

**Caracterització molecular del gen GH1
en poblacions control i patològiques,
patrons d'expressió en leucòcits
de sang perifèrica i
estudi funcional de proteïnes mutants
detectades en pacients**

Annalisa Pérez Arroyo

**Caracterització molecular del gen GH1
en poblacions control i patològiques, patrons
d'expressió en leucòcits de sang perifèrica i
estudi funcional de proteïnes mutants detectades
en pacients**

Annalisa Pérez Arroyo

TESI DOCTORAL
Barcelona, 2006

Programa de Doctorat de Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona
Bienni 2002-2004

Memòria presentada per

Annalisa Pérez Arroyo

Tesi realitzada sota la direcció del
Prof. Antonio Carrascosa Lezcano, la Dra. Laura Audí Parera,
la Dra. Cristina Esteban Redondo i la tutela de la
Prof. Montserrat Busquets Abió a la Unitat de Recerca
d'Endocrinologia Pediàtrica de l'Hospital Vall d'Hebron

Signat,

Annalisa Pérez Arroyo

Antonio Carrascosa Lezcano, Catedràtic de Pediatria de la Universitat Autònoma de Barcelona, Cap de Servei de Pediatria i de la Unitat d'Endocrinologia i Adolescència de l'Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona

Laura Audí Parera, Cap del Laboratori de la Unitat de Recerca d'Endocrinologia Pediàtrica de l'Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona

Cristina Esteban Redondo, Investigadora de la Unitat de Recerca d'Endocrinologia Pediàtrica de l'Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron

Montserrat Busquets Abió, Professora Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN

Que Annalisa Pérez Arroyo, Llicenciada en Química i Bioquímica per la Universitat de Barcelona ha realitzat sota la seva direcció la present Tesi Doctoral, titulada ***"Caracterització molecular del gen GH1 en poblacions control i patològiques, patrons d'expressió en leucòcits de sang perifèrica i estudi funcional de proteïnes mutants detectades en pacients"***.

Aquesta Tesi està finalitzada i es considera apta per a la seva lectura i defensa pública.

Antonio Carrascosa Lezcano

Laura Audí Parera

Cristina Esteban Redondo

Montserrat Busquest Abió

Amb les següents línies voldria agrair a totes les persones que han contribuït a la realització d'aquest treball, tant per les seves aportacions científiques com humanes.

En primer lloc voldria agrair tant a la Dra. Laura Audí com al Prof. Antonio Carrascosa la possibilitat que em van donar de treballar amb ells en aquest projecte, així com donar-los les gràcies per l'esforç demostrat en la realització d'aquesta tesi. De vosaltres he après tot el que sé sobre l'Endocrinologia.

A la Dra. Cristina Esteban li vull agrair tot l'esforç que ha realitzat per ensenyar-me totes les tècniques de laboratori, seguir els meus progressos i escoltar-me en tot moment. Cristina, muchas gracias.

A la Dra. Montserrat Busquets per voler ser la meva tutora, i per haver-me aconsellat sempre tan bé, des dels temps d'estudiant de Bioquímica. Montse, moltes gràcies per tot un altre cop.

A la Pilar Andaluz, l'ànima del laboratori. Sempre m'has donat ànims, consells i suport. Sempre recordaré els temps passats al laboratori.

A Rosa Arjona, la benjamina del grup. Rosa, ya lo sabes, sin tu ayuda y amistad, nunca hubiera sido lo mismo.

A Mónica Fernández i Marta Guzmán per les bones estones passades al laboratori.

També vull agrair el suport del personal que treballa a l'UCTS de l'Hospital Vall d'Hebron, en especial a la Dra. Paqui Gallego, per ajudar-me amb la PCR a temps real.

Tampoc no em puc oblidar de la Dra. M^a Luisa Granada, que ha contribuït en les determinacions de l'hormona de creixement al Servei de Bioquímica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, així com del Dr. Santi Imperial del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i del Dr. Jaime Rubio del Departament de Química-Física de la Universitat de Barcelona, per orientar-me en l'estudi de la predicció estructural de les proteïnes GH recombinants mutants.

A la família, en especial als meus pares, que sempre m'han animat, que sempre han cregut en mi i que ho han donat tot per a que jo arribés fins on ho he fet. Moltes gràcies als dos, sense el vostre suport no ho hauria aconseguit.

I finalment, al Xavi, que m'ha recolzat en tot, m'ha ajudat, m'ha escoltat, m'ha animat.... En fi, ha fet que una part d'aquest treball també sigui seu. Moltes gràcies.

“La ciencia se compone de errores,
que a su vez son los pasos hacia la verdad”

Jules Verne

“El fracaso no existe,
simplemente existen diferentes resultados”

Sigmund Freud

ÍNDEX

ÍNDEX

PRESENTACIÓ.....	1
I. INTRODUCCIÓ.....	3
1. SÍNTESI, SECRECIÓ I ACCIÓ DE L'HORMONA DE CREIXEMENT.....	4
2. EL DÈFICIT AÏLLAT DE GH (IGHD).....	7
2.1 Aspectes clínics.....	7
2.2 Genètica.....	7
2.3 Diagnòstic i tractament.....	8
GH bioinactiva i mutacions descrites en el gen GH1 que comporten canvi d'aminoàcid.....	9
3. GEN GH1.....	11
Polimorfismes del gen GH1.....	12
4. RNA MISSATGER DE GH1.....	13
Processament de l'ARN.....	16
5. EXPRESSIÓ DE GH1 EN LEUCÒCITS DE SANG PERIFÈRICA.....	17
6. HORMONA DE CREIXEMENT (GH).....	18
7. PROCESSAMENT INTRACEL·LULAR DE LA GH.....	21
8. GHBP.....	22
9. RECEPTOR DE GH (GHR).....	22
10. INTERACCIÓ GH-GHR.....	24
11. STAT5B.....	31
12. IGF1.....	31
13. IGF1R.....	32
14. ESTUDI D'UN POLIMORFISME DEL RECEPTOR DE GHR: deleció de l'exó 3.....	33
15. ESTUDI DELS ELEMENTS DE RESPOSTA EN REGIONS PROMOTORES DELS GENS EN ESTUDI.....	33
II. OBJECTIUS.....	34

III. SUBJECTES I MÈTODES.....	36
1. CARACTERITZACIÓ DELS POLIMORFISMES DEL GEN GH1 D'UNA POBLACIÓ DE CONTROLS AMB TALLA NORMAL I SEQÜENCIACIÓ DEL GEN GH1 EN UNA POBLACIÓ DE PACIENTS AMB RETARD CRÒNIC DEL CREIXEMENT, DEFICIÈNCIA DE GH I/O RESPOSTA ADEQUADA AL TRACTAMENT AMB GH I EN UNA POBLACIÓ DE NENS AMB RETARD DE CREIXEMENT INTRAUTERÍ I TALLA BAIXA.....	37
1.1 Subjectes.....	37
1.2.1 Controls.....	37
1.2.2 Pacients de l'Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron.....	37
1.2.3 Pacients amb retard intrauterí del creixement (RIUC), talla baixa i sense deficiència de secreció de GH.....	37
1.2 Aïllament d'ADN.....	38
1.3 Amplificació del gen GH1 a partir de l'ADN genòmic.....	38
1.3.1 Primera reacció de PCR.....	38
1.3.2 Segona reacció de PCR (<i>nested</i>).....	40
1.4 Separació dels productes obtinguts per electroforesi en gels d'agarosa.....	43
1.5 Seqüenciació.....	43
1.5.1 Seqüenciació cíclica.....	44
1.5.2 Purificació dels productes de seqüenciació: mètode de precipitació en presència de sals.....	46
1.5.3 Detecció de canvis en la seqüència de nucleòtids..	46
2. AMPLIFICACIÓ D'ARN missatger DE GH1.....	47
2.1 Subjectes.....	47
2.2 Aïllament d'ARN.....	47
2.2.1 Aïllament de leucòcits a partir de sang fresca.....	47
2.2.2 Extracció d'ARN total.....	47
2.3 Amplificació de l'ARN mitjançant la tècnica de RT	

(Retrotranscripció) i posterior reacció de PCR.....	48
2.3.1 Retrotranscripció.....	48
2.3.2 Reaccions de PCR.....	49
2.4 Reamplificació de bandes retallades en gels de poliacrilamida.....	54
2.5 Electroforesi.....	55
2.5.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida.....	55
2.5.2 Tinció de gels de poliacrilamida.....	56
2.6 Identificació dels haplotips de GH1 que corresponen als trànscripts obtinguts.....	56
3. ESTUDI TEÒRIC DE LA TRADUCCIÓ A PROTEÏNA DE LES SEQÜÈNCIES D'ARN missatger MITJANÇANT L'ORFfinder.....	58
4. PREDICCIÓ D'ESTRUCTURA DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS....	58
Caracterització funcional de les variants F25Y i V173L.....	58
5. ESTUDI DELS ELEMENTS DE RESPOSTA DE LES REGIONS PROMOTORES DELS GENS D'INTERÈS: deleció de l'exó 3.....	58
5.1 Estudi de la regió 5'.....	59
5.2 Estudi Automàtic.....	59
6. PRODUCCIÓ DE PROTEÏNA GH RECOMBINANT WILD TYPE (WT) I AMB MUTACIONS MITJANÇANT LA TECNOLOGIA DE MUTAGÈNESI DIRIGIDA I EXPRESSADA EN UN MODEL CEL·LULAR	61
6.1 Producció de proteïna GH recombinant Wild Type (WT) i amb mutacions.....	61
6.1.1 Clonatge en vector pQE-30UA.....	63
6.1.2 Mutagènesi dirigida.....	67
6.1.3 Expressió de GH en <i>E.coli</i> M15.....	71
6.1.3.1 Transformació en cèl·lules M15[prep4].....	71
6.1.3.2 Inducció amb IPTG.....	71
6.1.3.3 Lisat i purificació de la proteïna en condicions natives.....	71
6.1.4 Diàlisi de la proteïna.....	72
6.1.5 Eliminació de cues d'Histidina.....	72
6.1.6 Quantificació de les proteïnes.....	74

6.1.6.1 Determinació de concentració de proteïna total.....	74
6.1.6.2 Determinació de la concentració de proteïna GH.....	74
6.1.7 Electroforesi en gels de poliacrilamida.....	75
Tinció dels gels de poliacrilamida.....	76
6.1.8 Western Blot.....	76
7. ESTUDI DE L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DE LES PROTEÏNES GH OBTINGUDES EN MODELS CEL·LULARS.....	78
7.1 Cultius cel·lulars.....	78
7.1.1 Cultiu de HepG2.....	78
7.1.2 Cultiu de C-28/I2.....	78
7.1.3 Cultiu de condrocits del cartílag epifisari de fetus humans.....	79
7.1.4 Tractaments realitzats en les cèl·lules en cultiu.....	80
7.1.5 Recollida de les cèl·lules.....	81
7.2 Estudi de la incorporació de timidina- ³ H a l'ADN dels condrocits en cultiu.....	81
7.3 Estudi de l'expressió gènica regulada per les GHs recombinants.....	82
7.3.1 Extracció d'ARN total.....	82
7.3.2 Retrotranscripció.....	82
7.3.3 Quantificació de l'expressió gènica.....	82
7.3.3.1 Determinació de l'expressió gènica per mètode semiquantitatiu.....	82
7.3.3.2 Quantificació de l'expressió gènica per la tècnica de PCR a temps a temps real.....	85
7.3.3.2.1 Sistemes de detecció de la fluorescència.....	86
7.3.3.2.2 Quantificació de l'ADN diana de la mostra.....	88
8. ESTUDI D'UN POLIMORFISME DEL RECEPTOR DE GH.....	91
8.1 Anàlisi del polimorfisme d3/fl-GHR a partir d'ADN.....	91

