur, R.E., Turetsky, B.I., Bilker, W.B. & Gur, R.C. (1999) Reduced gray matter volume in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 56, 905-911.
- Gurling, H., Kalsi, G., Chen, A.C., Green, M., Butler, R., Read, T., Murphy, P., Curtis, D., Sharma, T. & Petursson, H. (1995) Schizophrenia susceptibility and chromosome 6p24-22. *Nat. Genet.*, 11, 234-235.
- Gurling, H.M., Critchley, H., Datta, S.R., McQuillin, A., Blaveri, E., Thirumalai, S., Pimm, J., Krasucki, R., Kalsi, G., Queded, D., Lawrence, J., Bass, N., Choudhury, K., Puri, V., O'Daly, O., Curtis, D., Blackwood, D., Muir, W., Malhotra, A.K., Buchanan, R.W., Good, C.D., Frackowiak, R.S. & Dolan, R.J. (2006) Genetic association and brain morphology studies and the chromosome 8p22 pericentriolar material 1 (PCM1) gene in susceptibility to schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63, 844-854.
- Hakak, Y., Walker, J.R., Li, C., Wong, W.H., Davis, K.L., Buxbaum, J.D., Haroutunian, V. & Fienberg, A.A. (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 4746-4751.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 417, 182-187.
- Hardy, R. & Reynolds, R. (1993) Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *J. Neurosci. Res.*, 36, 121-126.
- Hardy, R. & Reynolds, R. (1991) Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development*, 111, 1061-1080.

- Haroutunian, V., Katsel, P., Dracheva, S., Stewart, D.G. & Davis, K.L. (2007) Variations in oligodendrocyte-related gene expression across multiple cortical regions: Implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, , 1-9.
- Harrison, P.J. (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122 (Pt 4), 593-624.
- He, Z. & Tessier-Lavigne, M. (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell*, 90, 739-751.
- Heinzelmann-Schwarz, V.A., Gardiner-Garden, M., Henshall, S.M., Scurry, J., Scolyer, R.A., Davies, M.J., Heinzelmann, M., Kalish, L.H., Bali, A., Kench, J.G., Edwards, L.S., Vanden Bergh, P.M., Hacker, N.F., Sutherland, R.L. & O'Brien, P.M. (2004) Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, claudin 3, and ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10, 4427-4436.
- Heldin, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80, 213-223.
- Hennah, W., Thomson, P., Peltonen, L. & Porteous, D. (2006) Genes and schizophrenia: Beyond schizophrenia: The role of DISC1 in major mental illness. *Schizophr. Bull.*, 32, 409-416.
- Hennah, W., Varilo, T., Kestila, M., Paunio, T., Arajärvi, R., Haukka, J., Parker, A., Martin, R., Levitzky, S., Partonen, T., Meyer, J., Lonqvist, J., Peltonen, L. & Ekelund, J. (2003) Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 3151-3159.
- Hirayasu, Y., Tanaka, S., Shenton, M.E., Salisbury, D.F., DeSantis, M.A., Levitt, J.J., Wible, C., Yurgelun-Todd, D., Kikinis, R., Jolesz, F.A. & McCarley, R.W. (2001) Prefrontal gray matter volume reduction in first episode schizophrenia. *Cereb. Cortex*, 11, 374-381.

B*ibliografia*

- Hockfield, S. & McKay, R.D. (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.*, 5, 3310-3328.
- Hoek, K.S., Kidd, G.J., Carson, J.H. & Smith, R. (1998) hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry*, 37, 7021-7029.
- Hof, P.R., Haroutunian, V., Friedrich, V.L., Jr, Byne, W., Buitron, C., Perl, D.P. & Davis, K.L. (2003) Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 53, 1075-1085.
- Hof, P.R., Haroutunian, V., Copland, C., Davis, K.L. & Buxbaum, J.D. (2002) Molecular and cellular evidence for an oligodendrocyte abnormality in schizophrenia. *Neurochem. Res.*, 27, 1193-1200.
- Hoffmann, A.M., Bakardjiev, A. & Bauer, K. (1996) Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neurosci. Lett.*, 215, 29-32.
- Holz, A. & Schwab, M.E. (1997) Developmental expression of the myelin gene MOBP in the rat nervous system. *J. Neurocytol.*, 26, 467-477.
- Holz, A., Schaeren-Wiemers, N., Schaefer, C., Pott, U., Colello, R.J. & Schwab, M.E. (1996) Molecular and developmental characterization of novel cDNAs of the myelin-associated/oligodendrocytic basic protein. *J. Neurosci.*, 16, 467-477.
- Hou, G., Vogel, W.F. & Bendeck, M.P. (2002) Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ. Res.*, 90, 1147-1149.
- Hou, G., Vogel, W. & Bendeck, M.P. (2001) The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J. Clin. Invest.*, 107, 727-735.
- Huber, A.B., Weinmann, O., Brosamle, C., Oertle, T. & Schwab, M.E. (2002) Patterns of nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J. Neurosci.*, 22, 3553-3567.

- Iglesias, A., Bauer, J., Litzemberger, T., Schubart, A. & Lington, C. (2001) T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia*, 36, 220-234.
- Ikenaka, K., Kagawa, T. & Mikoshiba, K. (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in nonglial cells. *J. Neurochem.*, 58, 2248-2253.
- Ivo, R., Schulze, T.G., Schumacher, J., Kesper, K., Muller, D.J., Kremer, I., Dobrusin, M., Mujaheed, M., Murad, I., Bláranu, M., Bannoura, I., Reshef, A., Bachner-Melman, R., Ebstein, R.P., Propping, P., Belmaker, R.H., Maier, W., Rietschel, M., Nothen, M.M. & Cichon, S. (2006) No evidence for association between NOTCH4 and schizophrenia in a large family-based and case-control association analysis. *Psychiatr. Genet.*, 16, 197-203.
- Johansson, F.K., Goransson, H. & Westermarck, B. (2005) Expression analysis of genes involved in brain tumor progression driven by retroviral insertional mutagenesis in mice. *Oncogene*, 24, 3896-3905.
- Johnson, J.D., Edman, J.C. & Rutter, W.J. (1993) A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 5677-5681.
- Johnstone, E.C., Crow, T.J., Frith, C.D., Husband, J. & Kreel, L. (1976) Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet*, 2, 924-926.
- Joo, E.J., Lee, K.Y., Jeong, S.H., Ahn, Y.M., Koo, Y.J. & Kim, Y.S. (2006) The dysbindin gene (DTNBP1) and schizophrenia: No support for an association in the Korean population. *Neurosci. Lett.*, 407, 101-106.
- Joo, E.J., Lee, J.H., Cannon, T.D. & Price, R.A. (1999) Possible association between schizophrenia and a CAG repeat polymorphism in the spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) gene on human chromosome 6p23. *Psychiatr. Genet.*, 9, 7-11.

B*ibliografia*

- Josephson, A., Trifunovski, A., Widmer, H.R., Widenfalk, J., Olson, L. & Spenger, C. (2002) Nogo-receptor gene activity: Cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *J. Comp. Neurol.*, 453, 292-304.
- Josephson, A., Widenfalk, J., Widmer, H.W., Olson, L. & Spenger, C. (2001) NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp. Neurol.*, 169, 319-328.
- Kamholz, J., Toffenetti, J. & Lazzarini, R.A. (1988) Organization and expression of the human myelin basic protein gene. *J. Neurosci. Res.*, 21, 62-70.
- Kamohara, H., Yamashiro, S., Galligan, C. & Yoshimura, T. (2001) Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1alpha) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices. *FASEB J.*, 15, 2724-2726.
- Kane, W.H. & Davie, E.W. (1986) Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 6800-6804.
- Katsel, P., Davis, K.L. & Haroutunian, V. (2005) Variations in myelin and oligodendrocyte-related gene expression across multiple brain regions in schizophrenia: A gene ontology study. *Schizophr. Res.*, 79, 157-173.
- Kendler, K.S. & Diehl, S.R. (1993) The genetics of schizophrenia: A current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr. Bull.*, 19, 261-285.
- Keshavan, M.S., Haas, G.L., Kahn, C.E., Aguilar, E., Dick, E.L., Schooler, N.R., Sweeney, J.A. & Pettegrew, J.W. (1998) Superior temporal gyrus and the course of early schizophrenia: Progressive, static, or reversible? *J. Psychiatr. Res.*, 32, 161-167.
- Kiernan, J.A. (2000). *El sistema nervioso humano. Un punto de vista anatómico*. 7ª Edición. Mc Graw-Hill Interamericana.

- Klugmann, M., Schwab, M.H., Puhlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I.R. & Nave, K.A. (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*, 18, 59-70.
- Koenig, E. (1965) Synthetic mechanisms in the axon. II. RNA in myelin-free axons of the cat. *J. Neurochem.*, 12, 357-361.
- Kolodkin, A. L., Levenson, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J. & Ginty, D.D. (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, 90, 753-762.
- Koo, D.H., McFadden, C., Huang, Y., Abdulhussein, R., Friese-Hamim, M. & Vogel, W.F. (2006) Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett.*, 580, 15-22.
- Kramer, E.M., Schardt, A. & Nave, K.A. (2001) Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc. Res. Tech.*, 52, 656-671.
- Kubicki, M., McCarley, R., Westin, C.F., Park, H.J., Maier, S., Kikinis, R., Jolesz, F.A. & Shenton, M.E. (2007) A review of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.*, 41, 15-30.
- Lander, E.S. & Schork, N.J. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265, 2037-2048.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R. & Nave, K.A. (2003) Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.*, 33, 366-374.
- Lauriello, J., Hoff, A., Wieneke, M.H., Blankfeld, H., Faustman, W.O., Rosenbloom, M., DeMent, S., Sullivan, E.V., Lim, K.O. & Pfefferbaum, A. (1997) Similar extent of brain dysmorphology in severely ill women and men with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 154, 819-825.

B*ibliografia*

- Laval, S., Butler, R., Shelling, A.N., Hanby, A.M., Poulson, R. & Ganesan, T.S. (1994) Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Differ.*, 5, 1173-1183.
- Lawrie, S.M. & Abukmeil, S.S. (1998) Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br. J. Psychiatry*, 172, 110-120.
- Layne, M.D., Endege, W.O., Jain, M.K., Yet, S.F., Hsieh, C.M., Chin, M.T., Perrella, M.A., Blonar, M.A., Haber, E. & Lee, M.E. (1998) Aortic carboxypeptidase-like protein, a novel protein with discoidin and carboxypeptidase-like domains, is up-regulated during vascular smooth muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 273, 15654-15660.
- Leitinger, B. (2003) Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. identification of collagen binding sites in DDR2. *J. Biol. Chem.*, 278, 16761-16769.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. & McKay, R.D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60, 585-595.
- Leroy, K., Duyckaerts, C., Bovekamp, L., Muller, O., Anderton, B.H. & Brion, J.P. (2001) Increase of adenomatous polyposis coli immunoreactivity is a marker of reactive astrocytes in alzheimer's disease and in other pathological conditions. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 102, 1-10.
- Levitt, P., Eagleson, K.L., Chan, A.V., Ferri, R.T. & Lillien, L. (1997) Signaling pathways that regulate specification of neurons in developing cerebral cortex. *Dev. Neurosci.*, 19, 6-8.
- Li, C., Tropak, M.B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramow-Newerly, W., Trapp, B., Peterson, A. & Roder, J. (1994) Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature*, 369, 747-750.
- Li, J.Z., Vawter, M.P., Walsh, D.M., Tomita, H., Evans, S.J., Choudary, P.V., Lopez, J.F., Avelar, A., Shokoohi, V., Chung, T., Mesarwi, O., Jones, E.G., Watson,