8.2 Anàlisi del polimorfisme d3/fl-GHR a partir d'ARN.....	93
9. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	95
10. ANÀLISI INFORMÀTIC DE LES SEQÜÈNCIES.....	95
IV. RESULTATS.....	97
1. CARACTERITZACIÓ DELS POLIMORFISMES DEL GEN GH1 EN ADN DE POBLACIÓ CONTROL I DE PACIENTS. DETERMINACIÓ DE MUTACIONS AMB CANVI D'AMINOÀCID.....	98
1.1 Estudi de la població control.....	98
1.2 Estudi dels pacients de l'Hospital Materno-infantil Vall d'Hebron.....	100
1.3 Estudi dels pacients amb RIUC, talla baixa i sense deficiència de secreció de GH.....	102
1.4 Estudi del canvi que comporta la mutació F25Y.....	103
1.4.1 Clínica dels pacients amb el canvi F25Y.....	105
1.4.2 Anàlisi mitjançant ESEFinder.....	109
1.5 Estudi del canvi que comporta la mutació V173L.....	111
1.5.1 Clínica del pacient amb el canvi V173L.....	112
1.5.2 Anàlisi mitjançant ESEFinder.....	113
2. CARACTERITZACIÓ DELS TRÀNSCRITS ALTERNATIUS DEL GEN GH1 EN LEUCÒCITS DE PACIENTS.....	114
2.1 Estudi dels trànscrips d'ARN expressats en leucòcits de sang perifèrica a la Família 1 (Pacient 1).....	116
2.2 Estudi dels trànscrips d'ARN expressats en leucòcits de sang perifèrica a la Família 3 (Pacient 5).....	117
3. ESTUDI TEÒRIC DE LA TRADUCCIÓ A PROTEÏNA DEL TRÀNSCRIT ALTERNATIU DEL GEN GH1 QUE CONTÉ L'INTRÓ 1 A LA SEVA SEQÜÈNCIA MITJANÇANT L'ORFfinder.....	120
Trànscrips d'ARN que contenen l'intró 1 a la seva seqüència.....	120
4. ESTUDI D'ESTRUCTURA DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS.....	122
4.1 Caracterització funcional de les variants F25Y, V173L.....	122

4.1.1 Alineaments de les proteïnes.....	122
4.1.1.1 Alineament de la hGH amb la GH de 18 vertebrats.....	122
4.1.1.2 Alineament realitzat amb proteïnes de la seva família (hormones somatomamotropines) realitzat amb el CDD (<i>Conserved domain database</i>).....	124
4.1.1.3 Alineament de la hGH amb les altres 4 proteïnes que provenen del clúster del gen.....	127
4.1.2 Anàlisis filogenètics de la proteïna GH.....	128
4.1.3 Estudi teòric del canvi Phe25Tyr.....	130
4.1.4 Estudi teòric del canvi Val173Leu.....	133
5. ESTUDI DELS ELEMENTS DE RESPOSTA DE LES REGIONS PROMOTORES DELS GENS REGULATS PER STAT5 I/O VITAMINA D.	136
5.1 IGF1.....	136
5.2 IGF1R.....	136
5.3 STAT5B.....	137
5.4 GHR.....	137
6. EXPRESSIÓ IN VITRO DE PROTEÏNES RECOMBINANTS.....	139
6.1 Mutagènesi dirigida.....	139
6.2 Expressió de GH.....	143
6.2.1 Resultats del Western Blot.....	144
6.2.2 Quantificació de les proteïnes.....	144
6.2.3 Test de proliferació cel·lular per incorporació de timidina- ³ H a l'ADN dels condrocits en cultiu.....	145
6.2.4 Determinació de la bioactivitat de les GH recombinants per mètodes semi-quantitatius.....	147
6.2.5 Determinació de la bioactivitat de les GH recombinants per PCR quantitativa a temps real....	150
7. ESTUDI DEL POLIMORFISME DE GHR: deleció de l'exó 3.....	153
V. DISCUSSIÓ.....	156

1. ESTRUCTURA DEL GEN GH1 EN POBLACIONS CONTROL i AMB RETARD DE CREIXEMENT.....	157
1.1 Polimorfismes del gen GH1 en la població control.....	157
1.2 Estudi dels canvis d'aminoàcid en poblacions amb retard de creixement.....	159
2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GH EN LEUCÒCITS DE SANG PERIFÈRICA.....	162
3. ESTUDI TEÒRIC DELS CANVIS D'AMINOÀCID.....	167
4. ESTUDIS <i>IN VITRO</i> AMB GHs RECOMBINANTS.....	169
4.1 Obtenció de GH recombinant.....	169
4.2 Immunoreactivitat de les GHs recombinants.....	170
4.3 Efectes sobre la proliferació cel·lular.....	170
4.4 Bioassajos en models cel·lulars.....	170
4.4.1 Bioassajos en la línia cel·lular preestablerta HepG2.	170
4.4.2 Bioassajos en la línia cel·lular preestablerta C-28/I2	171
4.4.3 Bioassajos en condrocits del cartílag epifisari de fetus humans i altres models cel·lulars descrits a la literatura.....	171
5. ESTUDI DE LES FAMÍLIES AMB GH MUTANTS: ASSOCIACIONS GENOTIP-FENOTIP.....	177
VI. CONCLUSIONS.....	183
VII. BIBLIOGRAFIA.....	186

PRESENTACIÓ

Aquest treball va començar amb l'objectiu d'estudiar la fisiopatologia del retard de creixement en una població de pacients de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Com que en un percentatge indeterminat de casos pot ser secundària a un problema genètic, es va decidir analitzar el gen de l'hormona de creixement (GH1) i estudiar-ne els canvis en la seqüència que produïssin un ARN missatger anòmal i que no es traduís a proteïna, o bé poguessin provocar una hormona que no fos funcional i que no transmetés degudament el senyal. Al mateix temps es va buscar un model on poder estudiar l'expressió d'aquest gen que no fos la glàndula pituïtària o hipòfisi, que és on s'expressa abundantment i específicament, perquè, com és obvi, no es podia estudiar l'expressió d'aquest gen en aquest teixit. En diferents revisions (Hattori *et al.*, 1994; Hattori *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999), s'ha demostrat que GH1 també s'expressa en cèl·lules del sistema immune. Es va dur a terme l'aïllament d'ARN en leucòcits de sang perifèrica tant de pacients com de controls, i es va amplificar l'ARN missatger de GH1. Finalment, es va buscar un model cel·lular on estudiar la bioactivitat de les proteïnes recombinants expressades en *E.Coli* i que continguessin els canvis que alguns pacients tenien en la seva seqüència de l'ADN, i que predeïen un canvi d'aminoàcid. Es va començar a treballar en un model cel·lular, les cèl·lules HepG2 (línia preestablerta de carcinoma hepatocel·lular humà), i després en una línia de cèl·lules de condrocits costals humans immortalitzats (C-28/I2). Un tercer model va ser estudiar les proteïnes recombinants en condrocits fetals humans, ja que aquest model es troba ben caracteritzat al nostre laboratori i mostra que la producció d'IGFI és regulable en resposta a l'hormona del creixement (GH).

INTRODUCCIÓ

1. SÍNTESI, SECRECIÓ I ACCIÓ DE L'HORMONA DE CREIXEMENT

L'hormona de Creixement (GH) és un polipèptid sintetitzat a les cèl·lules acidofíliques o somatotròpiques de la glàndula pituïtària anterior o hipòfisi (Figura 1).

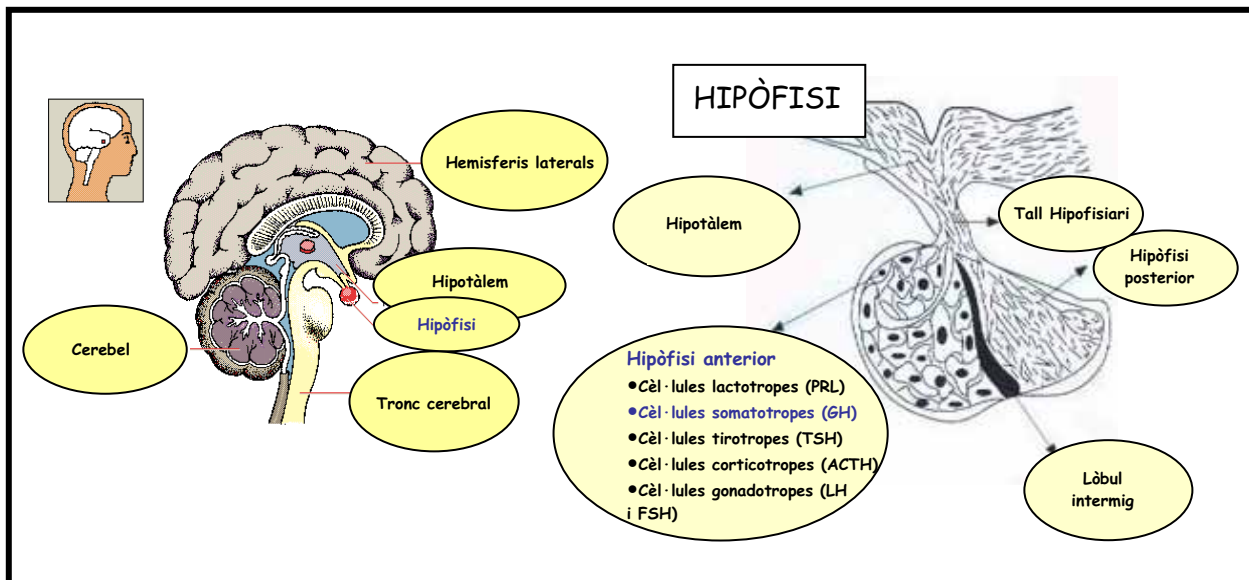


Figura 1. Localització de la glàndula pituïtària: en el lòbul anterior de la hipòfisi es produeix l'hormona de creixement i es segrega a la circulació sanguínia.

Al lòbul anterior de la hipòfisi, a part d'haver les cèl·lules que produeixen GH (cèl·lules somatotròpiques), també hi ha les cèl·lules lactotròpiques, que produeixen la PRL (prolactina), les cèl·lules tirotròpiques, que produeixen la TSH (hormona tiroestimulant), cèl·lules corticotròpiques, que produeixen ACTH (hormona adrenocorticotròpica), i cèl·lules gonadotròpiques, que produeixen LH i FSH (hormones luteoestimulant i foliculoestimulant, respectivament).

L'eix de l'hormona de creixement (GH) està format per una sèrie de gens, els productes dels quals són requerits per a la regulació del creixement esquelètic normal.

PROP1 i PIT1 regulen la diferenciació de les cèl·lules pituïtàries en somatotroques, les quals sintetitzen i excreten la GH. Altres gens importants per l'excreció de la GH són GHRH (alliberadora de l'hormona de creixement) i GHRHR (receptor de l'hormona alliberadora de l'hormona de creixement). La GHRH és sintetitzada i excretada des de l'hipotàlem, arriba fins a la pituïtària anterior on s'uneix al GHRHR, unió que resulta en la transducció d'un senyal en les cèl·lules somatotroques que promouen l'excreció de la GH que està presintetitzada i emmagatzemada en

glàndules secretores (Figura 2). La secreció de GH és pulsàtil, i es troba regulada per almenys dues hormones hipotalàmiques (una estimuladora de la GH que ja s'ha comentat anteriorment, GHRH, i una altra inhibidora, que és la somatostatina, SMS). Tot seguit, la GH circula en sang unida a una molècula de GHBP (*growth hormone-binding protein*) (Baumann *et al.*,1986). Seguidament, la GH s'uneix a dues molècules de GHR (receptor de GH) al fetge i en altres teixits, unió que activa la senyalització fins a estimular la síntesi d'IGF1, que després s'unirà al seu receptor IGF1R, activant el creixement en diferents teixits, incloent el cartílag de creixement i músculs (veure Figura 3). L'IGF1 és produït majoritàriament al fetge, però també és sintetitzat en altres teixits, entre ells el cartílag de creixement.

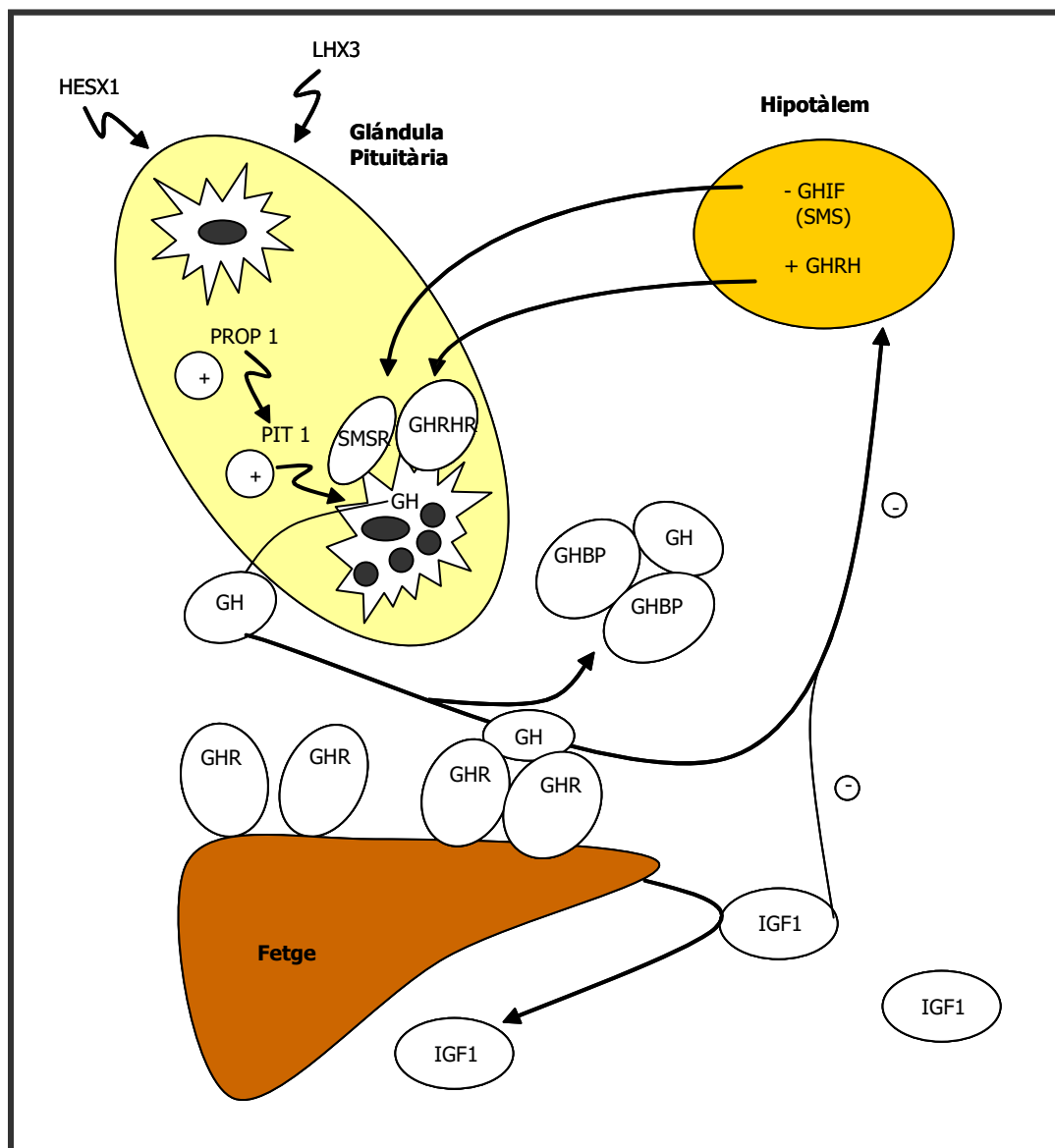


Figura 2. Vies de secreció de l'eix GH-IGF1.

La secreció de GH és pulsàtil, amb fases de brusca alliberació (polsos) separades de períodes en els que la secreció és molt reduïda (interpols). Els polsos de GH es

deuen a la secreció alternant de GHRH i somatostatina; així, cada pic de GH es correspon amb un augment de la secreció de GHRH i una disminució de la de somatostatina i al contrari passa en els períodes interpols.

L'hormona de creixement té altres funcions que queden resumides a la Figura 3.

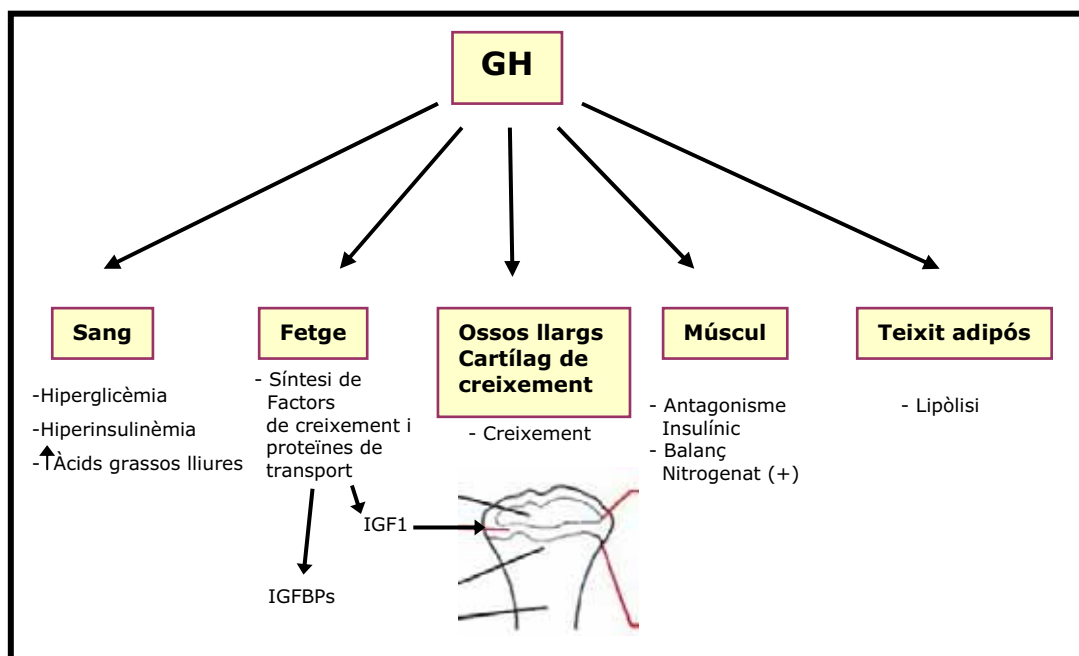


Figura 3. Representació esquemàtica de les principals accions de l'hormona de creixement (GH).

L'hormona de creixement actua sobre múltiples teixits, ja sigui directament o bé a través de l'IGF-1.

Els efectes de la GH sobre la síntesi proteica i el metabolisme de carbohidrats i lípids és directe, mentre que els seus efectes sobre el creixement són mediatats a través de l'IGF-1. La GH fonamentalment estimula el metabolisme dels àcids nucleics i de proteïnes al fetge (producció d'IGF-1), el teixit adipós (lipòlisi) i els músculs (antagonisme insulínic). Així doncs, l'administració de GH en nens que tenen dèficit de GH produeix un balanç positiu de nitrogen, disminució en la producció d'urea, redistribució del greix corporal i reducció en la utilització de carbohidrats, augment de l'IGF1 circulant en sang i augment de la velocitat de creixement.

2. EL DÈFICIT AÏLLAT DE GH (IGHD)

El dèficit de GH durant l'infància és una malaltia relativament poc freqüent, que afecta més o menys 1 de cada 4000-10000 naixements. La majoria de casos són esporàdics i no se'n descriu l'etiologia. Tot i amb això, es creu que entre el 5% i el 30% dels casos amb IGHD tenen familiars de primer ordre amb creixement retardat. Aquesta associació suggereix que pot haver una etiologia genètica en la deficiència aïllada de GH en algunes famílies.

2.1 Aspectes clínics

Des del naixement es necessita una adequada quantitat de GH en sang per mantenir un creixement normal. Els nounats que tenen dèficit de GH tenen generalment una longitud i un pes correctes. El retard de creixement s'instaura progressivament amb una maduració esquelètica retardada en proporció al seu creixement retardat. Molts cops aquests nens tenen una obesitat troncal, una aparença facial de menor edat per la seva edat cronològica i la segona dentició està retardada. La pubertat pot estar retardada fins als últims anys de l'adolescència, però la fertilitat acostuma a ser normal (Procter *et al.*, 1998).

2.2 Genètica

El dèficit aïllat de GH (IGHD) pot ser conseqüència de mutacions en el receptor de GHRH o en el gen GH1 (Phillips III, 2003). Segons l'herència es descriuen 3 tipus de dèficits aïllats de GH d'origen genètic:

- I) El tipus I es divideix en quatre subtipus:
 - **IGHD IA.** S'hereta de manera autosòmica recessiva. És la forma més severa de la malaltia. Ho produeixen delecions, mutacions amb canvi del marc de lectura, i mutacions amb pèrdua de sentit en el gen GH1. Els pacients amb aquest dèficit no secreten GH. En general no responen bé al tractament amb GH perquè produeixen anticossos anti-GH.
 - **IGHD IB.** També s'hereta de manera autosòmica recessiva. Ho produeixen mutacions que afecten els llocs de processament, i la proteïna resultant té una estabilitat i una activitat biològica reduïdes. Els pacients tenen nivells baixos de GH, però detectables. Responen millor al tractament amb GH que el IGHDIA, ja que no produeixen anticossos anti-GH.
 - **GH Bioinactiva.** Són pacients que tenen la mateixa manifestació clínica que els pacients amb IGHD, però que tenen un nivell de GH immunoactiu, en plasma, normal després de provocar

l'estimulació de la seva secreció i, en canvi, tenen nivells baixos d'IGF-1. Responen bé a GH exògena.

- **Defectes en el receptor de GHRH.** S'han descrit varies mutacions en aquest gen que provoquen IGHD.
- II) **IGHD II.** S'hereta de manera autosòmica dominant. Els pacients responen bé al tractament amb GH. El produeixen mutacions que alteren els llocs de processament i quasi totes provoquen la deleció de l'exó 3 del gen o un *splicing* incorrecte d'aquest exó.
- III) **IGHD III.** Està lligat al cromosoma X. Laumonier *et al.*, 2002 van estudiar una família amb retard mental i IGHD que presentaven una duplicació de 33 pb al gen SOX3 que codificaven per 11 alanines. Aquest gen es troba al cromosoma X (Xq26.3). L'IGHD III es presenta de manera diferent segons les famílies. En algunes famílies hi ha casos d'agammaglobulinèmia associat a IGHD, i en altres només IGHD.

L'IGHDII és causat majoritàriament per mutacions en el lloc d'*splicing* de l'intró 3 del gen GH1, el que comporta, com s'ha explicat anteriorment, la deleció de l'exó 3 del gen, que produeix la pèrdua dels aminoàcids 32 a 71, i amb això el *loop* que connecta les hèlixs 1 i 2 de la molècula es perd. Per tant, la proteïna resultant pateix un canvi en l'estructura. La producció de GH en pacients que tenen aquesta mutació en un al·lel del gen és extremadament baixa, tot i mantenir-se un dels dos al·lells correctament. Això és degut a que la producció de la proteïna mutant del 32-71 causa un bloqueig de la secreció de la proteïna GH normal. Existeixen diverses hipòtesis per explicar aquest fet:

- (i) Acumulació d'agregats de proteïnes mutants.
- (ii) Disminució de l'estabilitat intracel·lular de la GH normal degut a respostes cel·lulars induïdes per proteïnes que no estan plegades.
- (iii) Un bloqueig específic de l'agregació de GH i excreció en vesícules secretores.
- (iv) Poca maduració dels grànuls secretors.

2.3 Diagnòstic i tractament

Molts casos d'IGHD són esporàdics i alguns són secundaris a defectes cerebrals provocats per infeccions, radiació, trauma, o tumors que afecten l'hipotàlem o la glàndula pituïtària. Degut a això s'ha de fer una ressonància magnètica per descartar anomalies a l'hipotàlem o la glàndula pituïtària. Això suposa un 12% dels pacients amb IGHD.

Per determinar si un pacient té IGHD, cal fer uns tests que determinin si hi ha dèficit de secreció de GH, ja que l'estatura baixa, el retard de creixement, i la maduració esquelètica retardada no són proves suficients per demostrar que el pacient té deficiència de GH. Els tests més emprats són els següents: exercici, L-Dopa, hipoglicèmia insulínica, arginina, insulina-arginina, clonidina, glucagó i propranolol + exercici. També s'ha de determinar si hi ha deficiències d'altres hormones hipofisiàries com TSH, ACTH, LH i FSH.

El tractament adequat per al dèficit de GH és l'administració de GH recombinant. Així doncs, els nens que tinguin IGHD s'han de tractar tan aviat com sigui possible amb GH recombinant. La dosi d'inici es calcula basant-se en el pes del pacient. La dosi incrementa amb el pes corporal arribant a la dosi màxima durant la pubertat, i molts cops es continua administrant fins al final del creixement, tot i que això depèn dels protocols aplicats i del cas individual de cada pacient. Aquest tractament s'ha demostrat efectiu, tot i que la resposta al tractament depèn de diversos factors, com ara la severitat de la malaltia, factors genètics, l'edat en que es comença el tractament, de si el tractament es complica per l'aparició d'anticossos anti-GH, i del reconeixement i resposta al tractament d'altres deficiències associades com ara deficiència en l'hormona tiroïdal (Procter *et al.*, 1998).

GH bioinactiva i mutacions descrites en el gen GH1 que comporten canvi d'aminoàcid

Hi ha mutacions que en la seqüència del gen GH1 provoquen el clàssicament denominat síndrome de Kowarski (Kowarski *et al.*, 1978), és a dir, una GH circulant detectable per RIA però una activitat somatomedina baixa i retràs de creixement. Takahashi *et al.*, 1996, van demostrar en un pacient la presència d'una mutació puntual en el gen GH1 i que produïa la síntesi d'una proteïna anòmala que era detectada en sang mitjançant tècniques d'immunoassaig en concentracions normals o elevades però que tenia un efecte dominant negatiu sobre el receptor ja que el bloquejava i no permetia la transmissió del senyal.