- S.J., Akil, H., Bunney, W.E., Jr & Myers, R.M. (2004) Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum. Mol. Genet.*, 13, 609-616.
- Lieberman, J., Chakos, M., Wu, H., Alvir, J., Hoffman, E., Robinson, D. & Bilder, R. (2001) Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 49, 487-499.
- Ligon, K.L., Fancy, S.P., Franklin, R.J. & Rowitch, D.H. (2006) Olig gene function in CNS development and disease. *Glia*, 54, 1-10.
- Lim, K.O. & Helpert, J.A. (2002) Neuropsychiatric applications of DTI - a review. *NMR Biomed.*, 15, 587-593.
- Lim, K.O., Hedehus, M., Moseley, M., de Crespigny, A., Sullivan, E.V. & Pfefferbaum, A. (1999) Compromised white matter tract integrity in schizophrenia inferred from diffusion tensor imaging. *Arch. Gen. Psychiatry*, 56, 367-374.
- Lin, D., Gish, G.D., Songyang, Z. & Pawson, T. (1999) The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J. Biol. Chem.*, 274, 3726-3733.
- Lindholm, E., Ekholm, B., Balciuniene, J., Johansson, G., Castensson, A., Koisti, M., Nylander, P.O., Pettersson, U., Adolfsson, R. & Jazin, E. (1999) Linkage analysis of a large swedish kindred provides further support for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6p23. *Am. J. Med. Genet.*, 88, 369-377.
- Liu, L.L., Wei, J., Zhang, X., Li, X.Y., Shen, Y., Liu, S.Z., Ju, G.Z., Shi, J.P., Yu, Y.Q., Xu, Q. & Hemmings, G.P. (2004) Lack of a genetic association between the TNXB locus and schizophrenia in a chinese population. *Neurosci. Lett.*, 355, 149-151.
- Liu, X., Qin, W., He, G., Yang, Y., Chen, Q., Zhou, J., Li, D., Gu, N., Xu, Y., Feng, G., Sang, H., Hao, X., Zhang, K., Wang, S. & He, L. (2005) A family-based

B*ibliografia*

- association study of the MOG gene with schizophrenia in the chinese population. *Schizophr. Res.*, 73, 275-280.
- Lobato, M.I., Belmonte-de-Abreu, P., Knijnik, D., Teruchkin, B., Ghisolfi, E. & Henriques, A. (2001) Neurodevelopmental risk factors in schizophrenia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34, 155-163.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P. & Binder, L.I. (1995) Functional implications for the microtubule-associated protein tau: Localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 10369-10373.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. & Lassmann, H. (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain*, 122 (Pt 12), 2279-2295.
- Macklin, W.B., Weill, C.L. & Deininger, P.L. (1986) Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells. *J. Neurosci. Res.*, 16, 203-217.
- Matsuyama, W., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Shirahama, Y., Higashimoto, I., Osame, M. & Arimura, K. (2005) Involvement of discoidin domain receptor 1 in the deterioration of pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 33, 565-573.
- Matsuyama, W., Watanabe, M., Shirahama, Y., Oonakahara, K., Higashimoto, I., Yoshimura, T., Osame, M. & Arimura, K. (2005) Activation of discoidin domain receptor 1 on CD14-positive bronchoalveolar lavage fluid cells induces chemokine production in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Immunol.*, 174, 6490-6498.
- Matsuyama, W., Wang, L., Farrar, W.L., Faure, M. & Yoshimura, T. (2004) Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in human macrophages: Role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B. *J. Immunol.*, 172, 2332-2340.

- Matsuyama, W., Kamohara, H., Galligan, C., Faure, M. & Yoshimura, T. (2003) Interaction of discoidin domain receptor 1 isoform b (DDR1b) with collagen activates p38 mitogen-activated protein kinase and promotes differentiation of macrophages. *FASEB J.*, 17, 1286-1288.
- Maziade, M., Roy, M.A., Rouillard, E., Bissonnette, L., Fournier, J.P., Roy, A., Garneau, Y., Montgrain, N., Potvin, A., Cliche, D., Dion, C., Wallot, H., Fournier, A., Nicole, L., Lavalley, J.C. & Merette, C. (2001) A search for specific and common susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: A linkage study in 13 target chromosomes. *Mol. Psychiatry*, 6, 684-693.
- Mendelsohn, A., Strous, R.D., Bleich, M., Assaf, Y. & Hendler, T. (2006) Regional axonal abnormalities in first episode schizophrenia: Preliminary evidence based on high b-value diffusion-weighted imaging. *Psychiatry Res.*, 146, 223-229.
- Meng, J., Shi, Y., Zhao, X., Zhou, J., Zheng, Y., Tang, R., Ma, G., Zhu, X., He, Z., Wang, Z., Xu, Y., Feng, G. & He, L. (2007) No significant association between the genetic polymorphisms in the GSK-3beta gene and schizophrenia in the chinese population. *J. Psychiatr. Res.*, .
- Mexal, S., Berger, R., Adams, C.E., Ross, R.G., Freedman, R. & Leonard, S. (2006) Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles. *Brain Res.*, 1106, 1-11.
- Meyer-Franke, A. & Barres, B. (1994) Axon myelination. myelination without myelin-associated glycoprotein. *Curr. Biol.*, 4, 847-850.
- Middleton, F.A., Mirnics, K., Pierri, J.N., Lewis, D.A. & Levitt, P. (2002) Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *J. Neurosci.*, 22, 2718-2729.
- Minami, T., Nobuhara, K., Okugawa, G., Takase, K., Yoshida, T., Sawada, S., Hakawa, S., Ikeda, K. & Kinoshita, T. (2003) Diffusion tensor magnetic

Bibliografia

- resonance imaging of disruption of regional white matter in schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 47, 141-145.
- Mirnics, K., Middleton, F.A., Marquez, A., Lewis, D.A. & Levitt, P. (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron*, 28, 53-67.
- Mohan, R.R., Mohan, R.R. & Wilson, S.E. (2001) Discoidin domain receptor (DDR) 1 and 2: Collagen-activated tyrosine kinase receptors in the cornea. *Exp. Eye Res.*, 72, 87-92.
- Moises, H.W., Yang, L., Kristbjarnarson, H., Wiese, C., Byerley, W., Macciardi, F., Arolt, V., Blackwood, D., Liu, X. & Sjogren, B. (1995) An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Nat. Genet.*, 11, 321-324.
- Molina, V., Reig, S., Sanz, J., Palomo, T., Benito, C., Sanchez, J., Sarramea, F., Pascau, J. & Desco, M. (2005) Increase in gray matter and decrease in white matter volumes in the cortex during treatment with atypical neuroleptics in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 80, 61-71.
- Moller, J.R. (1996) Rapid conversion of myelin-associated glycoprotein to a soluble derivative in primates. *Brain Res.*, 741, 27-31.
- Montag, D., Giese, K.P., Bartsch, U., Martini, R., Lang, Y., Bluthmann, H., Karthigasan, J., Kirschner, D.A., Wintergerst, E.S. & Nave, K.A. (1994) Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron*, 13, 229-246.
- Montague, P., Dickinson, P.J., McCallion, A.S., Stewart, G.J., Savioz, A., Davies, R.W., Kennedy, P.G. & Griffiths, I.R. (1997) Developmental expression of the murine mobp gene. *J. Neurosci. Res.*, 49, 133-143.
- Morello, D., Dautigny, A., Pham-Dinh, D. & Jolles, P. (1986) Myelin proteolipid protein (PLP and DM-20) transcripts are deleted in jimpy mutant mice. *EMBO J.*, 5, 3489-3493.

- Morris, D.W., McGhee, K.A., Schwaiger, S., Scully, P., Quinn, J., Meagher, D., Waddington, J.L., Gill, M. & Corvin, A.P. (2003) No evidence for association of the dysbindin gene [DTNBP1] with schizophrenia in an Irish population-based study. *Schizophr. Res.*, 60, 167-172.
- Mowry, B.J., Nancarrow, D.J., Lennon, D.P., Sandkuijl, L.A., Crowe, R.R., Silverman, J.M., Mohs, R.C., Siever, L.J., Endicott, J. & Sharpe, L. (1995) Schizophrenia susceptibility and chromosome 6p24-22. *Nat. Genet.*, 11, 233-234.
- Mukai, J., Liu, H., Burt, R.A., Swor, D.E., Lai, W.S., Karayiorgou, M. & Gogos, J.A. (2004) Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat. Genet.*, 36, 725-731.
- Mullenbach, E., Walter, L. & Dressel, R. (2006) A novel discoidin domain receptor 1 (Ddr1) transcript is expressed in postmeiotic germ cells of the rat testis depending on the major histocompatibility complex haplotype. *Gene*, 372, 53-61.
- Munro, T.P., Magee, R.J., Kidd, G.J., Carson, J.H., Barbarese, E., Smith, L.M. & Smith, R. (1999) Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J. Biol. Chem.*, 274, 34389-34395.
- Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J.D. & Hirokawa, K. (1997) Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology*, 65, 195-203.
- Nishiyama, A., Chang, A. & Trapp, B.D. (1999) NG2+ glial cells: A novel glial cell population in the adult brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58, 1113-1124.
- Nishiyama, A., Lin, X.H., Giese, N., Heldin, C.H. & Stallcup, W.B. (1996) Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 43, 299-314.

B*ibliografia*

- Novak, G. & Talerico, T. (2006) Nogo A, B and C expression in schizophrenia, depression and bipolar frontal cortex, and correlation of nogo expression with CAA/TATC polymorphism in 3'-UTR. *Brain Res.*, 1120, 161-171.
- Novak, G., Kim, D., Seeman, P. & Talerico, T. (2002) Schizophrenia and nogo: Elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 107, 183-189.
- Ohtsuki, T., Toru, M. & Arinami, T. (2001) Mutation screening of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 (GRM4) gene in patients with schizophrenia. *Psychiatr. Genet.*, 11, 79-83.
- O'Neill, R.C., Minuk, J., Cox, M.E., Braun, P.E. & Gravel, M. (1997) CNP2 mRNA directs synthesis of both CNP1 and CNP2 polypeptides. *J. Neurosci. Res.*, 50, 248-257.
- Osterhout, D.J., Wolven, A., Wolf, R.M., Resh, M.D. & Chao, M.V. (1999) Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of fyn tyrosine kinase. *J. Cell Biol.*, 145, 1209-1218.
- Owen, F. & Simpson, M. (1994) The neurochemistry of schizophrenia. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.*, 4, 133-159.
- Pedraza, L., Fidler, L., Staugaitis, S.M. & Colman, D.R. (1997) The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron*, 18, 579-589.
- Peirce, T.R., Bray, N.J., Williams, N.M., Norton, N., Moskvina, V., Preece, A., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Owen, M.J. & O'Donovan, M.C. (2006) Convergent evidence for 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63, 18-24.
- Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.D. & Schlessinger, J. (1997) Identification of a novel contactin-associated

- transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.*, 16, 978-988.
- Perez, J.L., Jing, S.Q. & Wong, T.W. (1996) Identification of two isoforms of the cak receptor kinase that are coexpressed in breast tumor cell lines. *Oncogene*, 12, 1469-1477.
- Perez, J.L., Shen, X., Finkernagel, S., Sciorra, L., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. & Wong, T.W. (1994) Identification and chromosomal mapping of a receptor tyrosine kinase with a putative phospholipid binding sequence in its ectodomain. *Oncogene*, 9, 211-219.
- Pettegrew, J.W., Keshavan, M.S., Panchalingam, K., Strychor, S., Kaplan, D.B., Tretta, M.G. & Allen, M. (1991) Alterations in brain high-energy phosphate and membrane phospholipid metabolism in first-episode, drug-naive schizophrenics. A pilot study of the dorsal prefrontal cortex by in vivo phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48, 563-568.
- Peyron, F., Timsit, S., Thomas, J.L., Kagawa, T., Ikenaka, K. & Zalc, B. (1997) In situ expression of PLP/DM-20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP. *J. Neurosci. Res.*, 50, 190-201.
- Pfeiffer, S.E., Warrington, A.E. & Bansal, R. (1993) The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.*, 3, 191-197.
- Pham-Dinh, D., Della Gaspera, B., Kerlero de Rosbo, N. & Dautigny, A. (1995) Structure of the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene and multiple alternative spliced isoforms. *Genomics*, 29, 345-352.
- Playford, M.P., Butler, R.J., Wang, X.C., Katso, R.M., Cooke, I.E. & Ganesan, T.S. (1996) The genomic structure of discoidin receptor tyrosine kinase. *Genome Res.*, 6, 620-627.