A la Taula 1 es mostren els canvis nucleotídics trobats a la seqüència del gen GH1 i que provoquen canvi d'aminoàcid descrits en la literatura.

Posició a la seqüència del gen GH1	Canvi d'aminoàcid	Codó	Exó	Referència
5231 A>G	Thr-Ala	-24	Exó 1	Miyata <i>et al.</i> , 1997
5531 T>C	Leu-Pro	-11	Exó 2	Millar <i>et al.</i> , 2003
5543 G>A	Trp-Term	-7	Exó 2	Cogan <i>et al.</i> , 1993
5551 G>T	Glu-Term	-4	Exó 2	Wagner <i>et al.</i> , 1998
5567 C>A	Pro-Gln	2	Exó 2	Koike <i>et al.</i> , 2001
5608 C>T	Arg-Cys	16	Exó 2	Millar <i>et al.</i> , 2003
5642 C>T	Thr-Ile	27	Exó 2	Millar <i>et al.</i> , 2003
5893 A>G	Lys-Arg	41	Exó 3	Millar <i>et al.</i> , 2003
5910 A>G	Asn-Asp	47	Exó 3	Millar <i>et al.</i> , 2003
5929 G>C	Cys-Ser	53	Exó 3	Besson <i>et al.</i> , 2005
5983 C>T	Ser-Phe	71	Exó 3	Millar <i>et al.</i> , 2003
6083 G>A	Glu-Lys	74	Exó 4	Millar <i>et al.</i> , 2003
6092 C>T	Arg-Cys	77	Exó 4	Takahashi <i>et al.</i> , 1996
6135 A>T	Gln-Leu	91	Exó 4	Millar <i>et al.</i> , 2003
6185 A>C	Ser-Arg	108	Exó 4	Millar <i>et al.</i> , 2003
6185 A>T	Ser-Cys	108	Exó 4	Millar <i>et al.</i> , 2003
6191 G>T	Val-Phe	110	Exó 4	Binder <i>et al.</i> , 2001
6198 A>G	Asp-Gly	112	Exó 4	Takahashi <i>et al.</i> , 1997
6639 A>G	Thr-Ala	175	Exó 5	Millar <i>et al.</i> , 2003
6653 C>G	Ile-Met	179	Exó 5	Lewis <i>et al.</i> , 2004
6664 G>A	Arg-His	183	Exó 5	Miyata <i>et al.</i> , 1997

Taula 1. Canvis en la seqüència del gen GH1 que provoquen canvi d'aminoàcid descrits a la literatura.

A l'hora d'estudiar la IGHDII, és important estudiar tant la proteïna GH que fa l'acció directa sobre el receptor de GH com estudiar el receptor en si, ja que el problema pot venir perquè l'hormona de creixement no activi correctament el receptor degut a una estructura incorrecta d'aquesta o bé pel receptor que no transmeti correctament el senyal. És per això que s'ha estudiat minuciosament l'estructura de la GH així com la del seu receptor (Wells, 1996; Cunningham *et al.*, 1989; de Vos *et al.*, 1992) de manera que s'han identificat quines són les zones d'interacció de les dues proteïnes i quins són els aminoàcids claus en aquesta interacció.

3. GEN GH1

El gen de l'hormona de creixement (GH1 o GH-N) està localitzat en un clúster al cromosoma 17 (17q22-q24) (Figura 4). Aquest gen té 1650 nucleòtids i està format per 5 exons i quatre introns, de la mateixa manera que estan formats els altres quatre gens del tàndem. En aquest clúster, a part d'haver el gen GH1 i GH2 o GHV, també hi ha els gens que codifiquen per les somatomotropines coriòniques (CSH). Hi ha els gens de les dues somatomotropines coriòniques (CSH1 i CSH2), i el pseudogen de la somatomotropina coriònica. Aquests gens estan separats per regions de 6 a 13 kb, es troben en la mateixa orientació transcripcional, són expressats a la placenta i es troben sota control d'amplificadors depenents de teixit (Jacquemin *et al.*, 1994). Aquest clúster, de 66.5-kb, ha estat clonat i seqüenciat per Chen *et al.*, l'any 1989. La GH i la CSH tenen 191 aminoàcids i una homologia del 85%. Els seus ARN missatgers tenen una homologia més gran del 90%. Owerbach *et al.*, l'any 1980 van estimar que el gen GH1 i els gens CSH van divergir fa uns 50 o 60 milions d'anys. La GH-N i la GH-V només difereixen en 13 dels 191 aminoàcids que contenen (Procter *et al.*, 1998).

Aquest clúster té un LCR (*locus control region*) localitzat a 14,5 kb de l'extrem 5' de GH-N. Els LCR són una sèrie d'elements que són suficients per activar un gen en un teixit específic, i que és independent de la seva posició en la seqüència del cromosoma (Dean *et al.*, 2006).

El promotor del gen GH1 està format per 492 parells de bases (pb). El primer exó té 72 pb, l'intró 1 260 pb, l'exó 2 161 pb, l'intró 2 209 pb, l'exó 3 120 pb, l'intró 3 91 pb, l'exó 4 164 pb, l'intró 4 253 pb, i l'exó 5 304 pb.

El gen GH1 s'expressa en les cèl·lules somatotropes de la glàndula pituitària anterior i els altres 4 gens s'expressen en cèl·lules del sincitrofoblast de la placenta. Tot i que això correspon a l'esquema clàssic, s'ha demostrat que les cèl·lules del sistema immune també poden expressar hormona del creixement, i s'ha utilitzat aquest fet per al treball actual (Hattori *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996; Hattori *et al.*, 1994).

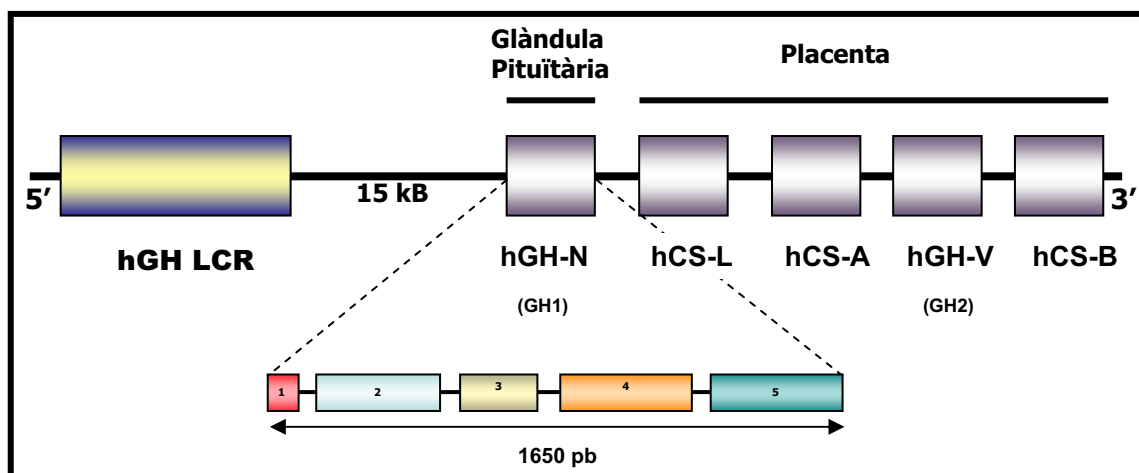


Figura 4. El gen GH1 o hGH-N es troba en el clúster amb quatre gens més, i té el LCR a 15 kB. El gen GH1 s'expressa a Glàndula Pituitària, i en canvi els altres quatre gens s'expressen a Placenta. GH-N o GH1 codifica per a la GH. CS-L o CSHP1 codifica per a la somatomatotropina coriònica que regula el creixement fetal. CS-A o CSH1 i CS-B o CSH2 codifiquen per a les somatomatotropines coriòniques i GH-V codifica per a la GH2.

Polimorfismes del gen GH1

Per determinar si els canvis trobats en la seqüència del gen dels pacients corresponen potencialment a mutacions o no, el primer que es va fer va ser establir el patró de polimorfismes del gen sencer en una població control.

La regió proximal del promotor del gen GH1 té un número elevat de polimorfismes (SNPs). Giordano *et al.*, 1997 i Wagner *et al.*, 1997 han descrit 16 SNPs en un total de 535 parells de bases. La majoria d'aquests SNPs tenen lloc en les mateixes posicions en que el gen GH1 difereix dels gens paràlegs GH2, CSH1, CSH2 i CSHP1, la qual cosa suggereix que han aparegut per conversió gènica (Giordano *et al.*, 1997; Krawczak *et al.*, 1999).

Horan *et al.*, l'any 2003 van estudiar el patró de polimorfismes del promotor de la GH, i van trobar variació en 15 dels 16 polimorfismes que ja estaven descrits. Es corresponen amb 40 patrons d'haplotips diferents pel promotor del gen. D'aquests, 12 patrons es van associar amb una expressió disminuïda del gen *reporter* de la luciferasa quan es comparava amb l'haplotip número 1 (aquest és l'haplotip que porta la proporció més elevada de la població estudiada), mentre que 10 haplotips estaven associats amb un increment de l'expressió.

4. ARN missatger de GH1

El trànscrip majoritari del gen GH1 és el que forma la variant 1 d'ARN, i que conté el producte transcrit a partir dels exons 2 a 5. Aquest trànscrip és el que traduït a proteïna dóna lloc a la proteïna de 22kDa.

S'ha demostrat que també es poden formar altres trànscrips d'ARN que es formen per processament alternatiu, ja que Palmetshofer *et al.*, l'any 1995 van trobar 5 variants d'ARN missatger a la glàndula pituitària que donen lloc a pèptids de diferents tamany, tres dels quals són biològicament actius (Figura 5):

- La primera variant d'ARNm (822 nucleòtids (nt)), dóna lloc a la proteïna de 22 kDa.
- La segona variant d'ARNm (777 nt), dóna lloc a la proteïna de 20 kDa.
- La tercera variant d'ARNm (702 nt), dóna lloc a la proteïna de 17,5 kDa.

Les altres dues variants no donen lloc a proteïna biològicament activa, tot i que podria ser que encara no es conegué amb certesa la funció d'aquests trànscrips d'ARN.

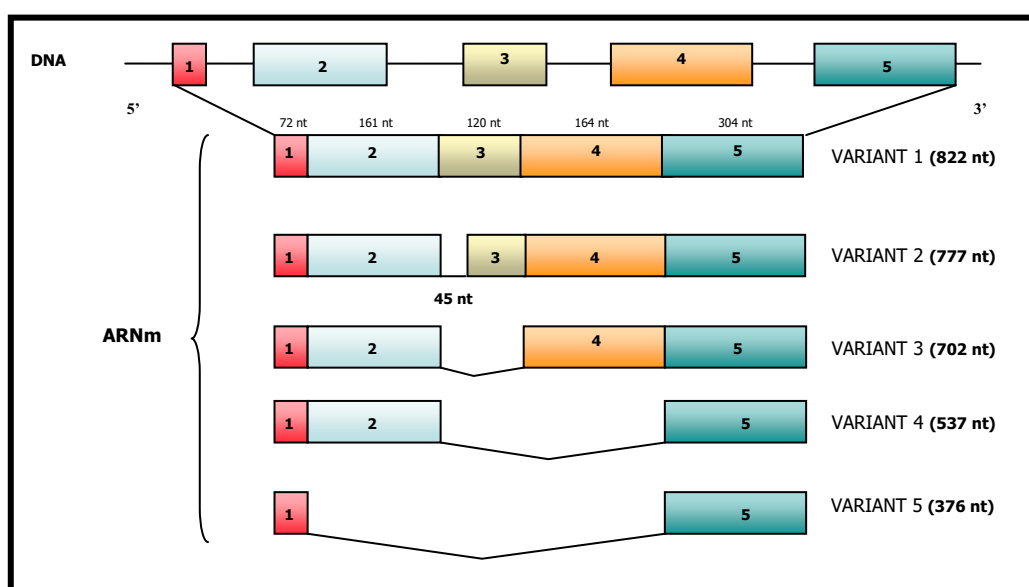


Figura 5. En aquesta figura es mostren els diferents trànscrips d'ARN missatger generats per *splicing* alternatiu a partir de la seqüència d'ADN en hipòfisi. Es mostren els tamany dels exons així com el tamany del trànscrip sencer.

A la Figura 6 es troba la seqüència de nucleòtids del gen GH1 dipositada al GenBank, amb número d'accés 183148. [*Human growth hormone (GH-1 and GH-2) and chorionic somatomammotropin (CS-1, CS-2 and CS-5) genes, complete cds gi|183148|gb|J03071.1|HUMGHCSA[183148]*]. Aquesta seqüència va ser introduïda per Chen *et al.*, l'any 1989.