B*ibliografia*

- Pongrac, J., Middleton, F.A., Lewis, D.A., Levitt, P. & Mirnics, K. (2002) Gene expression profiling with DNA microarrays: Advancing our understanding of psychiatric disorders. *Neurochem. Res.*, 27, 1049-1063.
- Prasad, K.M., Chowdari, K.V., Nimgaonkar, V.L., Talkowski, M.E., Lewis, D.A. & Keshavan, M.S. (2005) Genetic polymorphisms of the RGS4 and dorsolateral prefrontal cortex morphometry among first episode schizophrenia patients. *Mol. Psychiatry*, 10, 213-219.
- Pribyl, T.M., Campagnoni, C.W., Kampf, K., Kashima, T., Handley, V.W., McMahon, J. & Campagnoni, A.T. (1993) The human myelin basic protein gene is included within a 179-kilobase transcription unit: Expression in the immune and central nervous systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 10695-10699.
- Price, G., Bagary, M.S., Cercignani, M., Altmann, D.R. & Ron, M.A. (2005) The corpus callosum in first episode schizophrenia: A diffusion tensor imaging study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 76, 585-587.
- Prinjha, R., Moore, S.E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D.L. & Walsh, F.S. (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature*, 403, 383-384.
- Privat, A., Jacque, C., Bourre, J.M., Dupouey, P. & Baumann, N. (1979) Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse "shiverer". *Neurosci. Lett.*, 12, 107-112.
- Qin, W., Gao, J., Xing, Q., Yang, J., Qian, X., Li, X., Guo, Z., Chen, H., Wang, L., Huang, X., Gu, N., Feng, G. & He, L. (2005) A family-based association study of PLP1 and schizophrenia. *Neurosci. Lett.*, 375, 207-210.
- Qiu, J., Cai, D. & Filbin, M.T. (2000) Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia*, 29, 166-174.
- Ram, R., Lorente, G., Nikolich, K., Urfer, R., Foehr, E. & Nagavarapu, U. (2006) Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and

- adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *J. Neurooncol.*, 76, 239-248.
- Readhead, C., Takasashi, N., Shine, H.D., Saavedra, R., Sidman, R. & Hood, L. (1990) Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 605, 280-285.
- Rehn, A. E. & Rees, S.M. (2005) Investigating the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 32, 687-696.
- Reynolds, R. & Hardy, R. (1997) Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J. Neurosci. Res.*, 47, 455-470.
- Richardson, W.D., Smith, H.K., Sun, T., Pringle, N.P., Hall, A. & Woodruff, R. (2000) Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. *Glia*, 29, 136-142.
- Roach, A., Takahashi, N., Pravtcheva, D., Ruddle, F. & Hood, L. (1985) Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell*, 42, 149-155.
- Roig, B., Virgos, C., Franco, N., Martorell, L., Valero, J., Costas, J., Carracedo, A., Labad, A., Vilella, E. The discoidin domain receptor 1 as a novel susceptibility gene for schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2007; doi: 10.1038/sj.mp.4001995.
- Sakamoto, O., Suga, M., Suda, T. & Ando, M. (2001) Expression of discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase on the human bronchial epithelium. *Eur. Respir. J.*, 17, 969-974.
- Sakuma, S., Saya, H., Tada, M., Nakao, M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Sawamura, Y., Shinohe, Y. & Abe, H. (1996) Receptor protein tyrosine kinase DDR is up-regulated by p53 protein. *FEBS Lett.*, 398, 165-169.

Bibliografia

- Sanchez, M.P., Tapley, P., Saini, S.S., He, B., Pulido, D. & Barbacid, M. (1994) Multiple tyrosine protein kinases in rat hippocampal neurons: Isolation of ptk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 1819-1823.
- Sanfilippo, M., Lafargue, T., Rusinek, H., Arena, L., Loneragan, C., Lautin, A., Feiner, D., Rotrosen, J. & Wolkin, A. (2000) Volumetric measure of the frontal and temporal lobe regions in schizophrenia: Relationship to negative symptoms. *Arch. Gen. Psychiatry*, 57, 471-480.
- Sauer, C.G., Gehrig, A., Warneke-Wittstock, R., Marquardt, A., Ewing, C.C., Gibson, A., Lorenz, B., Jurklies, B. & Weber, B.H. (1997) Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat. Genet.*, 17, 164-170.
- Saxe, D.F., Takahashi, N., Hood, L. & Simon, M.I. (1985) Localization of the human myelin basic protein gene (MBP) to region 18q22----qter by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 39, 246-249.
- Schachner, M. & Bartsch, U. (2000) Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia*, 29, 154-165.
- Schaeren-Wiemers, N. & Gerfin-Moser, A. (1993) A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: In situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry*, 100, 431-440.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211-225.
- Schlessinger, J. (1997) Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. *Cell*, 91, 869-872.
- Schwab, S.G., Knapp, M., Mondabon, S., Hallmayer, J., Borrmann-Hassenbach, M., Albus, M., Lerer, B., Rietschel, M., Trixler, M., Maier, W. & Wildenauer, D.B. (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the

- 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am. J. Hum. Genet.*, 72, 185-190.
- Schwab, S.G., Mondabon, S., Knapp, M., Albus, M., Hallmayer, J., Borrmann-Hassenbach, M., Trixler, M., Gross, M., Schulze, T.G., Rietschel, M., Lerer, B., Maier, W. & Wildenauer, D.B. (2003) Association of tumor necrosis factor alpha gene -G308A polymorphism with schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 65, 19-25.
- Schwab, S.G., Hallmayer, J., Freimann, J., Lerer, B., Albus, M., Borrmann-Hassenbach, M., Segman, R.H., Trixler, M., Rietschel, M., Maier, W. & Wildenauer, D.B. (2002) Investigation of linkage and association/linkage disequilibrium of HLA A-, DQA1-, DQB1-, and DRB1-alleles in 69 sib-pair- and 89 trio-families with schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.*, 114, 315-320.
- Schwab, S.G., Albus, M., Hallmayer, J., Honig, S., Borrmann, M., Lichtermann, D., Ebstein, R.P., Ackenheil, M., Lerer, B. & Risch, N. (1995) Evaluation of a susceptibility gene for schizophrenia on chromosome 6p by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Nat. Genet.*, 11, 325-327.
- Scolding, N., Franklin, R., Stevens, S., Heldin, C.H., Compston, A. & Newcombe, J. (1998) Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain*, 121 (Pt 12), 2221-2228.
- Selemon, L.D., Lidow, M.S. & Goldman-Rakic, P.S. (1999) Increased volume and glial density in primate prefrontal cortex associated with chronic antipsychotic drug exposure. *Biol. Psychiatry*, 46, 161-172.
- Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M. & McCarley, R.W. (2001) A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 49, 1-52.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisante-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Beckmann, J.S., Yakir, B., Risch, N., Zak, N.B. & Darvasi, A. (2002) A highly significant

Bibliografia

- association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 1296-1302.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G. & Yancopoulos, G.D. (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell*, 1, 25-34.
- Siegel, B.V., Jr, Nuechterlein, K.H., Abel, L., Wu, J.C. & Buchsbaum, M.S. (1995) Glucose metabolic correlates of continuous performance test performance in adults with a history of infantile autism, schizophrenics, and controls. *Schizophr. Res.*, 17, 85-94.
- Sinibaldi, L., De Luca, A., Bellacchio, E., Conti, E., Pasini, A., Paloscia, C., Spalletta, G., Caltagirone, C., Pizzuti, A. & Dallapiccola, B. (2004) Mutations of the nogo-66 receptor (RTN4R) gene in schizophrenia. *Hum. Mutat.*, 24, 534-535.
- Skaper, S.D., Moore, S.E. & Walsh, F.S. (2001) Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog. Neurobiol.*, 65, 593-608.
- Slack, B.E., Siniiaia, M.S. & Blusztajn, J.K. (2006) Collagen type I selectively activates ectodomain shedding of the discoidin domain receptor 1: Involvement of src tyrosine kinase. *J. Cell. Biochem.*, 98, 672-684.
- Smith, R. (2004) Moving molecules: MRNA trafficking in mammalian oligodendrocytes and neurons. *Neuroscientist*, 10, 495-500.
- Snell, R.S. (2003). *Neuroanatomia clínica*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Solly, S.K., Thomas, J.L., Monge, M., Demerens, C., Lubetzki, C., Gardinier, M.V., Matthieu, J.M. & Zalc, B. (1996) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia*, 18, 39-48.

- Sommer, I. & Schachner, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytochemical study in the central nervous system. *Dev. Biol.*, 83, 311-327.
- Sparkes, R.S., Mohandas, T., Heinzmann, C., Roth, H.J., Klisak, I. & Campagnoni, A.T. (1987) Assignment of the myelin basic protein gene to human chromosome 18q22-qter. *Hum. Genet.*, 75, 147-150.
- Spassky, N., Olivier, C., Perez-Villegas, E., Goujet-Zalc, C., Martinez, S., Thomas, J. & Zalc, B. (2000) Single or multiple oligodendroglial lineages: A controversy. *Glia*, 29, 143-148.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Lington, C. & Lassmann, H. (1998) Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.*, 8, 681-694.
- Straub, R.E., Jiang, Y., MacLean, C.J., Ma, Y., Webb, B.T., Myakishev, M.V., Harris-Kerr, C., Wormley, B., Sadek, H., Kadambi, B., Cesare, A.J., Gibberman, A., Wang, X., O'Neill, F.A., Walsh, D. & Kendler, K.S. (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 337-348.
- Straub, R.E., MacLean, C.J., O'Neill, F.A., Burke, J., Murphy, B., Duke, F., Shinkwin, R., Webb, B.T., Zhang, J. & Walsh, D. (1995) A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6p24-22: Evidence for genetic heterogeneity. *Nat. Genet.*, 11, 287-293.
- Sugai, T., Kawamura, M., Iritani, S., Araki, K., Makifuchi, T., Imai, C., Nakamura, R., Kakita, A., Takahashi, H. & Nawa, H. (2004) Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray: Impact on glial and neurotrophic gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1025, 84-91.

Bibliografia

- Sullivan, E.V., Lim, K.O., Mathalon, D., Marsh, L., Beal, D.M., Harris, D., Hoff, A.L., Faustman, W.O. & Pfefferbaum, A. (1998) A profile of cortical gray matter volume deficits characteristic of schizophrenia. *Cereb. Cortex*, 8, 117-124.
- Suzuki, K. (1998) Twenty five years of the "psychosine hypothesis": A personal perspective of its history and present status. *Neurochem. Res.*, 23, 251-259.
- Suzuki, K. & Suzuki, Y. (1971) Krabbe's globoid cell leukodystrophy: Deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase activity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 30, 145.
- Szeszko, P.R., Ardekani, B.A., Ashtari, M., Kumra, S., Robinson, D.G., Sevy, S., Gunduz-Bruce, H., Malhotra, A.K., Kane, J.M., Bilder, R.M. & Lim, K.O. (2005) White matter abnormalities in first-episode schizophrenia or schizoaffective disorder: A diffusion tensor imaging study. *Am. J. Psychiatry*, 162, 602-605.
- Tanaka, K., Nagayama, Y., Nakano, T., Takamura, N., Namba, H., Fukada, S., Kuma, K., Yamashita, S. & Niwa, M. (1998) Expression profile of receptor-type protein tyrosine kinase genes in the human thyroid. *Endocrinology*, 139, 852-858.
- Tansey, F.A., Zhang, H. & Cammer, W. (1996) Expression of carbonic anhydrase II mRNA and protein in oligodendrocytes during toxic demyelination in the young adult mouse. *Neurochem. Res.*, 21, 411-416.
- Tienari, P.J. & Wynne, L.C. (1994) Adoption studies of schizophrenia. *Ann. Med.*, 26, 233-237.
- Timsit, S., Martinez, S., Allinquant, B., Peyron, F., Puellas, L. & Zalc, B. (1995) Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J. Neurosci.*, 15, 1012-1024.
- Timsit, S.G., Bally-Cuif, L., Colman, D.R. & Zalc, B. (1992) DM-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. *J. Neurochem.*, 58, 1172-1175.

- Tkachev, D., Mimmack, M.L., Ryan, M.M., Wayland, M., Freeman, T., Jones, P.B., Starkey, M., Webster, M.J., Yolken, R.H. & Bahn, S. (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet*, 362, 798-805.
- Tochigi, M., Zhang, X., Ohashi, J., Hibino, H., Otowa, T., Rogers, M., Kato, T., Okazaki, Y., Kato, N., Tokunaga, K. & Sasaki, T. (2006) Association study of the dysbindin (DTNBP1) gene in schizophrenia from the Japanese population. *Neurosci. Res.*, 56, 154-158.
- Torrey, E.F., Webster, M., Knable, M., Johnston, N. & Yolken, R.H. (2000) The Stanley Foundation Brain Collection and Neuropathology Consortium. *Schizophr. Res.*, 44, 151-155.
- Torrey, E.F. & Peterson, M.R. (1976) The viral hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 2, 136-146.
- Tournier-Lasserre, E., Iba-Zizen, M.T., Romero, N. & Bousser, M.G. (1991) Autosomal dominant syndrome with stroke-like episodes and leukoencephalopathy. *Stroke*, 22, 1297-1302.
- Trapp, B.D., Andrews, S.B., Cootauco, C. & Quarles, R. (1989) The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *J. Cell Biol.*, 109, 2417-2426.
- Uranova, N., Orlovskaya, D., Vikhрева, O., Zimina, I., Kolomeets, N., Vostrikov, V. & Rachmanova, V. (2001) Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res. Bull.*, 55, 597-610.
- Uranova, N.A., Vostrikov, V.M., Orlovskaya, D.D. & Rachmanova, V.I. (2004) Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: A study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr. Res.*, 67, 269-275.

B*ibliografia*

- Urenjak, J., Williams, S.R., Gadian, D.G. & Noble, M. (1992) Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro. *J. Neurochem.*, 59, 55-61.
- Valent, A., Meddeb, M., Danglot, G., Duverger, A., Nguyen, V.C. & Bernheim, A. (1996) Assignment of the NTRK4 (trkE) gene to chromosome 6p21. *Hum. Genet.*, 98, 12-15.
- van Helden, J. (2003) Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3593-3596.
- Vawter, M.P., Crook, J.M., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., Becker, K.G. & Freed, W.J. (2002) Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: A preliminary study. *Schizophr. Res.*, 58, 11-20.
- Vazquez-Barquero, J.L., Gaite, L., Artal Simon, J., Arenal, A., Herrera Castanedo, S., Diez Manrique, J.F., Cuesta Nunez, M.J. & Higuera, A. (1994) Development and verification of the spanish version of the "scanning system" psychiatric interview ("questionnaires for clinical evaluation in neuropsychiatry". *Actas Luso. Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines*, 22, 109-120.
- Verity, A.N. & Campagnoni, A.T. (1988) Regional expression of myelin protein genes in the developing mouse brain: In situ hybridization studies. *J. Neurosci. Res.*, 21, 238-248.
- Vilella, E., Costas, J., Sanjuan, J., Guitart, M., De Diego, Y., Carracedo, A., Martorell, L., Valero, J., Labad, A., De Frutos, R., Najera, C., Molto, M.D., Toirac, I., Guillamat, R., Brunet, A., Valles, V., Perez, L., Leon, M., de Fonseca, F.R., Phillips, C. & Torres, M. (2007) Association of schizophrenia with DTNBP1 but not with DAO, DAOA, NRG1 and RGS4 nor their genetic interaction. *J. Psychiatr. Res.*, .

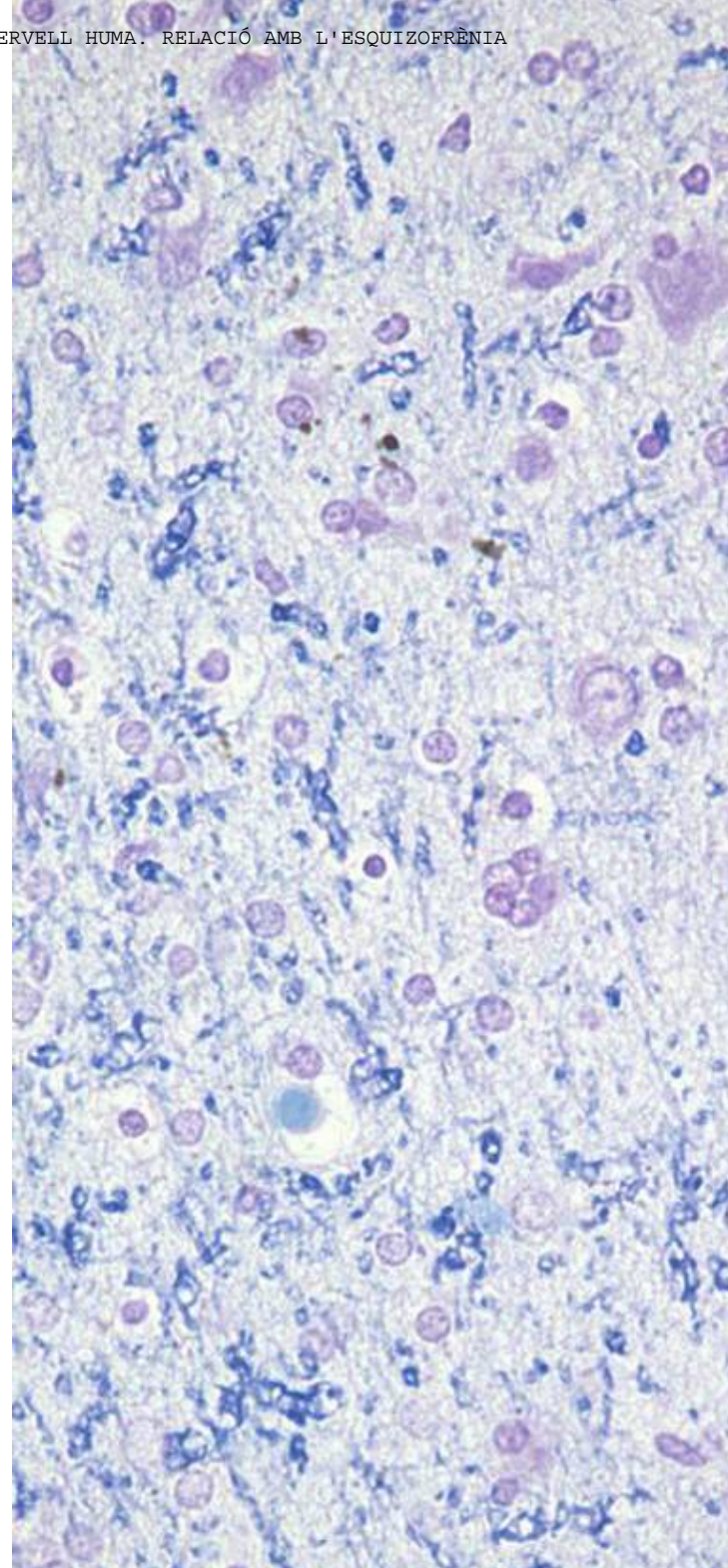
- Vogel, U.S. & Thompson, R.J. (1987) Molecular cloning of the myelin specific enzyme 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphohydrolase. *FEBS Lett.*, 218, 261-265.
- Vogel, W. (1999) Discoidin domain receptors: Structural relations and functional implications. *FASEB J.*, 13 Suppl, S77-82.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F. & Pawson, T. (1997) The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell*, 1, 13-23.
- Vogel, W.F. (2002) Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett.*, 514, 175-180.
- Vogel, W.F., Aszodi, A., Alves, F. & Pawson, T. (2001) Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 2906-2917.
- Wan, C., Yang, Y., Feng, G., Gu, N., Liu, H., Zhu, S., He, L. & Wang, L. (2005) Polymorphisms of myelin-associated glycoprotein gene are associated with schizophrenia in the chinese han population. *Neurosci. Lett.*, 388, 126-131.
- Wang, S., Detera-Wadleigh, S.D., Coon, H., Sun, C.E., Goldin, L.R., Duffy, D.L., Byerley, W.F., Gershon, E.S. & Diehl, S.R. (1996) Evidence of linkage disequilibrium between schizophrenia and the SCA1 CAG repeat on chromosome 6p23. *Am. J. Hum. Genet.*, 59, 731-736.
- Wei, J. & Hemmings, G.P. (2004) TNXB locus may be a candidate gene predisposing to schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 125, 43-49.
- Wei, J. & Hemmings, G.P. (2000) The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat. Genet.*, 25, 376-377.
- Weickert, C.S., Straub, R.E., McClintock, B.W., Matsumoto, M., Hashimoto, R., Hyde, T.M., Herman, M.M., Weinberger, D.R. & Kleinman, J.E. (2004) Human

B*ibliografia*

- dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch. Gen. Psychiatry*, 61, 544-555.
- Weinberger, D.R. (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 44, 660-669.
- Weiner, H. L. & Zagzag, D. (2000) Growth factor receptor tyrosine kinases: Cell adhesion kinase family suggests a novel signaling mechanism in cancer. *Cancer Invest.*, 18, 544-554.
- Willard, H.F. & Riordan, J.R. (1985) Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: Implications for X-linked myelin disorders. *Science*, 230, 940-942.
- Wolswijk, G. (2000) Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain*, 123 (Pt 1), 105-115.
- Wolswijk, G. (1995) Strongly GD3+ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. *Glia*, 13, 13-26.
- Woo, T.U. & Crowell, A.L. (2005) Targeting synapses and myelin in the prevention of schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 73, 193-207.
- Xiong, L., Rouleau, G.A., Delisi, L.E., St-Onge, J., Najafee, R., Riviere, J.B., Benkelfat, C., Tabbane, K., Fathalli, F., Danics, Z., Labelle, A., Lal, S. & Joober, R. (2005) CAA insertion polymorphism in the 3'UTR of nogo gene on 2p14 is not associated with schizophrenia. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 133, 153-156.
- Yamanaka, R., Arao, T., Yajima, N., Tsuchiya, N., Homma, J., Tanaka, R., Sano, M., Oide, A., Sekijima, M. & Nishio, K. (2006) Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene*, 25, 5994-6002.

- Yang, Y.F., Qin, W., Shugart, Y.Y., He, G., Liu, X.M., Zhou, J., Zhao, X.Z., Chen, Q., La, Y.J., Xu, Y.F., Li, X.W., Gu, N.F., Feng, G.Y., Song, H., Wang, P. & He, L. (2005) Possible association of the MAG locus with schizophrenia in a chinese han cohort of family trios. *Schizophr. Res.*, 75, 11-19.
- Yoshimura, T., Matsuyama, W. & Kamohara, H. (2005) Discoidin domain receptor 1: A new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction. *Immunol. Res.*, 31, 219-230.
- Zai, G., King, N., Wigg, K., Couto, J., Wong, G.W., Honer, W.G., Barr, C.L. & Kennedy, J.L. (2005) Genetic study of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene in schizophrenia. *Genes Brain Behav.*, 4, 2-9.
- Zerlin, M., Julius, M.A. & Goldfarb, M. (1993) NEP: A novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferating neuroepithelia. *Oncogene*, 8, 2731-2739.
- Zhao, C., Fancy, S.P., Magy, L., Urwin, J.E. & Franklin, R.J. (2005) Stem cells, progenitors and myelin repair. *J. Anat.*, 207, 251-258.
- Zipursky, R.B., Lim, K.O., Sullivan, E.V., Brown, B.W. & Pfefferbaum, A. (1992) Widespread cerebral gray matter volume deficits in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 49, 195-205.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



A *breviatures*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

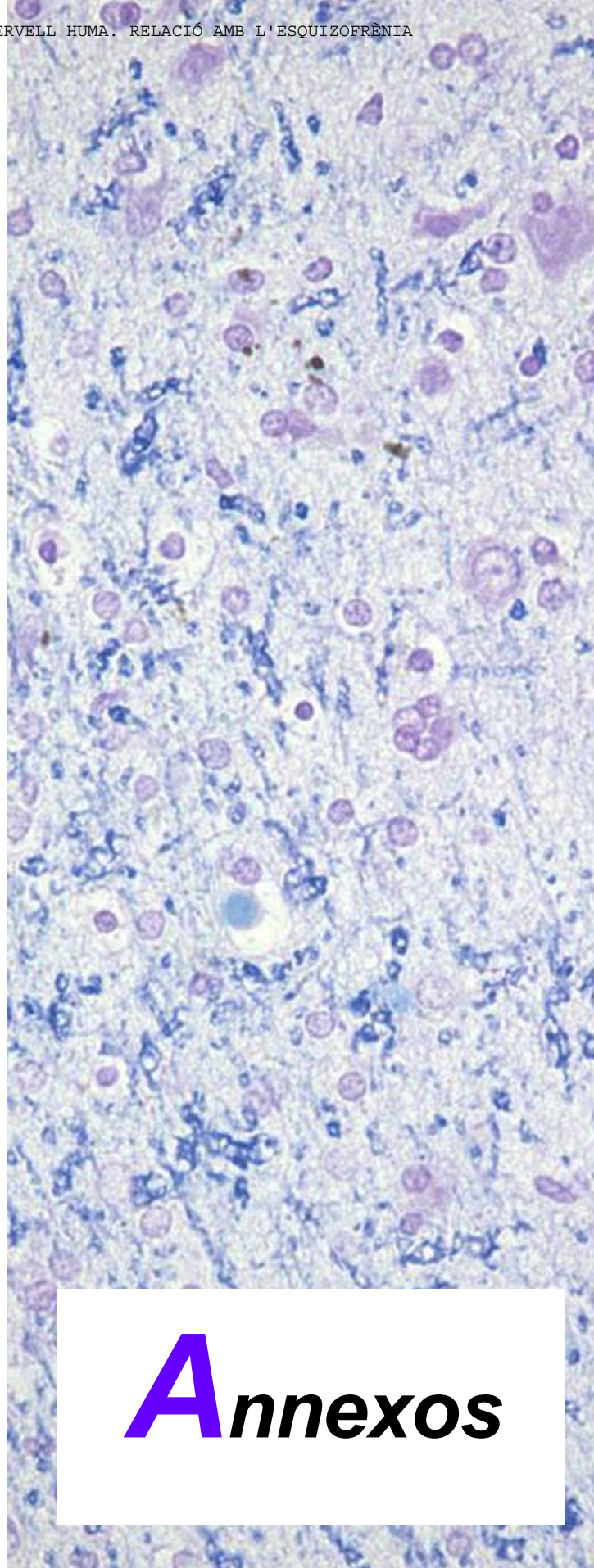
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