En aquesta seqüència, a part de senyalar els 5 exons del gen, també es marquen les regions del promotor on s'uneixen els factors de transcripció que afecten l'expressió dels gens en general i que poden actuar tant positivament com negativament (Giordano *et al.*, 2006). Aquests són: NF-1 (Courtois *et al.*, 1990), Sp1 (proteïna estimulant de la transcripció, Lemaigre *et al.*, 1989), Zn-15 (Lipkin *et al.*, 1993), el receptor de Vitamina D (VDR) (Seoane *et al.*, 2002), i CREB (proteïna que interacciona amb els llocs de resposta a AMPc, Shepard *et al.*, 1994). També es marca la regió d'unió del factor Pit1, ja que l'expressió específica a la glàndula pituïtària és controlada majoritàriament pel factor específic pituïtari (Ingraham *et al.*, 1988). En rata també s'ha trobat que la Vitamina D interfereix amb la transactivació del gen GH1 provocada per l'hormona tiroidea i l'àcid retinoic (Garcia-Villalba *et al.*, 1996), és a dir, que també hi hauria una zona de reconeixement d'Àcid Retinoic (AR) i d'hormona tiroidea (T3) però això no ha estat comprovat en humans i per tant aquestes zones no es mostren en el següent esquema de la Figura 6.

```

4621 gaactgcatc cagctgactc aggctgacc aggagtctc agcagaagtg gaattcagga
                                         4671
4681 ctgaatcgtg ctcacaaccc ccacaatcta ttggctgtgc ttggcccctt ttcccaacac
4741 acacattctg tctggtgggt ggagggttaa catgcgggga ggaggaaagg gataggatag
4801 agaatgggat gtggtcggta gggggtctca aggactggct atcctgacat ccttctccgc
4861 gttcaggttg gccaccat gg cctgcgggcca gagggcacc acgtgaccct taaagagagg
                                         NF-1
4921 acaagttggg tggtatctct ggctgacact ctgtgcacaa ccctcacaac actgg tgacg
                                         CREB
4981 gtgggaaggg aaagatgaca agccaggggg catgatccca gcatg tgtgg gaggag cttc
                                         Sp1
5041 taaattatcc at tagca caa gcc cgtcagt ggcccc atgc ataaatgtac ac agaaacag
    Pit-1d           Zn-15  CREB           Pit-1p
5101 gt ggggggcaa cagtggga ga gaaggg gccca gg tataaaaa gggccacaa gagaccagct
    VDR           VDR
5161 ca aggatccc aaggcccaac tccccgaacc actcagggtc ctgtggacag ctcacctagc
    5163           5' UTR

5221 ggcaatggct acag gtaagc gcccctaaaa tcctttggg cacaatgtgt octgagggga
(1)   M   A   T   5235
    5225

5281 gaggcagcga cctgtagatg ggacgggggc actaacctc aggtttggg cttctgaatg
.....

5341 tgagtatcgc catgtaagcc cagtatttgg ccaatctcag aaagctctg gtccctggag
.....

5401 ggatggagag agaaaaacaa acagctcctg gagcagggag agtgctggcc tcttgctctc
.....

5461 cggtccctc tgttgccctc tggtttctcc ccaggctccc ggacgtccct gctcctggct
(4)           G   S   R   T   S   L   L   L   A
    5495

5521 tttggcctgc tctgcctgcc ctggcttcaa gagggcagtg ccttcccaac cattccctta
    1   F   G   L   L   C   L   P   W   L   Q   E   G   S   A   F   P   T   I   P   L
    5563

```

(13)
5581 tccaggcttt ttgacaacgc tatgctccgc gcccatcgtc tgcaccagct ggcctttgac
7 **S R P F D N A M L R A H R L H Q L A F D**

(33)
5641 acctaccagc agtttgtaag ctcttgggga atgggtgcmc atcaggggtg gcaggaaggg
27 **T Y Q E F** 5656

(53)
5701 gtgactttcc cccgctggga aataagagga ggagactaag gagctcaggg tttttcccga

5761 agcgaaaatg caggcagatg agcacacgct gagtgaggtt cccagaaaag taacaatggg

5821 agctgggtctc cagcgtagac ctgggtgggc ggtccttctc ctaggaagaa gcctatatcc
32 **E E A Y I P** 5865

(58)
5881 caaaggaaca gaagtattca ttcctgcaga acccccagac ctccctctgt ttctcagagt
38 **K E Q K Y S F L Q N P Q T S L C F S E S**

(64)
5941 ctattccgac accctccaac agggaggaaa cacaacagaa atccgtgagt ggatgccttc
58 **I P T P S N R E E T Q Q K S** 5985

(84)
6001 tccccaggcg gggatggggg agacctgtag tcagagcccc cgggcagcac agccaatgcc

6061 cgctcttccc ctgcagaacc tagagctgct ccgcatctcc ctgctgctca tccagtcgtg
72 **N L E L L R I S L L L I Q S W** 6077

(98)
6121 gctggagccc gtgcagttcc tcaggagtgt cttcgccaac agcctgggtg acgggcctc
87 **L E P V Q F L R S V F A N S L V Y G A S**

(113)
6181 tgacagcaac gtctatgacc tctaaagga cctagaggaa ggcattccaa cgctgatggg
107 **D S N V Y D L L K D L E E G I Q T L M G**

(133)
6241 ggtgaggggtg ggcaggggg tcccattcc tggagcccca ctgactttga gagctgtgtt
6242

6301 agagaaacac tgctgccctc tttttagcag tcaggccctg acccaagaga actcacctta

6361 ttcttcattt ccctcgtga atcctccag cttttctcta caccctgaag gggagggagg

6421 aaatgaatg aatgagaaag ggagggaaaca gtaccaaac gtttgccctc tccttctctt

6481 ccttcacttt gcagaggctg gaagatggca gcccccgac tgggcagatc ttcaagcaga
127 **R L E D G S P R T G Q I F K Q T** 6495

(153)
6541 cctacagcaa gttcgacaca aactcacaca acgatgacgc actactcaag aactacgggc
143 **Y S K F D T N S H N D D A L L K N Y G L**

(167)
6601 tgctctactg cttcaggaag gacatggaca aggtcgagac attcctgcmc atcgtgcagt
163 **L Y C F R K D M D K V E T F L R I V Q C**

(189)
6661 gcccctctgt ggagggcagc tgtggcttc t agctgcccgg gtggcatccc tgtgaccct
183 **R S V E G S C G F** ^ ^ 6692 3' UTR

(209)
6721 cccagtgcc tctcctggcc ctggaagttg ccaactccagt gccaccagc cttgtcctaa

6781 taaaattaag ttgcatcatt ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atgggggtga
6798

6841 gggggggtgt atggagcaag gggcaagttg ggaagacaac ctgtagggcc tgcgggtct

6901 attcgggaac caagctggag tgcaagtgca caatcttggc tcaactgcaat ctccgctcc

6961 tgggttcaag cgattctcct gctcagcct cccagattgt tgggattcca ggcagcatg

Figura 6. Seqüència de nucleòtids del gen GH1. La numeració en color negre correspon a la seqüència nucleotídica que té un número d'accés al GenBank 183148. En blau clar es mostra la traducció a aminoàcids del pèptid senyal de la proteïna, i en blau marí la traducció a proteïna del pèptid madur. Els exons del gen es mostren subratllats. També es mostren en diferents colors els llocs d'unió dels factors de transcripció generals i dels específics d'hipòfisi.

Com es pot observar, l'exó 1 conté 60 pb a l'extrem 5' que no es tradueix a proteïna. L'exó 2 codifica la resta de pèptid senyal i els primers 31 aminoàcids de la proteïna madura GH. Els exons 3 al 5 codifiquen pels aminoàcids 32-71, 72-126 i 127-191 respectivament. L'exó 5 també conté una regió a l'extrem 3' de 112 pb que no es tradueix, i finalment es troba la regió de poliadenització.

Processament de l'ARN

A la Figura 7 es troba l'esquema del processament de l'hormona de creixement, des del gen fins al pèptid de 191 aminoàcids. L'ADN es transcriu a ARN missatger dins el nucli cel·lular. Posteriorment aquest es tradueix a proteïna al citosol de la cèl·lula formant la pre-hormona GH, que conté el pèptid senyal de 26 aminoàcids, i que finalment es perd per convertir-se en l'hormona de 191 aminoàcids que serà la biològicament activa.

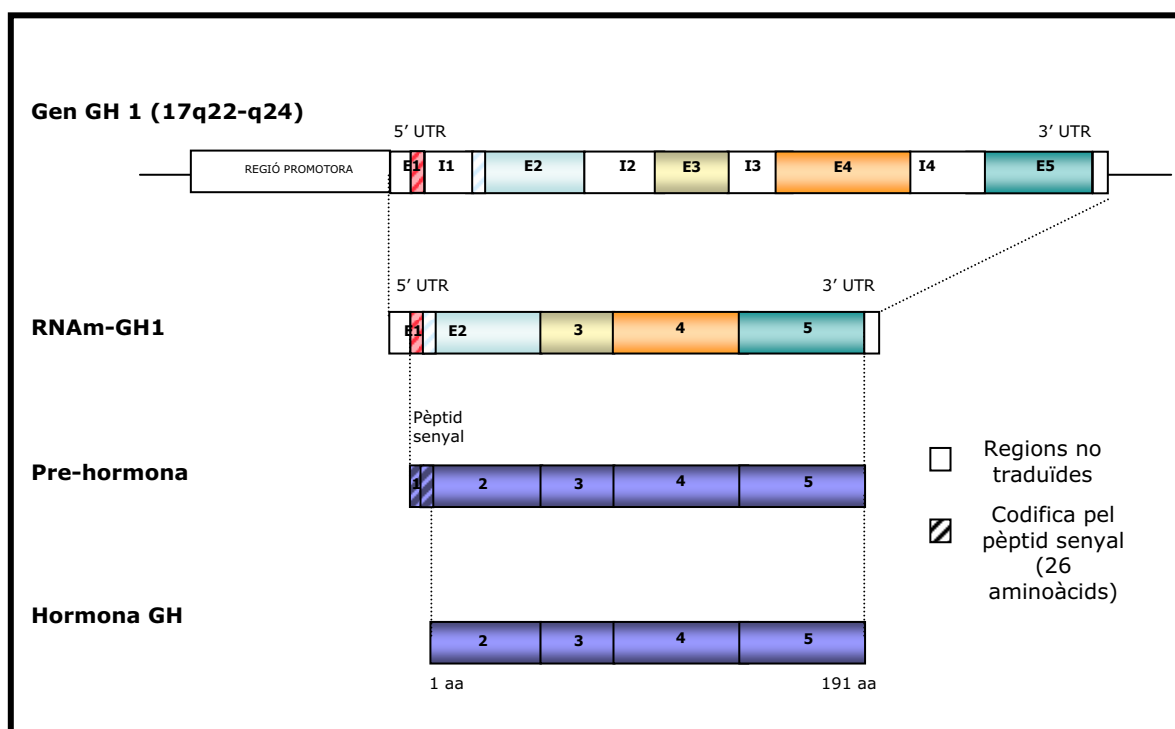


Figura 7. Representació esquemàtica del procés de síntesi peptídica de l'hormona de creixement GH.

Tot i que el gen GH1 té 5 exons, només formen part de la proteïna madura el producte traduït de part de l'exó 2, i de l'exó 3, 4, i 5. En blanc es marquen els introns del gen, en diferents colors els exons i, un cop traduït a proteïna, es marca de color blau fosc les regions provinents de la traducció dels exons. Les parts ratllades senyalitzen les regions que donen lloc al pèptid senyal i que no formaran part de la proteïna madura.

5. EXPRESSIÓ DE GH1 EN LEUCÒCITS DE SANG PERIFÈRICA

El gen de l'hormona de creixement s'expressa principalment a la glàndula pituitària, però diversos autors han descrit l'expressió d'aquest gen en altres teixits, com ara el sistema immune (Hattori *et al.*, 1994; Hattori *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996). Hattori *et al.*, l'any 1999 demostren que els limfòcits sintetitzen i secreten hormona de creixement amb una antigenicitat, un pes molecular i una bioactivitat similar a la GH produïda per la glàndula pituitària. A més a més, els limfòcits tenen receptors de GH (Kiess *et al.*, 1985), amb la qual cosa la GH produïda pels limfòcits podria actuar d'una manera autocrina o paracrina.

El fet que el gen s'expressi en limfòcits de sang perifèrica permetrà estudiar l'expressió d'aquest gen *in vivo*, estudiant l'expressió de GH1 en pacients.

6. HORMONA DE CREIXEMENT (GH)

La GH és una hormona multifuncional que promou el creixement postnatal de teixit esquelètic i de teixits tous a través de gran varietat d'efectes. És un polipèptid de 191 aminoàcids i té dos ponts disulfur (Cys53-Cys165, Cys182-Cys189).

La molècula té una estructura de *four-helical bundle*: les hèlixs tenen una estructura *up-up-down-down*, és a dir que les dues primeres hèlixs són paral·leles entre sí, i són antiparal·leles respecte les altres dues, en contrast amb el més típic *up-down-up-down* (de Vos *et al.*, 1992). Les hèlixs dels extrems amino i carboxi terminal (1 i 4) són més llargues que les altres dues (26 i 30 aminoàcids comparats amb els 21 i 23 de les altres dues hèlixs). A més a més de les quatre hèlixs més importants hi ha tres altres segments d'hèlix en els *loops* que connecten les altres hèlixs. (de Vos *et al.*, 1992). A la Figura 8 es representa l'estructura de la proteïna GH. La representació està realitzada amb el programa Molsoft.

El core de les quatre hèlixs està compost per aminoàcids hidrofòbics.

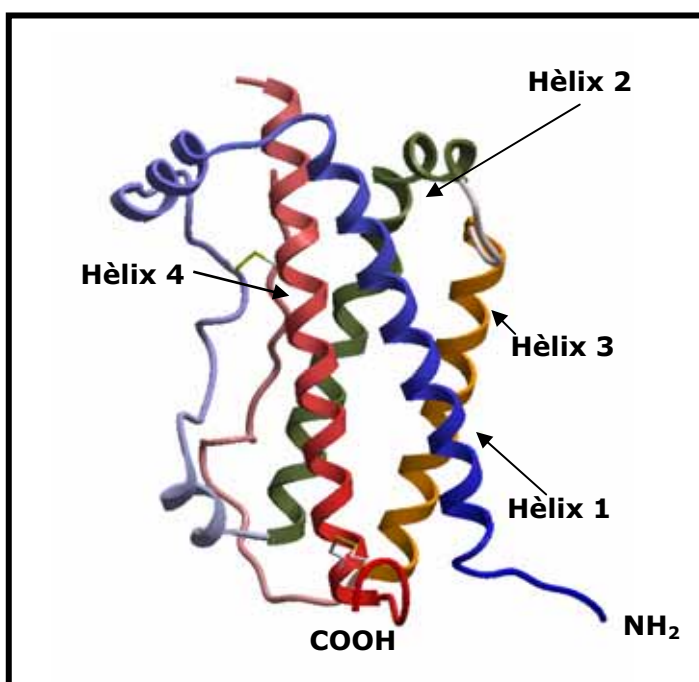


Figura 8. Representació gràfica de l'hormona de creixement. Les quatre hèlixs α es mostren de colors diferents (blau, verd, taronja i vermell). També es mostren els *loops* que uneixen les quatre hèlixs.

S'ha de tenir en compte un altre fet rellevant per a l'estructura de la GH: Duda *et al.*, l'any 2003 han demostrat que el Zn^{2+} és important ja que participa en la unió de la hGH al receptor de PRL, i a més a més estabilitza la molècula de GH. El treball publicat per Cunningham *et al.*, 1991b, suggereix que el complex del Zn^{2+} a dues molècules de hGH té almenys dues funcions:

- El dímer Zn^{2+} -hGH és més estable en front a la desnaturalització amb guanidini-HCl que el monòmer hGH. Com que l'hormona de creixement

pot estar emmagatzemada durant dies en vesícules, és més estable en forma de dímer unit a Zn^{2+} que no pas en forma de monòmer.

- La concentració de hGH quan és excretada de la glàndula pituïtària és de 1 mM, i en canvi quan arriba als receptors de GH és de 2 nM. Si l'hormona de creixement no estigués dimeritzada, de seguida saturaria els receptors pròxims a la glàndula pituïtària i, en canvi, en estar dimeritzada només es dissocia quan arriba a una concentració d'uns 3 μ M, la qual cosa permet obtenir hGH a una concentració més aproximada a la d'unió al receptor, i permet disminuir els efectes estimuladors que podrien donar-se per una concentració tan elevada de hGH a prop de la glàndula pituïtària.

Els mateixos autors han determinat com dues molècules de Zn^{2+} s'uneixen a dues molècules de GH: el Zn^{2+} s'uneix a la His18, a la His21 (hèlix 1), a la Glu 174 (hèlix 4) i a una altra molècula de Zn^{2+} , la qual s'uneix anàlogament a una altra molècula de GH pels mateixos aminoàcids descrits. D'aquesta manera, el Zn^{2+} juga un paper important en l'emmagatzematge de la GH.

La proteïna GH consta d'un pèptid senyal de 26 aminoàcids que, un cop escindit, deixa una proteïna de 191 aminoàcids que circula en sang unida a una molècula de GHBP. La unió amb una molècula del receptor de GH (GHR) produeix un canvi conformacional a la proteïna que fa que una segona molècula de GHR s'uneixi com a dímer. La dimerització de les dues molècules unides a la GH és necessària per la transducció de senyal, la qual cosa també requereix la tirosina kinasa JAK-2.

Així doncs, quan la GH interacciona amb el seu receptor (GHR), atrauen JAK2 (Janus kinase 2) citosòlics, la qual s'autofosforila i simultàniament fosforila les tirosines en el GHR, això fa que s'hi uneixin diferents adaptadors com la família dels STAT, fosfatidilinositol 3-kinasa, i les MAPK. La família dels STATs són factors de transcripció citosòlics. S'uneixen a fosfotirosines a través del seu domini SH2, incloent GHR. Després són fosforilats per JAK2. Tot seguit es dissocien del seu receptor, i transloquen cap el nucli, on activen diferents gens, com ara l'IGF1 (Figura 9).

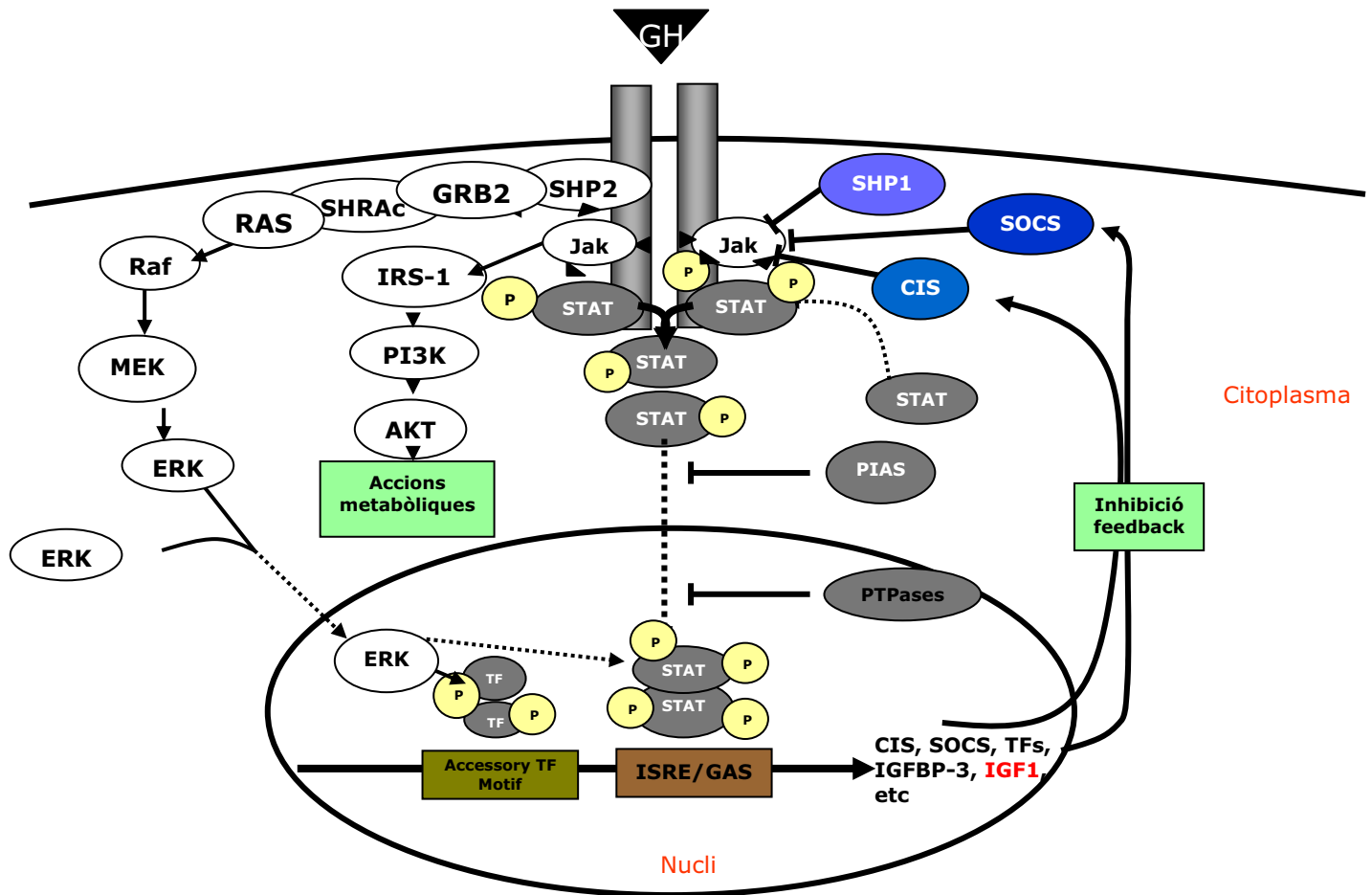


Figura 9. Esquema extret del treball de Rosenfeld, 2006. La GH s'associa al GHR, la qual cosa fa que s'atragui JAK2 i s'activi la via de les MAPK-ERK1/2, PI3K i STATs.

SHP: SH2-containing phosphatase.
 GRB: growth factor receptor-bound protein.
 SHC: SH2-containing collagen-related protein.
 RAS: small GTP binding protein.
 MEK: mitogen-activated protein kinase/ERK kinase.
 ERK: extracellular signal-related kinase.
 IRS: insulin receptor substrate.
 PI3K: phosphoinositide 3 kinase.
 AKT: AKT8 virus oncogene cellular homolog.
 JAK: Janus-family tyrosine kinase.
 STAT: signal transducer and activator of transcription.
 CIS: cytokine inducible SH2-containing protein.
 SOCS: suppressor of cytokine signaling.
 TF: transcription factor.
 GHRE: growth hormone response element.
 IGF1: insulin-like growth factor-I.
 IGFBP-3: IGF binding protein-3.
 PIAS: protein inhibitor of activated STATs

S'ha descrit un dels mecanismes a través dels quals la GH estimula l'expressió d'IGF1: Chia *et al.*, l'any 2005 han identificat i analitzat un segment d'ADN

anomenat HS7 al segon intró del gen IGF1 de rata que conté un tàndem de llocs d'unió a SAT5, i han demostrat que actua com a regulador *cis*, intervenint en la transcripció d'IGF-1 a través de GH. També han caracteritzat un segon lloc d'unió a Stat5 que es troba a 73kb de l'exó 1 del gen IGF1. Han trobat que el tractament amb GH estimula ràpidament la unió de STAT5b a la cromatina d'aquest lloc distal a la regió 5', i això activa l'expressió del gen IGF1.

7. PROCESSAMENT INTRACEL·LULAR DE LA GH

Dins el nucli, l'ADN es transcriu a ARN i posteriorment es tradueix l'ARN a proteïna dins el citoplasma. Aquestes proteïnes són transportades dins el lumen del reticle endoplasmàtic (ER). El plegament de les proteïnes es produeix al reticle endoplasmàtic i és ajudat per les xaperones (proteïnes que catalitzen el plegament). Unint-se als llocs hidrofòbics de les proteïnes, les xaperones prevenen que aquestes s'agreguin de manera insoluble, formant inclusions. Si les proteïnes són anòmales, aquestes poden ser degradades per proteases o poden ser transportades un altre cop al citosol mitjançant una conjugació amb ubiquitina.

Després de que les proteïnes es pleguin correctament, són transportades fins el complex cis-Golgi en vesícules petites i irregulars. Aquí es produeixen modificacions a les proteïnes, com ara sulfatacions, o glicosilacions. Un cop es troben al trans-Golgi, les proteïnes són transportades en vesícules específiques a la membrana plasmàtica, als endosomes, als lisosomes, o tornen a revertir el seu camí segons quin sigui el destí de la proteïna en qüestió (Mullis *et al.*, 2002).