ADC, coeficient de difusió aparent
APC, *adenomatous polyposis coli*
A2RE, element de resposta d'hnRNPA2
CAII, anhidrasa carbònica II
CADASIL, *cerebral autosomal arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*
CLDN11, *claudin 11*
CNP, *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*
DAB, diaminobenzidina tetrahydrocloride
DDR1, *discoidin domain receptor 1*
DDR2, *discoidin domain receptor 2*
DLPFC, còrtex prefrontal dorsolateral
DTI, *diffusion tensor imaging*
DTNBP1, disbindina
DWI, *diffusion weighted imaging*
EAE, encefalomièlitis alèrgica experimental
ErbB3, *v-erbB2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*
GalC, galactosilceramida
GFAP, *glial fibrillar acidic protein*
GRM4, receptor glutamat metabotròpic
HLA, *human leucocyte antigen*
hnRNP A2, complex ribonucleoproteïc heteronuclear A2
LD, desequilibri de lligament
MAG, *myelin associated glycoprotein*
MAL, *myelin and lymphocyte protein*
MBP, *myelin basic protein*
MHC1, complex major d'histocompatibilitat 1
MOBP, *myelin-associated oligodendrocyte basic protein*
MOG, *myelin-oligodendrocyte glycoprotein*
MOSP, *myelin/oligodendrocyte specific protein*
MRI, *magnetic resonance image*
NBT, *nitroblue tetrazolium*
NCAM, molècula d'adhesió cel·lular neural

Abreviatures

NG2, proteoglican condroitin sulfat
OL, oligodendròcit
OLIG1, *oligodendrocyte lineage transcription factor 1*
OLIG2, *oligodendrocyte lineage transcription factor 2*
OMgp, *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*
OSP, *oligodendrocyte-specific protein*
PBL, *peripheral blood lymphocytes*
PDGFR α , *platelet-derived growth factor α -receptor*
PET, *positron emission tomography*
PFC, còrtex prefrontal
PLP, *proteolipid protein*
PMP22, *peripheral myelin protein 22*
PTB, *phosphotyrosine binding*
PWM, *position weight matrix*
QK1, *quaking homolog KH domain RNA binding*
RNAm, RNA missatger
RNAr 18S, RNA ribosòmic subunitat 18S
RNAss, RNA de cadena senzilla
RNP, complex ribonucleoproteïc
RPTK, *receptor protein tyrosine kinase*
RT-PCR, *reverse transcription-polymerase chain reaction*
SDS, *sodium dodecyl sulfate*
SN, sistema nerviós
SNC, sistema nerviós central
SNP, polimorfismes d'un únic nucleòtid
SOX10, *sex determining region Y-box 10*
Esq, pacients esquizofrènics
TNF α , factor necròtic tumoral α
TNXB, tenascina B

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008



A*nnexos*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA

Barbarà Roig Bou

ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 1 de 8 G.11.2.

1.- Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

Es basa en una modificació de la tècnica descrita per Sanger per a conèixer la seqüència nucleotídica d'un determinat fragment de DNA.

Es realitza una PCR asimètrica (només amb un primer) i amb una barreja de nucleòtids i dideoxinucleòtids (aquests últims són anàlegs als nucleòtids que no permeten la incorporació de més molècules i, per tant, són finalitzadors de la reacció; a més, cadascun dels quatre dideoxinucleòtids porta un fluoròfor determinat que és el que detecta el làser). En aquesta reacció es generen cadenes de llargada múltiple, des de l'oligonucleòtid ("primer") més una base fins la llargada màxima que acostuma a ser del voltant de 800 pb. Aquests fragments es separen per electroforesi capil·lar. Cadascuna de les cadenes porta un finalitzador (dideoxinucleòtid marcat amb fluorescència) en l'última base que és la que detecta el làser i, a partir de la qual es dona la seqüència.

1.2. Objectiu:

Determinar la seqüència nucleotídica d'una regió concreta del genoma.

1.3. Utilitat:

1.3.1. Descriure una determinada seqüència.

1.3.2. Identificar mutacions o polimorfismes nous o ja descrits per comparació de la seqüència analitzada a les descrites en les bases de dades.

2.- Espècimen

DNA de cadena senzilla, DNA de doble cadena o DNA de producte de PCR.

Generalment utilitzarem un producte de PCR del qual n'haurem preparat un volum de 40 µL i que haurem purificat per tal d'eliminar les restes dels components de la reacció (sobretot oligonucleòtids i dNTPs).

3.- Reactius, controls i altres materials

Tot el material i reactius utilitzats han de ser estèrils.

Reactius:

3.1. PCR de seqüenciació:

3.1.1. DNA motlle (producte de la 1a PCR purificat)

3.1.2. Oligonucleòtid **F** (*forward*) a concentració 1.6 pmols/µL

3.1.3. Oligonucleòtid **R** (*reverse*) a concentració 1.6 pmols/µL

3.1.4. CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit with quick start kit, Beckman (P/N 608120)

3.1.5. Aigua destil·lada estèril comercial

3.1.6. Placa de 96 pous, Beckman Coulter (P/N 609801)

3.1.7. Tapa per a placa Applied Biosystems (Genetic Analyzer Retainer Clips- 96-tube tray septa clips P/N 402866)

3.1.7. Puntetes grogues i blanques de 100 µL i 10 µL, Ref. 16-2001 (Daslab) i G61630 (Gilson) respectivament

3.2. Purificació del producte de seqüenciació amb etanol:

3.2.1. Glycogen (20 mg/mL), Roche (901 393)

3.2.2. Etanol absolut, Merck (1.00983.2500), per preparar etanol 95%, 70%

3.2.3. Na Ac 3M, pH 5.2

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 2 de 8 G.11.2.

- 3.2.4. EDTA 100 mM, pH 8.0
- 3.2.5. Filtres Corning disposable sterile syringe filters 25mm 0.2 micron (Ref. 21052 – 25)
- 3.2.6. H₂O destil·lada estèril comercial
- 3.2.7. Tubs eppendorff d'1,5 mL o placa Beckman Coulter (P/N 609801)
- 3.2.8. Puntetes grogues i blaves, Ref. 16-2001 i 16-2222 (Daslab) respectivament
- 3.3. Electroforesi capil·lar:
 - 3.3.1. Placa de 96 pous, Beckman Coulter (P/N 609801)
 - 3.3.2. CEQ Separation Gel, Beckman Coulter (P/N 608010).
 - 3.3.3. Formamida o Sample Loading Solution (SLS) (P/N 608082) .
 - 3.3.4. CEQ Separation Buffer, Beckman (P/N 608012)
 - 3.3.5. CEQ DNA Separation Capillary Array 50-100 D, Beckman Coulter (P/N 608015)
 - 3.3.6. 96 Well Plates per al tampó, Beckman Coulter (P/N 609844)
 - 3.3.7. Wetting tray
 - 3.3.8. Tapa de la placa de buffer.
 - 3.3.9. Ampolla de plàstic per a deixalles Nalgene.
- 3.4. Emmagatzematge de la placa de seqüenciació:
 - 3.4.1 Tapes adhesives d'alumini Beckman Coulter (Seal and sample aluminium foil lids (100u) P/N 538319)

4.- Instrumentació

- GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer
- CEQ 8000, Beckman Coulter
- Centrífuga Jouan BR4i amb rotor per a microtubs i per a plaques
- Software
 - Grup de programes CEQ 8000: Sample set up; Run; Sequencing; Investigator; Fragments; DataBase
 - Windows 2000
 - Sequencher
 - Nero

5.- Control de qualitat

Amb el Kit de seqüenciació hi ha el DNA pUC18 (0.25 µg/µL) i l'oligonucleòtid M13-47 (1.6 pmol/ µL) amb el qual es pot realitzar el mateix procés que per les mostres i que serveix de control positiu.

6.- Procediment

Tot el material serà estèril. Posar-se guants i rentar-se les mans sempre !!!

6.1. PCR de seqüenciació:

- 6.1.1. Es realitza a partir d'un producte de PCR purificat prèviament i amb la concentració mesurada.
- 6.1.2. Omplir el full de treball amb la identificació de les mostres. Si es treballa en placa utilitzar les plantilles corresponents (veure Annex 3).

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 3 de 8 G.11.2.

- 6.1.3. Preparar les dilucions dels DNAs a una quantitat final de 35-40 fmols per mostra (veure Annex 4).

Tipus fragment	Mida fragment	ng per 35-40 fmols
curt	fins a 400 pb	9
llarg	fins a 700 pb	18
extra-llarg	més de 700 pb	22

- 6.1.4. Posar la placa en una safata amb gel i aigua i descongelar tots els reactius del Kit menys la polimerasa. Els dideoxinucleòtids han d'estar preservats de la llum el màxim possible.
- 6.1.5. Dispensar un volum final de DNA més aigua de 4 μ L a cadascun dels pous. Cal dispensar-ho al final del pou i assegurar-se que la punta de la pipeta no toca la paret del tub i que s'ha dispensat tot el volum.
- 6.1.6. Per a cada mostra cal seqüenciar la cadena amb sentit i la cadena sense sentit i, per tant, per a cada mostra es preparen 2 reaccions, una amb el primer *forward* i l'altra amb el primer *reverse*.
- 6.1.7. Preparar la *barreja mare-PCR*, en quantitat suficient per a totes les mostres a processar, més una (si es treballa amb tub) o més dos (si es treballa en placa):

Reactiu	Quantitat (μ L)	
	x1	x100
Buffer	2	200
Primer F o R [1.6pmols/ μ L]	2	
DTCS Master Mix	2	200
DNA+H ₂ O	4	
Volum total	10	

- 6.1.6. Dispensar la mix a cada pou (S'acosta la punta de la pipeta a la paret del pou i es dispensa la gota. La gota toca la paret del pou però la punta no i, per tant, podem utilitzar la mateixa punta per dispensar tota la mix de la placa. Si sospitem que la punta pot estar contaminada l'hem de canviar). Col·locar la tapa de silicona.
- 6.1.7. Fer un spin.
- 6.1.8. Posar la placa al termociclador, seleccionar el programa i teclejar el volum de reacció, 10 μ L. Les temperatures de la reacció són les següents:

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 4 de 8 G.11.2.

30 cicles de:
96°C 20 s
50°C 20 s
60°C 4 min

6.2. Purificació del producte de seqüenciació amb etanol en placa

Recordar que les mostres han d'estar protegides de la llum.

- 6.2.1. Fer un spin a la placa per a recollir tot el líquid al fons dels pous.
- 6.2.2. Afegir 5 µL/pou de solució de STOP que consisteix en:
 - 2 µL de Na Ac 3M, pH 5.2 filtrat
 - 2 µL de EDTA 100 mM, pH 8.0 filtrat
 - 1 µL de glycogen 20 mg/mL
- 6.2.3. Afegir 60 µL d'etanol 95% filtrat a -20°C.
- 6.2.4. Tapar la placa amb paper d'alumini adhesiu.
- 6.2.5. Invertir 5-10 vegades la placa vigorosament i posar-la a -20°C durant 10 minuts.
- 6.2.6. Centrifugar a 4000 r.p.m. (1400 g) o més durant 30 minuts a 4°C.
- 6.2.7. Treure la placa de la centrifuga immediatament i girar-la suaument per llençar el sobrenedant. **NO TORNAR-LA A GIRAR CAP AMUNT.**
- 6.2.8. Posar papers d'eixugar als adaptadors de la centrifuga i dipositar la placa invertida a sobre.
- 6.2.9. Centrifugar entre 150-200 r.p.m. durant 20 segons.
- 6.2.10. Rentar el botó afegint 200 µL d'etanol 70% filtrat a -20°C.
- 6.2.11. Centrifugar immediatament a 4000 r.p.m. (1400 g) durant 5 minuts a 4°C.
- 6.2.12. Invertir la placa suaument per a descartar el sobrenedant. **NO TORNAR-LA A GIRAR CAP AMUNT.**
- 6.2.13. Posar papers d'eixugar als adaptadors de la centrifuga i dipositar la placa invertida a sobre.
- 6.2.14. Centrifugar entre 150-200 r.p.m. durant 20 segons.
- 6.2.15. Repetir els passos 10-14 una altra vegada.
- 6.2.16. Deixar eixugar el botó durant 45 minuts a temperatura ambient, protegint la placa de la llum.
- 6.2.17. Afegir 40 µL de formamida desionitzada o SLS a cada pou.
- 6.2.18. Afegir una gota d'oli mineral (uns 20 µL/gota) a cada pou.
- 6.2.19. La placa ja està preparada per anar al seqüenciador, tot i que es poden guardar en el congelador a -20°C on es mantenen com a mínim un mes.

6.3. Seqüenciació per electroforesi capil·lar

- 6.3.1. Obrir en primer lloc el seqüenciador CEQ 8000 i després l'ordinador.
- 6.3.2. Obrir el grup de programes **CEQ8000**.
- 6.3.3. Obrir el programa **CEQ Data Manager** i crear una nova base de dades amb la data. Per exemple: 20-03-01. Seleccionar aquesta base de dades com a base de dades de treball.
- 6.3.4. Obrir el programa **CEQ Sample Setup** (per defecte obre la última placa que s'ha carregat a l'aparell). Esborrar totes les mostres anteriors, omplir la taula amb les mostres actualitzades juntament amb el mètode d'electroforesi i d'anàlisi de seqüències de cada columna. Gravar la placa

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 5 de 8 G.11.2.

amb el nom de la data actualitzada. Per exemple: 20/03/01

- 6.3.5. Obrir el programa **CEQ Run**.
- 6.3.6. Omplir la *Wetting Tray* amb aigua MQ i la placa del tampó amb *CEQ Separation Buffer* (Les plaques per a les mostres i les plaques per al tampó són diferents).

Instal·lació dels capil·lars:

- 6.3.7. Seleccionar *Replenish* i *Release Capillary Array*, esperar que la màquina ens doni permís per posar els capil·lars i clicar OK. Tenim 15 minuts per fer els següents 2 apartats.
- 6.3.8. Preparar els capil·lars: treure els protectors de cadascun dels capil·lars i rentar amb una gassa humida d'etanol al 70% i després amb aigua milli Q la finestra de detecció del làser.
- 6.3.9. Obrir la cambra de termostització, treure el *Manifold Plug*, destapar el suport, posar els capil·lars (primer pel costat on hi havia el *Manifold Plug* i després on hi havia el suport), tancar el suport amb els cargols i tancar la tapa de la cambra de termostització. En aquest moment podem posar la *Wetting Tray*, la placa amb les mostres i la placa del tampó amb la tapa corresponent. Tancar el CEQ 8000.
- 6.3.10. En acabar, clicar *DONE*.

Instal·lació del gel:

- 6.3.11. Per defecte del sistema, primer hem d'obrir la porta a on instal·larem el gel, i acta seguit el sistema ens dona un error.
- 6.3.12. Treure el *Gel Plug*.
- 6.3.13. Instal·lar la xeringa amb el gel (*CEQ Separation Gel*). Vigilar que tenim prou gel per a fer totes les columnes de placa que hem de seqüenciar.
- 6.3.14. Seleccionar *Replenish* i *Install Gel Cartridge*.
- 6.3.15. Clicar *Install Gel Cartridge* i *DONE*. Canviar els paràmetres que fan referència al volum de la xeringa.
- 6.3.16. Comprovació del correcte funcionament dels capil·lars (s'ha de fer cada vegada que s'utilitzi un gel nou):
 - Seleccionar *Direct Control* i *Manifold Purgue*.
 - Seleccionar *Direct Control* i *Gel Capillary Fill*.
 - Seleccionar *Direct Control* i *Optical Aligment*.
 - Seleccionar *Run* i *Monitor Base Line Enable*. El senyal en el pic més alt de cadascun dels capil·lars no ha de ser superior a 6000 - 8000. Si el senyal és superior a aquests valors cal netejar la finestra de lectura dels capil·lars amb una gassa mullada amb unes gotes d'etanol al 70% i després amb H₂O destil·lada. Si el senyal continua essent superior a aquests valors vol dir que els capil·lars estan gastats i que cal canviar-los per uns de nous. Es recomana que el monitor Basline, estigui en marxa un mínim de 3 minuts. Fer *Run* i *Monitor Base Line Enable* per descliar l'opció.

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 6 de 8 G.11.2.

Inici del procés:

6.3.17. Anar al programa **CEQ Sample Setup** i clicar *RUN*.

7.- Informe dels resultats

Cada seqüència serà revisada dues vegades per la mateixa persona o per persones diferents. Els resultats s'anotaran en les llibretes de treball corresponents a cada projecte on pertanyin les mostres. Els resultats seran revisats pel responsable de l'estudi.

8.- Anotacions i limitacions del procediment

Cal guardar les dades en dos CD i esborrar-les del disc dur de l'ordinador per no ocupar memòria. Un dels CD estarà identificat com a còpia de seguretat i l'altre com a CD de treball i serà el que emprarem quan vulguem analitzar les seqüències. Per a copiar les dades al CD s'emprarà el programa Easy CD creator.

Quan no utilitzem els capil·lars és molt important que es guardin amb els protectors plens d'H₂O destil·lada i a 4°C. Els capil·lars no poden estar en contacte amb l'aire més de 15 minuts per evitar que el polímer s'assequi. El polímer (gel) de la xeringa i els capil·lars s'han de guardar tapats i a 4°C.

Per a comparar la seqüència trobada amb la descrita en una base de dades emprarem el programa Sequencher versió 4.7.

9.- Bibliografia

Manuais del CEQ 2000 de Beckman-Coulter.
Manuais dels aparells del CRB.

10.- Distribució de resultats

ANNEX 1: Reactius

Tots els reactius es filtren amb filtres d'acetat de cel·lulosa CORNING 25 mm

Acetat sòdic 3M pH 5.2

24.609 g d'acetat sòdic
fins 100 mL d'H₂O MQ
Ajustar el pH amb àcid acètic glacial.
Filtrar, al·liquotar en criotubs d'1.5 mL i congelar a -20°C

EDTA Na₂, 100 mM pH 8.0

3.722 g de EDTA Na₂·2H₂O
fins 100 mL d'H₂O MQ
Ajustar el pH amb hidròxid sòdic.
Filtrar, al·liquotar en criotubs d'1.5 mL i congelar a -20°C

EtOH 95%

95 mL d'etanol absolut Merk
5 mL H₂O milliQ.
Filtrar, al·liquotar en tubs de 10 mL estèrils i guardar a -20°C

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 1
UniLab Àrea de Genotipatge i Seqüenciació	Data: 07/02
Seqüenciació automàtica del DNA CEQ 2000	Pàg. 8 de 8 G.11.2.

ANNEX 4: Taula per estimar la concentració de DNA

Mida (pb)	ng per 25 fmols	ng per 50 fmols	ng per 100 fmols
0.2	3.3	6.5	13
0.3	4.9	9.8	20
0.4	6.5	13	26
0.5	8.1	16	33
1.0	16	33	65
2.0	33	65	130
3.0	50	100	195
4.0	65	130	260
5.0	80	165	325
6.0	100	195	390
8.0	130	260	520
10.0	165	325	650
12.0	195	390	780
14.0	230	455	910
16.0	260	520	1040
18.0	295	585	1170
20.0	325	650	1300
48.5	790	1500	1500

PNT realitzat per:	Validat pel responsable de l'àrea	Data
Àrea de Genotipatge i Seqüenciació		

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 1 de 8

1.- Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

Es una tècnica que es basa en l'hibridació d'una sonda de RNA marcada amb digoxigenina (que hem sintetitzat) amb la seva complementària present en el teixit a analitzar. Prèviament a l'hibridació, el teixit es permeabilitza fent rentats amb determinades solucions. Una primera solució conté detergent TWEEN 20 que solubilitza els lípids. A continuació afegim una solució d'àcid clorhídric que trenca la membrana cel·lular, i finalment afegim una darrera solució amb TEA que contribueix a que els forats presents en la membrana siguin més grans. Seguidament, es prepara el teixit per la hibridació: se sotmet a unes condicions de sals, temperatura i pH determinat. Tot seguit s'hibrida el teixit amb la sonda de RNA i després es fan una sèrie de rentats d'astringència (on el pH i la temperatura seràn els factors limitants) per assegurar-nos de l'especificitat de la sonda. Finalment, es farà la detecció de la sonda mitjançant una tècnica immunohistoquímica on s'utilitzarà un anticòs anti-digoxigenina acoblat a fosfatasa alcalina.

1.2. Objectiu:

Detectar l'expressió de RNAm d'un determinat gen en una determinada mostra de teixit.

1.3. Utilitat:

Detectar l'expressió gènica de una determinada proteïna.

Aquest PNT està vinculat al subprojecte DDR1EXP.

2.- Espècimen

Es parteix de RNA marcat amb digoxigenina i amb un teixit prèviament processat per hibridació in situ (teixit que exigeix unes determinades condicions de fixació i unes estrictes condicions d'esterilitat)

3.- Reactius, controls i altres materials

Tot el material i reactius utilitzats han de ser estèrils.

Reactius:

Reactius: tots els reactius han de ser estèrils i les solucions s'han de preparar amb H₂O mili-Q autoclavada.

- Etanol 50%
- Etanol 70%
- Etanol 90%
- Etanol absolut
- Tritó X-100
- PBS
- Tween 0.1%
- PFA 16%
- H₂O₂ 30%
- HCl
- TEA
- Glicina 2mg/ml
- Dextrà sulfat 50%
- Formamida desionitzada
- SDS 1%
- tRNA

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 2 de 8

- ssDNA
- H₂O mili-Q DEPC
- SSC
- RNAasa
- TEN
- N-Lauroil sarcosinato sòdic
- EDTA 0.5M
- TBST
- NTMT
- NGS
- Ab antidigoxigenina
- Levamisole
- BCIP/NBT
- Mowiol
- Plaques de cultius de 12 pouets
- Eppendorfs estèrils
- Plaques de cultius de 6 pouets
- Tubs de plàstic amb malla
- Caixa de cartró forrada d'alumini
- Caixa de polispan amb gel
- Paper de plata
- Material de vidre: probetes de 1L, de 500 i de 250 mL; Erlenmeyers de 250 mL; Vasos de precipitats de 25 ml. Tubs amb malla al seu extrem inferior per posar els talls. Tot el material de vidre s'haurà d'estufar a 200° C durant 4-5 hores per tal de garantir les condicions d'esterilitat.
- Tant els eppendorfs com les puntes de les pipetes han de ser estèrils.
- El control negatiu serà la sonda sense i estarà marcada també amb digoxigenina

4.- Instrumentació

Tot el procediment es realitza en agitació

- Agitador orbital
- Incubador-agitador a 55-60°C
- Incubador-agitador a 37°C
- Vòrtex
- Bany sec
- Campana d'extracció de gasos
- Bany humit
- Mascareta

5.- Control de qualitat

No hi ha control de qualitat

6.- Procediment

Primer dia

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 3 de 8

Com que treballem amb RNA és molt important mantenir les condicions d'esterilitat, per tant sempre s'utilitzarà material estèril i guants.