Les mutacions que causen dèficit d'hormona amb herència autosòmica dominant s'han descrit en tres hormones, que són la vasopresina, l'hormona paratiroidea, i l'hormona de creixement. En aquestes deficiències, la producció de la proteïna mutant pot interferir amb la normal. En el cas de la GH, l'IGHD II és una deficiència que s'hereta de forma autosòmica dominant, on es suggereix que la producció de la proteïna mutant interfereix d'alguna manera amb la normal. La majoria de casos amb IGHD II són mutacions que provoquen la deleció dels aminoàcids 32 a 71. Aquesta deleció produeix un plegament incorrecte de la proteïna. Tot i que es podria assegurar que aquesta és la causa de la secreció disminuïda de GH, això no és correcte perquè hi ha altres malalties que provoquen un plegament incorrecte de proteïnes i, en canvi, això no implica que aquestes proteïnes siguin tòxiques per a la cèl·lula (Mullis *et al.*, 2002).

McGuinness *et al.*, l'any 2003, expliquen l'efecte dominant negatiu de la proteïna amb la deleció dels aminoàcids 32-71 (17,5-kDa GH) de la següent manera: la

proteïna de 17,5 kDa progressa a través del procés secretor podent formar heterodímers amb la GH normal. A més a més, la GH normal també pot formar homodímers. Els agregats d'heterodímer són estables, però no poden sortir de la cèl·lula mitjançant les vesícules SVs, i s'acumulen al Golgi, tornant enrere cap al reticle endoplasmàtic, i finalment son transportats al citosol. Un cop la producció d'heterodímer excedeix la capacitat degradativa del proteosoma, es comença a acumular en forma d'agregats al citosol, al reticle endoplasmàtic i al Golgi, essent tòxica aquesta acumulació per a la cèl·lula. Aquest procés és incrementat ja que GHRH incrementa l'expressió tant de GH-WT com de GH mutant per intentar reemplaçar i expandir les cèl·lules somatotropes. El macròfags s'encarreguen de destruir les cèl·lules malmeses. D'aquesta manera s'explica el fet que la proteïna de 17,5 kDa no sigui tòxica quan s'expressa de forma aïllada o amb altres proteïnes que no siguin la GH-WT, i el fet que l'efecte dominant només es doni quan aquesta forma és expressada en cèl·lules secretores.

8. GHP

La proteïna GH es troba al sèrum humà unida a la GHP (*growth hormone binding protein*). Aquesta és una glicoproteïna de cadena única amb un pes molecular d'uns 60 kDa i s'uneix 1:1 a la molècula de GH. S'ha demostrat que la GHP prové de la porció extracel·lular del receptor de GH en humans. En canvi, en ratolins la GHP es sintetitza *de novo* (Rosenfeld *et al.*, 1994)

9. RECEPTOR DE GH (GHR)

El receptor de GH és una proteïna integral de membrana que en humans conté 638 aminoàcids, incloent un pèptid senyal de membrana de 18 residus. Pertany a la superfamília dels receptors hematopoiètics. Consisteix en un domini extracel·lular (ECD) de 246 aminoàcids que s'uneix al lligand i que confereix l'especificitat, un domini transmembrana únic i un domini citoplasmàtic de 350 residus que presenta poca homologia amb els altres membres de la família (Pantel *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000). És en aquesta porció on s'uneixen les molècules de JAK tirosina kinasa, i on es transdueix el senyal a les molècules de STAT.

De Vos *et al.*, l'any 1992 van estudiar l'estructura cristal·lina de GHR (Figura 10). La part extracel·lular del receptor consisteix en dos dominis (residus 1 a 123 i 128 a 238 respectivament), units per un segment de quatre residus. Cada domini conté 7 làmines β , que en conjunt formen un *sandwich* de dues làmines β antiparal·leles,

una amb quatre cadenes i l'altre amb tres amb la mateixa topologia a cada domini. S'ha de tenir en compte que els 30 primers residus de l'extrem NH₂ terminal de les dues molècules del receptor en el complex no van aparèixer en el mapa de densitat electrònica i per tant no formen part del model. Aquest fet és important remarcar-lo perquè aleshores no distingeix entre la forma fl-GHR (full-length-GHR), forma que reté l'exó 3 o la forma d3-GHR (exon3 deleted-GHR), que exclou l'exó 3.

El gen GHR conté 9 exons, numerats del 2 al 10. L'exó 2 codifica pel pèptid senyal, els exons del 3 al 7 codifiquen pel domini extracel·lular, l'exó 8 codifica pel domini transmembrana, i els exons 9 i 10 codifiquen pel domini citoplasmàtic (Godowski *et al.*, 1989). Hi ha dues isoformes de GHR en humans generades per la retenció o exclusió de l'exó 3 durant l'*splicing*. Hi ha la isoforma *full-length*, que conté l'exó 3 (fl-GHR) i la isoforma *del3*, que no conté l'exó 3 (d3-GHR). La generació d'aquests dos trànscrips que difereixen per l'exclusió d'una zona codificant ha resultat per un procés de recombinació homòloga, la qual mimetitzava l'*splicing* alternatiu entre dues seqüències retrovirals que flanquegen l'exó escindit (Pantel *et al.*, 2000). Així doncs, la forma d3-GHR no es genera per un *splicing* alternatiu, sinó que ja és la seqüència de l'ADN la que porta la deleció d'aquest exó.

Defectes en el gen GHR produeixen retard en el creixement, donant lloc a una malaltia anomenada Síndrome de Laron. Aquestes persones tenen nivells normals o elevats de GH, i nivells baixos d'IGF1. A més a més no responen bé a la GH exògena, perquè tenen una manca de resposta del receptor. En canvi, el tractament amb IGF1 exogen sí que ha donat bons resultats (Phillips III *et al.*, 2003).

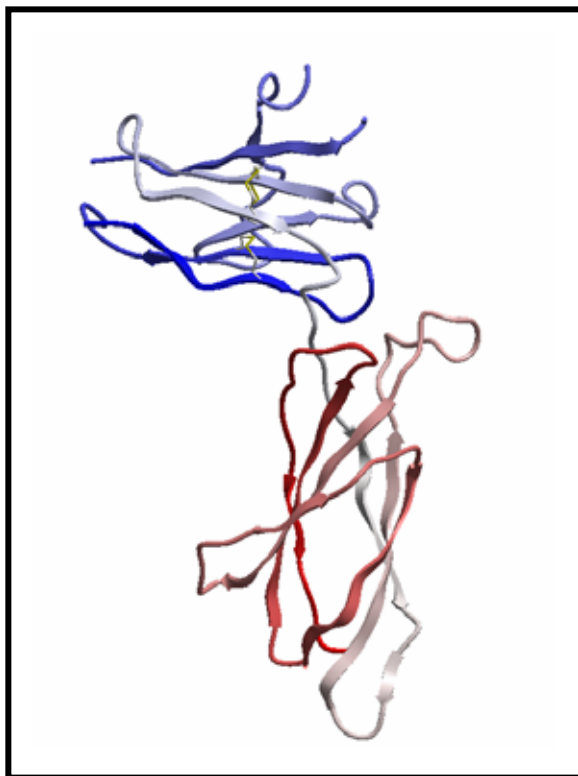


Figura 10. Porció extracel·lular de GHR. Esquema realitzat amb el programa Molsoft. Els dos dominis queden diferenciats mitjançant els colors. Un domini és el que conté les làmines beta de colors blavosos, i l'altre el que conté les làmines beta de colors vermellors.

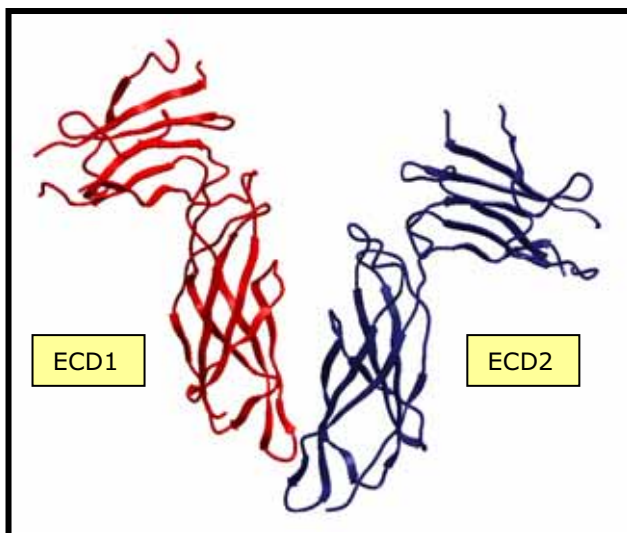
10. INTERACCIÓ GH-GHR

Tot i que les superfícies d'unió entre lligands i receptors són extenses, la major part de l'energia d'unió es desenvolupa a través d'interaccions d'un nombre relativament petit de residus de cada molècula (Kossiakoff *et al.*, 1994).

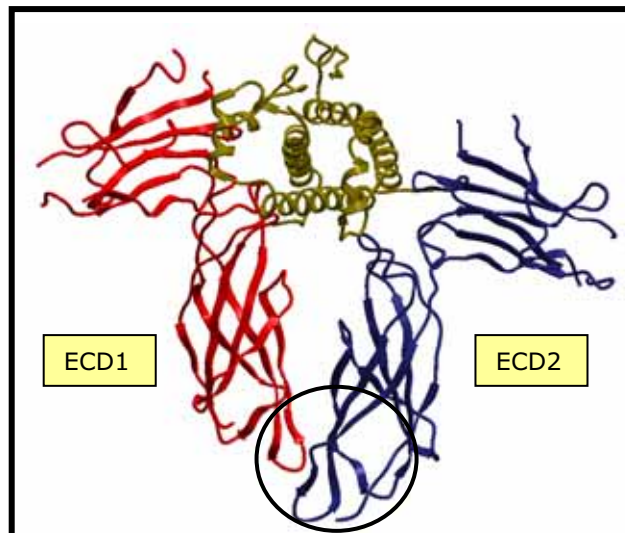
Els estudis de mutagènesi realitzats han demostrat que l'activació del receptor és un procés seqüencial on el primer pas consisteix en la unió de la molècula hGH a través del lloc 1 (*site 1*) al receptor. Un cop s'ha format el complex 1:1, una segona molècula de receptor s'uneix al lloc 2 (*site 2*) de la hGH, unint-se al mateix temps a l'altra molècula de receptor (de Vos *et al.*, 1992; Cunningham i Wells, 1993). Aquesta hipòtesi es va deduir del fet que mutacions produïdes en el lloc 2 no disminuïen la capacitat de la proteïna de formar els complexos 1:1. El pas del complex 1:1 al complex 1:2 es realitza mitjançant un canvi de conformació. Un element molt important per a la unió de la segona molècula de GHR és que es forma un complex molt estable entre les dues molècules de receptor a través de la làmina β de l'extrem C-terminal. Aquesta unió es realitza mitjançant ponts d'hidrogen i interaccions de Van der Waals.

Tots els estudis que s'han fet sobre interaccions de la hGH amb els seus receptors s'han fet utilitzant les porcions extracel·lulars i no mitjançant estudis d'unió en cèl·lules. Tant l'hormona hGH com el receptor hGHR són proteïnes recombinants que s'han obtingut mitjançant l'expressió in vitro en *Escherichia coli*. A les Figures 11A i 11B es mostra l'estructura dels dos receptors de GH (11A), i també quan interaccionen amb el seu lligand, l'hormona GH (11B).

11A



11B



Figures 11A i 11B. Receptor de GH. ECD: domini extracel·lular. A: les dues molècules de GHR, B: les dues molècules de GHR i la molècula de GH (de color verd). Amb un cercle de color negre es mostra la zona d'interaccions entre les dues molècules de receptor.

Hi ha 6 ponts d'hidrogen entre els dos ECDs (dominis extracel·lulars) (Taules 2A i 2B). Marcat amb una ratlla taronja es mostren els aminoàcids que interaccionen mitjançant pont d'hidrogen.

2A

(Å ²)	ECD1
100	Y200
20	D152
40	S201
65	H150
10	N143
40	S145
75	L146
80	T147

2B

ECD2	(Å ²)
Y200	110
D152	40
S201	50
N143	60
H150	40
L146	0
T147	0

Taules 2A i 2B. Interaccions entre els aminoàcids dels dominis extracel·lulars ECD1 i ECD2. També es mostra la superfície que ocupa cada residu en la zona d'unió entre els dos receptors. (Taula extreta de Bernat *et al.*, 2003)

També s'han caracteritzat els ponts d'hidrogen existents entre les molècules de GHR i la molècula de GH. De Vos *et al.*, l'any 1992 van determinar els enllaços existents entre la molècula de GH i la de receptor (GHbp) (Taules 3A i 3B):

3A		3B	
Lloc 1		Lloc 2	
GH	GHbp	GH	GHbp
K41	E127	N12O δ 1	R43N η 2
Q46	E120	N12N δ 2	D126
P61	I103	R16	E44
R167N η 1	E127O ϵ 1	R19	Q166
R167N η 2	E127O ϵ 1		
K168	W104		
D171	R43N η 2		
T175	R43N η 1		
R178	I165		

Taules 3A i 3B. Interaccions per pont d'hidrogen per part de la proteïna GH amb la molècula de GHbp (GHR), ja sigui pel lloc 1 d'unió o pel lloc 2. Taula extreta de de Vos *et al.*, 1992.