Si es parteix de teixit fresc el fixarem amb PFA al 4% en PB durant 24-48 hores a 4°C

Si es parteix de teixit parafinat s'haurà de primer de tot desparafinar el teixit

- 6.1. Rentar 3 cops durant 5 minuts amb PBS 10X
- 6.2. Rentar durant 10 minuts amb PBS10X-Tritó 0.5%
- 6.3. Rentar. Repetir el pas 6.1.
- 6.4. Bloqueig de les peroxidases i de les fosfatases endògenes:
 - 6.4.1. Afegir H₂O₂ al 2% en PBS 10X
 - 6.4.2. Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum
- 6.5. Rentar 3 cops durant 5 minuts amb PBS10X -Tween al 0.1%
- 6.6. Permeabilització i eliminació de proteïnes de la membrana:
 - 6.6.1. Incubar durant 10 minuts amb HCl 0.2N a temperatura ambient
- 6.7. Rentar. Repetir el pas 6.5.
- 6.8. Realitzar una postfixació del teixit:
 - 6.8.1. Preparar i filtrar en el moment d'utilitzar-se PFA al 4% en PBS 10X
 - 6.8.2. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient
- 6.9. Paral·lelament s'haurà de preparar el tampó d'hibridació que conté: 50% formamida desionitzada, 5X SSC, 1% SDS, i H₂O-MQ-DEPC. (Veure Annex 2)
 - 6.9.1. No afegir ni el tRNA ni el ssDNA.
 - 6.9.2. Precalear-lo a 60-61°C en l'incubador
- 6.10. Rentar. Repetir el pas 6.5.
- 6.11. Incubar durant 10 minuts a temperatura ambient amb PBS 10X-Tween 0.1%- Glicina 0.2%
- 6.12. Descongelar el ssDNA i el tRNA del tampó d'hibridació
- 6.13. Rentar. Repetir el pas 6.5.
- 6.14. Realitzar una deshidratació i rehidratació per eliminar els lípids i permeabilitzar la membrana amb una bateria de: etanol 50% 5 minuts, etanol 70% 5 minuts, etanol 90% 30 segons, etanol 100% 30 segons, etanol 90% 30 segons, etanol 70% 5 minuts i etanol 50% 5 minuts
- 6.15. Paral·lelament desnaturalitzar el ssDNA i el tRNA a 80°C durant 5 minuts i refredar en gel i afegir-ho al tampó d'hibridació (Veure Annex 2)
- 6.16. Rentar. Repetir el pas 6.5.
- 6.17. Realitzar una prehibridació del teixit:
 - 6.17.1. Preparar una cambra humida
 - 6.17.2. Afegir aproximadament 300 µl de tampó d'hibridació a sobre del teixit
 - 6.17.3. Cobrir immediatament el teixit per sobre amb una tira de parafilm per evitar que s'assequi el teixit
 - 6.17.4. Incubar a 60-61°C durant 3 hores i en fosc
- 6.18. Hibridació:
 - 6.18.1. Descongelar la sonda i afegir-li al tampó d'hibridació a una concentració final de 100 µgr/ml

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 4 de 8

- 6.18.2. Desnaturalitzar la mescla a 80°C durant 5 minuts i refredar-la en gel
- 6.18.3. Un cop finalitzada la prehibridació es retira el parafilm del teixit.
- 6.18.4. Afegir 300 µl tampó d'hibridació amb sonda desnaturalitzada i refredada a sobre del teixit
- 6.18.5. Cobrir el teixit amb parafilm per evitar que s'assequi
- 6.18.6. Deixar hibridar en cambra humida a 60-61°C durant 14-16 hores en fosc

Segon dia

- 6.19. Preparar solució I (Annex 3) i rentar 2 cops durant 30 minuts a 55°C
- 6.20. Rentar amb una mescla de solució I+ solució II (Annex 3) durant 10 minuts a 55°C
- 6.21. Rentar 3 cops amb la solució II durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 6.22. Rentar amb la solució III (Annex 3) durant 5 minuts a temperatura ambient
- 6.23. Rentar 2 cops amb la solució III durant 30 minuts a 55°C
- 6.24. Inmunohistoquímica i revelat:
 - 6.24.1. Rentar 4 cops amb TBST1X (Annex 3) durant 4 minuts a temperatura ambient
 - 6.24.2. Bloquejar durant 2 hores amb una solució que conté 10% NGS en TBST1X a temperatura ambient
 - 6.24.3. Incubació amb l'anticòs 2ari:
Diluir l'anticòs anti-digoxigenina a una concentració de 1:2000 en TBST1X- 1%NGS i deixar hibridar durant tota la nit a 4°C

Tercer dia

- 6.25. Atemptar el teixit durant 1 hora
- 6.26. Rentar 7 cops durant 10 minuts a temperatura ambient amb TBST1X
- 6.27. Rentar 3 cops durant 10 minuts amb NTMT 1X (Annex 4)
- 6.28. Revelat:
 - 6.28.1. Preparar la solució reveladora que conté 4.4 µl NBT i 3.3 µl BCIP (X -Phosphate) per ml de solució NTMT 1X
 - 6.28.2. Filtrar la solució protegida de la llum amb un filtre 0.22 µm low binding protein
 - 6.28.3. Afegir la solució reveladora i incubar a la fosc
 - 6.28.4. Renovar la solució reveladora cada 3 hores, si no es formen precipitats
 - 6.28.5. El temps total de revelat del teixit normalment dura uns 3-4 dies
- 6.29. Rentar 5 cops durant 5 minuts a temperatura ambient amb PBS 10X - Tween al 0.1%
- 6.30. No deshidratar i muntar els talls en mowiol. Deixar assecar durant un parell d'hores a temperatura ambient i protegint sempre de la llum
- 6.31. Guardar els talls al congelador de -20°C

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 5 de 8

7.- Informe dels resultats

8.- Anotacions i limitacions del procediment

Cal tenir present que es un protocol molt llarg i que tot el procés es realitzarà amb guants.

Cal tenir també en compte:

- El material de plàstic ha de ser nou (no reciclat).
- Els tubs de plàstic amb malla al fons es deixen 30 min amb aigua i lleixiu, s'esbandiran amb abundant aigua destil.lada i es deixen amb etanol durant 20 min. S'emoliquen amb paper d'alumini i es deixen a temperatura ambient durant tota la nit per tal de que s'evapori l'etanol.
- Els pinzells per la manipulació es mantindran amb paraformaldehid al 4% i després s'esbandiran amb aigua mili-Q autoclavada.
- Els productes sòlids NO es pesaran amb espàtules, sinó que es transferiran directament des del pot.
- L'aigua per la preparació dels tampons durant la ISH ha de ser mili-Q autoclavada.

9.- Bibliografia

10.- Distribució de resultats

ANNEX 1: Preparació dels reactius

Tampó fosfat (PB) 0.4M pH 7.2-7.4

10.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$

56 g K_2HPO_4

Enrasar a 1 litre amb H_2O mQ.

Afegir 500 $\mu\text{l/l}$ DEPC, deixar agitar 2 h a 40°C o bé overnight a T ambient i autoclavar.

NaCl 5M

Dissoldre 292.2 g de NaCl en 800 ml de H_2O mQ. Al estar la sal a saturació, triga molt a dissoldre's completament. Si sembla que no s'acaba de dissoldre enrasar a 1 litre i continuar agitant. Afegir 500 $\mu\text{l/l}$ DEPC, deixar agitar 2 h a 40°C o bé overnight a T ambient i autoclavar.

KCl 0.3M

Dissoldre 5.6 g de KCl en 250 ml d' H_2O mQ. Afegir 125 $\mu\text{l/l}$ DEPC, deixar agitar 2 h a 40°C o bé overnight a T ambient i autoclavar.

HCl 2N

Es posen 208.55 ml d' H_2O mQ en una proveta, i sota la campana d'extracció de gasos s'afegeixen 41.45 ml d'HCl 37%. L'HCl sempre s'ha de posar per sobre de l' H_2O mQ.

MgCl₂ 1M

Dissoldre 101.65 g de $\text{MgCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 400 ml d' H_2O mQ. Enrasar a 500 ml i autoclavar.

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 6 de 8

Tris 1M pH 7.5

Dissoldre 60.55 g de tris base en 350 ml d'H₂O mQ-DEPC. Ajustar el pH amb HCl (uns 50 ml). Enrasar a 500 ml i autoclavar. Si la solució queda groguenca descarteu-la ja que el tris deu ser de mala qualitat.

Tris 1M pH 9.5

Dissoldre 121.1 g de Tris base en 800 ml d'H₂O mQ. Afegir uns 5 ml d'HCl concentrat fins arribar a 9.5. Enrasar a 1litre i autoclavar.

SSC 20X

Dissoldre en 350 ml d'H₂O mQ: 87.65 g de NaCl 3M i 44.1 g de citrat de trisodi dihidratat 0.3M. Ajustar el pH a 7 amb aproximadament 600 µl d'HCl 2N. Enrasar fins a 500 ml. Afegir 500 µl/l de DEPC, agitar a 40°C 2h i autoclavar.

SDS 20%

Portar mascareta sempre que es pessi el SDS. Dissoldre 10 g d'electroforesis-grade SDS (Sodium Dodecyl sulfate/Sodium Lauryl Sulfate) en 30 ml d'H₂O mQ-DEPC. Escalfar fins a 68°C ajuda a la dissolució. Enrasar a 50 ml.

RNasa A (10mg/ml)

Es dissol en Tris-HCl 10 mM pH 7.5 i NaCl 15 mM (si es requereix lliure de Dnases, s'inactiva A 80°C). Aliqüotar en eppendorfs i guardar a -20°C.

SsDNA

Dissoldre en H₂O mQ-DEPC a 10 mg/ml. Aliqüotar en eppendorfs i guardar a -20°C. (Mirar PNT).

ytRNA

Dissoldre en H₂O mQ-DEPC a 10 mg/ml. Aliqüotar en eppendorfs i guardar a -20°C.

NBT

Dissoldre en 1 ml de dimetilformamida i guardar a -20°C.

H₂O mQ-DEPC

Manipular el DEPC amb guants i sota la campana. Les puntes es llencen en un pot que després es pugui autoclavar.

Afegir 500 µl de DEPC per litre d' H₂O mQ. Deixar en agitació 2h a 40°C, o bé overnight a T ambient. Autoclavar.

PBS 10X (per litre de solució)

PB 0.4M 25 ml

NaCl 5M 30 ml

Enrasar amb H₂O mQ

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 7 de 8

ANNEX 2:

Tampó d'hibridació	<u>[final]</u>	<u>10 ml</u>
Formamida desionitzada	50%	5 ml
20X SSC	5X	2.5 ml
20% SDS	1%	500 µl
tRNA	250µg/ml	250µl
ssDNA	250µg/ml	250µ
Enrasar amb H ₂ O mQ DEPC		

ANNEX 3: Reactius dia 2

Solució I (per litre de solució)

Formamida 50%	500 ml
SSC 5X	250 ml
SDS 1%	50 ml
Enrasar amb H ₂ O mQ	±200 ml

Aquesta solució s'escalfa al microones durant 2 minuts amb el programa 2, s'agita i es fica a dins l'incubador on es manté a 55°C.

Solució II (per litre de solució)

NaCl 0.5M	100 ml
Tris-HCl 10 mM pH 7.5	10 ml
TW 20 1%	1 ml
Enrasar amb H ₂ O mQ	

Solució III (per litre de solució)

Formamida 50%	500 ml
SSC 2%	100 ml
Enrasar amb H ₂ O mQ	±400 ml

TBST 1X (per litre de solució)

NaCl 5M	27 ml
KCl 0.3M	10 ml
Tris-HCl 1M pH 7.5	25 ml
TW 20	1 ml

Enrasar amb H₂O mQ

Afegir 0.48 gr de levamisole (el dia que s'utilitzi)

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 2
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 15/02/03
Hibridació in situ de RNAm marcat amb digoxigenina en cervell humà	Pàg. 8 de 8

ANNEX 4: Reactius dia 3

NTMT (per litre de solució)

NaCl 5M	20 ml
Tris-HCl 1M pH 9.5	100 ml
MgCl ₂ 1M	50 ml
TW 20	1 ml
Enrasar amb H ₂ O mQ	

Afegir 0.48 gr de levamisole (el dia que s'utilitzi)

PNT realitzat per:	Validat pel responsable de l'àrea	Data
Area d'Experimentació Animal		

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 3
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 05/09/05
Immunohistoquímica en talls frescos de cervell humà	Pàg. 1 de 3

1.- Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

Aquesta tècnica es basa en la detecció *in situ* en un teixit d'un determinat antígen amb l'ajut d'un anticòs específic que s'unirà a ell

1.2. Objectiu:

Detectar l'expressió d'un determinat antígen en una determinada mostra de teixit (cervell)

1.3. Utilitat:

Detectar l'expressió proteica en la nostra mostra
Aquest PNT està vinculat al subprojecte DDR1EXP

2.- Espècimen

Es parteix de talls de teixit de cervell fixats amb paraformaldehid al 4%. Els talls han de tenir un gruix de 30 micres

3.- Reactius, controls i altres materials

Reactius: totes les solucions s'han de preparar amb H₂O destilada

- Tritó X-100
- PBS
- H₂O₂ 30%
- Glicina 2mg/ml
- Lisina
- Fetal Calf Serum
- Plaques de cultius de 6 pouets
- Tubs de plàstic amb malla
- Caixa de cartró forrada d'alumini
- Caixa de polispan amb gel
- Paper de plata
- Material de vidre: probetes de 1L, de 500 i de 250 mL; Erlenmeyers de 250 mL; Vasos de precipitats de 25 ml
- Tubs amb malla al seu extrem inferior per posar els talls

4.- Instrumentació

Tot el procediment es realitza en agitació.

- Agitador orbital (Unimax 1010/Promax 1020)
- Incubador-agitador a 37°C
- Vòrtex
- Campana d'extracció de gasos
- Microscopi
- Bany humit
- Mascareta

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 3
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 05/09/05
Immunohistoquímica en talls frescos de cervell humà	Pàg. 2 de 3

5.- Control de qualitat

Seria el control positiu, es a dir, utilitzar un anticòs que ja sabem que funcioni sota les condicions d'experimentació que farem i en la mateixa mostra

6.- Procediment

El volum dels anticossos 1aris variarà segons la dilució de treball especificada per la casa comercial

Primer dia

- 6.1. Incubar durant tota la nit a 4°C els talls submergits en un flascó que conté PFA 4% en PB
- 6.2. Rentar 3 cops durant 5 minuts amb PBS 0.1M
- 6.3. Inactivació de l'activitat peroxidasa endògena:
 - 6.4.1. Preparar una solució que conté: metanol 10% i H₂O₂ 0.3% en PBS0.1M- Tritó 0.5%
 - 6.4.2. Incubar el teixit durant 15 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum
- 6.4. Rentar. Repetir el pas 6.3.
- 6.5. Permeabilitzar els talls durant 10 minuts a temperatura ambient amb HCl 0.2N
- 6.6. Rentar 3 cops durant 5 minuts a temperatura ambient amb PBS 0.1M Tritó 0.5%
- 6.7. Bloqueig dels llocs inespecífics:
 - 6.7.1. Preparar la solució de bloqueig que conté: Glicina 0.2M, Lisina 0.2M i FBS 10% en PBS 0.1M Tritó 0.5%
 - 6.7.2. Incubar durant 2 h a temperatura ambient amb la solució de bloqueig. En fosc
- 6.8. Rentar. Repetir el pas 6.6.
- 6.9. Incubació amb l'anticòs 1ari :
 - 6.9.1. S'afegeix uns 300 µl d'anticòs 1ari diluït a la concentració específica de cadascun en sèrum humà 8% i PBS 0.1M Tritó 0.5%
 - 6.9.2. Incubar en cambra humida a 4°C durant tota la nit

Segon dia

- 6.10. Incubar l'anticòs 1ari a 37°C durant 1 hora
- 6.11. Rentar. Repetir el pas 6.6.
- 6.12. Incubació amb l'anticòs 2ari:
 - 6.12.1. Afegir sobre cada tall uns 300 µl d'anticòs 2ari biotinitat diluït (1/200) en FBS 8% i PBS 0.1M Tritó 0.5%
 - 6.12.2. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 1 hora i 30 minuts
- 6.13. Rentar. Repetir el pas 6.6.
- 6.14. Incubació complex avidina-biotina ABC
 - 6.14.1. Preparar solució ABC que conté 2.5 µl del reactiu A i 2.5 µl del reactiu B en 80 µl de FBS i 915 µl de PBS 0.1M Tritó 0.5%

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 3
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 05/09/05
Immunohistoquímica en talls frescos de cervell humà	Pàg. 3 de 3

- 6.14.2. La solució ABC s'ha de preparar un mínim de 30 minuts abans d'utilitzar-se
- 6.14.3. Incubar durant 1 hora a temperatura ambient i protegit de la llum
- 6.15. Rentar. Repetir el pas 6.6.
- 6.16. Rentar durant 5 minuts a temperatura ambient amb PB 0.1M
- 6.17. Incubació solució reveladora:
- 6.17.1. Preparar la solució reveladora que conté: DAB 0.05% i H₂O₂ 0.01% en PB 0.1M
- 6.17.2. Afegir a cada tall uns 100 µl de la solució reveladora
- 6.17.3. Controlar visualment si vira a color marró i submergir immediatament en un flascó que conté PBS 0.1M Tritó 0.5%
- 6.18. Rentar. Repetir el pas 6.6.
- 6.19. Deshidratar els talls en una bateria de: H₂O 2 minuts, etanol 70% 2 minuts, etanol 95% 2 minuts, etanol 100% 1 minut, etanol 100% 1 minut, xilol 5 minuts i xilol 5 minuts
- 6.20. Muntar els talls en medi DPX
- 6.21. Guardar a temperatura ambient

7.- Informe dels resultats

8.- Anotacions i limitacions del procediment

Cal tenir present que la DAB es un reactiu perillós i per tant, tot el procés es realitzarà amb guants. Cal tenir cura i treballar amb un recipient amb lleixiu aprop de la solució que conté DAB.

9.- Bibliografia

10.- Distribució de resultats

ANNEX 1: Reactius

PBS 1M (per litre de solució)

PB 0.4M 25 ml
NaCl 5M 30 ml
Enrasar amb H₂O-mQ

PFA 16% en PB 0.1M

Dissoldre 16 gr de PFA absolut per litre de PB 0.1M en agitació i a una temperatura de 60°C. Afegir cada 10 minuts 1-2 gotes de NaOH concentrat per tal de facilitar la dissolució total. Un cop dissolt ajustar el pH a 7, filtrar la solució i guardar a 4°C.

PNT realitzat per:	Validat pel responsable de l'àrea	Data
Area d'Experimentació Animal		

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 4
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 05/09/05
Immunohistoquímica en talls parafinats de cervell humà	Pàg. 1 de 3

1.- Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

Aquesta tècnica es basa en la detecció *in situ* en un teixit d'un determinat antígen amb l'ajut d'un anticòs específic que s'unirà a ell

1.2. Objectiu:

Detectar l'expressió d'un determinat antígen en una determinada mostra de teixit (cervell)

1.3. Utilitat:

Detectar l'expressió proteica en la nostra mostra
Aquest PNT està vinculat al subprojecte DDR1EXP

2.- Espècimen

Es parteix de talls de teixit de cervell inclòs en parafina

3.- Reactius, controls i altres materials

Reactius: totes les solucions s'han de preparar amb H₂O destilada

- Tritó X-100
- PBS
- H₂O₂ 30%
- Glicina 2mg/ml
- Lisina
- Fetal Calf Serum
- Plaques de cultius de 6 pouets
- Tubs de plàstic amb malla
- Caixa de cartró forrada d'alumini
- Caixa de polispan amb gel
- Paper de plata
- Material de vidre: probetes de 1L, de 500 i de 250 mL; Erlenmeyers de 250 mL; Vasos de precipitats de 25 ml
- Tubs amb malla al seu extrem inferior per posar els talls

4.- Instrumentació

Tot el procediment es realitza en agitació.

- Agitador orbital (Unimax 1010/Promax 1020)
- Incubador-agitador a 37°C
- Vòrtex
- Campana d'extracció de gasos
- Microscopi
- Bany humit
- Mascareta

5.- Control de qualitat

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 4
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 05/09/05
Immunohistoquímica en talls parafinats de cervell humà	Pàg. 2 de 3

Seria el control positiu, es a dir, utilitzar un anticòs que ja sabem que funcioni sota les condicions d'experimentació que farem i en la mateixa mostra

6.- Procediment

El volum dels anticossos 1aris variarà segons la dilució de treball especificada per la casa comercial

Primer dia

- 6.1. Desparafinar i hidratar la mostra amb una bateria de: xilol 10 minuts, xilol 5 minuts, etanol 100% 5 minuts, etanol 95% 5 minuts, etanol 90% 5 minuts, etanol 70% 5 minuts i aigua destil·lada
- 6.2. Alliberació dels antígens de membrana mitjançant un xoc tèrmic amb tampó citrat pH 6 a 95°C durant 4 minuts (Veure Annex 1)
- 6.3. Rentar 3 cops durant 5 minuts amb PBS 0.1M
- 6.4. Inactivació de l'activitat peroxidasa endògena:
 - 6.4.1. Preparar una solució que conté: metanol 10% i H₂O₂ 0.3% en PBS 0.1M-Tritó 0.5%
 - 6.4.2. Incubar el teixit durant 15 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum
- 6.5. Rentar. Repetir el pas 6.3.
- 6.6. Permeabilitzar els talls durant 10 minuts a temperatura ambient amb HCl 0.2N
- 6.7. Rentar 3 cops durant 5 minuts a temperatura ambient amb PBS 0.1M Tritó 0.5%
- 6.8. Bloqueig dels llocs inespecífics:
 - 6.8.1. Preparar la solució de bloqueig que conté: Glicina 0.2M, Lisina 0.2M i FBS 10% en PBS 0.1M Tritó 0.5%
 - 6.8.2. Incubar durant 2 h a temperatura ambient amb la solució de bloqueig. En fosc
- 6.9. Rentar. Repetir el pas 6.7.
- 6.10. Incubació amb l'anticòs 1ari :
 - 6.10.1. S'afegeix uns 300 µl d'anticòs 1ari diluït a la concentració específica de cadascun en sèrum humà 8% i PBS 0.1M Tritó 0.5%
 - 6.10.2. Incubar en cambra humida a 4°C durant tota la nit

Segon dia

- 6.11. Incubar l'anticòs 1ari a 37°C durant 1 hora
- 6.12. Rentar. Repetir el pas 6.7.
- 6.13. Incubació amb l'anticòs 2ari:
 - 6.13.1. Afegir uns 300 µl d'anticòs 2ari biotinilat diluït (1/200) en FBS 8% i PBS 0.1M Tritó 0.5%
 - 6.13.2. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 1 hora i 30 minuts
- 6.14. Rentar. Repetir el pas 6.7.
- 6.15. Incubació complex avidina-biotina ABC

HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS	ANNEX 4
UniLab Àrea d'Experimentació Animal	Data: 05/09/05
Immunohistoquímica en talls parafinats de cervell humà	Pàg. 3 de 3

- 6.15.1. Preparar solució ABC que conté 2.5 µl del reactiu A i 2.5 µl del reactiu B en 80 µl de FBS i 915 µl de PBS 0.1M Tritó 0.5%
- 6.15.2. La solució ABC s'ha de preparar un mínim de 30 minuts abans d'utilitzar-se
- 6.15.3. Incubar durant 1 hora a temperatura ambient i protegit de la llum
- 6.16. Rentar. Repetir el pas 6.7.
- 6.17. Rentar durant 5 minuts a temperatura ambient amb PB 0.1M
- 6.18. Incubació solució reveladora:
 - 6.18.1. Preparar la solució reveladora que conté: DAB 0.05% i H₂O₂ 0.01% enPB 0.1M
 - 6.18.2. Afegir a cada tall uns 100 µl de la solució reveladora
 - 6.18.3. Controlar visualment si vira a color marró i submergir immediatament en un flascó que conté PBS 0.1M Tritó 0.5%
- 6.19. Rentar. Repetir el pas 6.7.
- 6.20. Deshidratar els talls en una bateria de: H₂O 2 minuts, etanol 70% 2 minuts, etanol 95% 2 minuts, etanol 100% 1 minut, etanol 100% 1 minut, xilol 5 minuts i xilol 5 minuts
- 6.21. Muntar els talls en medi DPX
- 6.22. Guardar a temperatura ambient

7.- Informe dels resultats

8.- Anotacions i limitacions del procediment

Cal tenir present que la DAB es un reactiu perillós i per tant, tot el procés es realitzarà amb guants. Cal tenir cura i treballar amb un recipient amb lleixiu aprop de la solució que conté DAB

9.- Bibliografia

10.- Distribució de resultats

ANNEX 1: Reactius

PBS 1M (per litre de solució)

PB 0.4M 25 ml

NaCl 5M 30 ml

Enrasar amb H₂O-mQ

Tampó citrat pH 6

Diluir 20 ml de tampó citrat pH6 (Dako) en 180 ml d' H₂O

PNT realitzat per:	Validat pel responsable de l'àrea	Data
Àrea d'Experimentació Animal		

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR DOMINI DISCOIDINA 1 (DDR1) EN CERVELL HUMÀ. RELACIÓ AMB L'ESQUIZOFRÈNIA
Barbarà Roig Bou
ISBN:978-84-691-3379-8/ DL:T.608-2008