Bernat *et al.*, l'any 2003 utilitzen la tecnologia d'*Alanine-Scanning mutagenesis*, que consisteix en mutar individualment cada residu de la proteïna a Alanina i comprovar l'efecte produït per aquesta mutació. Aplicada al ECD1, es posa de manifest que són tres els residus que dominen l'energia d'unió entre les dues molècules de receptor: S145^{E1}A (disminueix unes 70 vegades el *binding* amb l'altra molècula de receptor), T147^{E1}A (disminueix unes 40 vegades el *binding*) i Y200^{E1}A (que ho disminueix unes 20 vegades). Com que aquest últim residu conté un grup hidroxil que no forma cap pont d'hidrogen, l'efecte observat en aquesta última mutació és degut a la pèrdua de l'energia de Van der Waals de l'empaquetament de la zona hidrofòbica d'aquest residu. Les altres dues mutacions produeixen un pèrdua de ponts d'hidrogen entre les molècules, la qual cosa significa que els ponts d'hidrogen ajuden a estabilitzar les molècules. El mateix experiment en ECD2 posa de manifest que els aminoàcids més importants en aquesta molècula són D152 i Y200.

d'unió. L'associació és controlada mitjançant difusió, la qual és independent de la composició dels residus aminoacídics. Així doncs, l'hormona troba el receptor a través d'un procés a l'atzar de ràpides col·lisions, i els residus aminoacídics ajuden a mantenir la unió un cop s'ha arribat al receptor. També es va comprovar que el 85% de l'energia d'unió al receptor la conferien 8 aminoàcids de 31 posicions estudiades (K41, L45, R64, K172, T175, F176, i R 178). Un estudi similar es va realitzar en el receptor, on es va comprovar que 9 dels 33 residus estudiats contenien virtualment tota l'afinitat a l'hormona. Aquesta afinitat es va mesurar utilitzant hGH marcat amb I¹²⁵, i estudiant el desplaçament quan s'uneix a hGHbp, i precipitant el complex amb l'anticòs Mab5. En canvi, per analitzar la cinètica de la reacció es va utilitzar l'espectroscòpia LSPR (*surface plasmon resonance*). Aquesta tecnologia consisteix en immobilitzar la hGHbp en un biosensor i estudiar els canvis en l'índex de refracció quan s'hi uneix l'hormona de creixement. Es va fer la mateixa tècnica que en l'estudi de l'hormona de creixement i es van mutar individualment tots els aminoàcids a alanina. Els aminoàcids més importants en el receptor per a la unió a l'hormona eren R43, E44, I103, W104, I105, P106, I164, D165 i W169. Les interaccions més importants són les que consisteixen en contactes hidrofòbics (on els aminoàcids W104 i W169 són els aminoàcids més importants). També s'han determinat contactes electrostàtics entre la R43 del receptor i la D171 i T175 de la hGH (Figura 13).

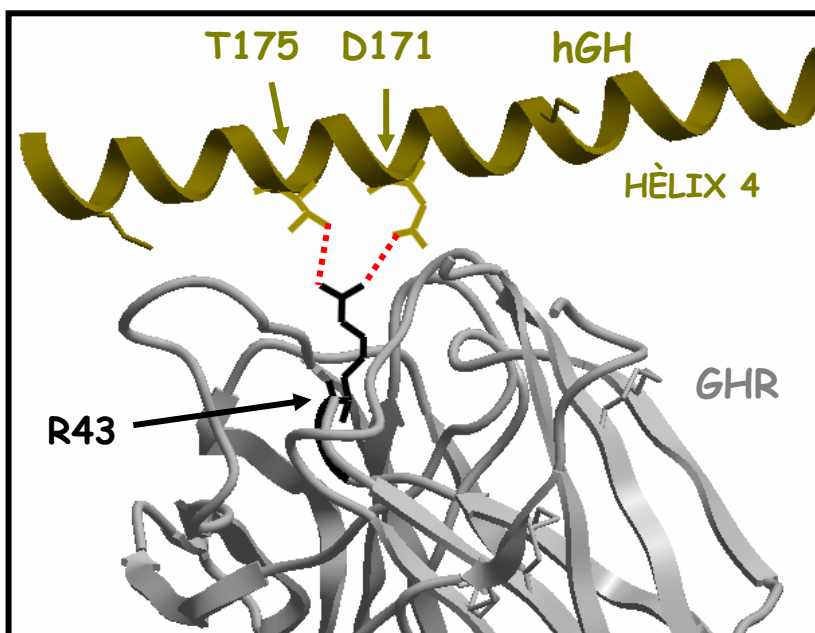


Figura 13. Representació gràfica dels aminoàcids D171 i T175 de la GH que mantenen contactes electrostàtics amb l'aminoàcid R43 del receptor (en vermell).

També hi ha contactes entre la porció alifàtica del residu R43 amb els anells indol de W169 (veure Figura 14). A més a més, el W169 forma part del *sandwich* produït

per la R43 del receptor i la R64 de hGH (Clackson i Wells, 1995). Aquest és un exemple de la importància de les interaccions alquil-aromàtiques tant intramoleculares com intermoleculares (Clackson *et al.*, 1998).

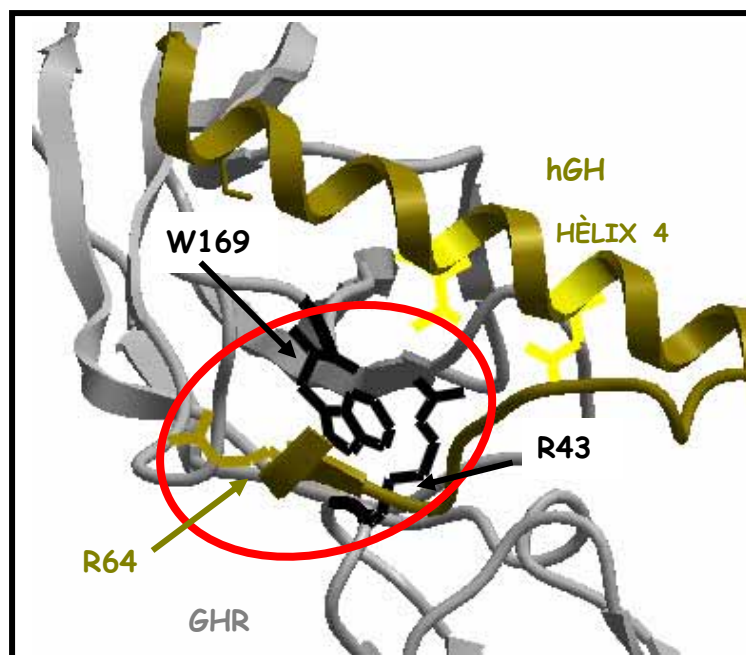


Figura 14. Sandwich format per l'aminoàcid W169 intercalat entre els residus R43 del receptor i R64 de hGH. En negre es marca el receptor i en verd la GH. En groc es mostren els aminoàcids T175 i D171.

Tornant a la seqüència del procés d'unió de l'hormona al receptor, s'ha comprovat que primer s'uneix la hGH pel lloc 1 a una molècula de receptor, la qual cosa produeix una superfície d'unió de 1350 \AA^2 , mentre que la superfície d'unió amb la hGHbp2 és de 850 \AA^2 . En canvi, si hGHbp2 s'uneix a hGH·hGHbp1, hi ha els 850 \AA^2 de la unió hGH·hGHbp2 més 500 \AA^2 de la unió hGHbp1·hGHbp2, amb la qual cosa sumen uns 1350 \AA^2 . Així doncs, primer es necessita la unió amb una molècula de receptor, i seguidament la unió a l'altra molècula de receptor. Amb això també es va concloure que no es formaven oligòmers més grans perquè el receptor utilitza virtualment el mateix lloc per unir el lloc 1 i el lloc 2 de la molècula de hGH i, conseqüentment, un receptor només pot unir una molècula d'hormona al mateix moment.

I finalment, amb tot això es pot explicar el fenomen pel qual la GH a concentracions baixes pot provocar una resposta a través del receptor, mentre que a concentracions elevades no hi ha prou molècules de receptor lliures per unir-se a l'hormona pel lloc 2 i es produeix una inhibició en el senyal.

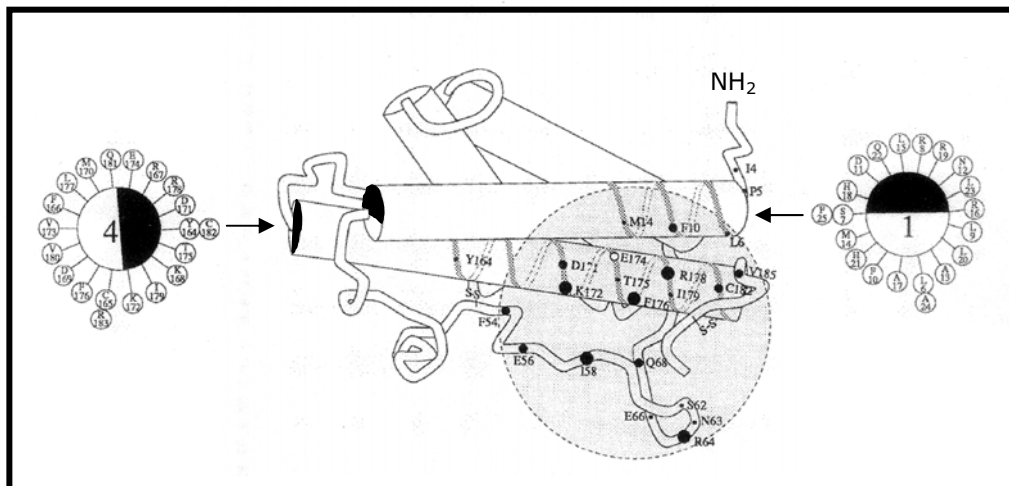


Figura 15. Model estructural de la hGH segons Cunningham *et al* 1989. Marcat amb un cercle es senyala el lloc d'unió 1 al receptor (site1). Es marquen amb cercles opacs les posicions on el canvi a alanina redueix l'afinitat per la unió al receptor ●, ●, ●, ●, (respectivament signifiquen una disminució en l'afinitat per la unió de 2 a 4 vegades, 4 a 10 vegades, 10 a 80 vegades i més de 80 vegades). En canvi, en la posició E174 que està marcada amb un cercle sense pintar quan és mutada a alanina, s'incrementa més de quatre vegades l'afinitat a la unió.

El fet que hi hagi un residu en la molècula de GH que en ser mutat a Ala (E174) incrementi la unió a hGHbp, és explicat per Cuningham and Wells, l'any 1991a, mitjançant la hipòtesi que com que aquest lloc és necessari per la unió de hGH a hPRLbp, per mantenir el doble paper de la hGH (unió a hGHR i hPRLR), l'hormona compromet aquest aminoàcid per la unió de Zinc, que és necessari per l'activació de hPRLR, ja que per a l'activació del receptor de GH no és necessari, al contrari, en redueix l'afinitat (això es dedueix a partir del fet que en mutar per Ala augmenta l'afinitat, això vol dir que l'aminoàcid Glu és menys eficient que l'Ala en aquesta posició per unir-se al GHR) (Figura 15). També queden reflectits a la Figura 15 quins són els residus que es troben a la part interior de l'hèlix i quins es troben a la part exterior de l'hèlix i per tant juguen un paper més important en la unió amb el receptor.

11. **STAT5B**

Ambrosio *et al.*, van clonar el gen STAT5B i van identificar dues variants dels trànscripats que se'n derivaven de l'expressió del gen. Aquestes seqüències només variaven en la regió no codificant de les regions promotores. La proteïna que se'n derivava tenia 787 aminoàcids, amb una regió N-terminal amb un domini d'unió a l'ADN, seguit d'una regió de 4-hèlixs *bundle*, una altra regió d'unió a l'ADN, una regió connectora, un domini SH2, i un domini C-terminal de transactivació.

La GH s'uneix a GHR, activant la tirosina kinasa JAK2, i altres proteïnes cel·lulars, incloent els membres de la família STAT (*signal transducers and activators of transcription*). La hipòtesi sobre la qual s'estudia és que quan la GH s'uneix al receptor i activa la tirosina kinasa associada al receptor (JAK2), aquesta fosforila els residus tirosil del receptor. Aquestes tirosines fosforilades, o en altres casos les tirosines fosforilades de JAK2, serveixen com a llocs d'unió per les proteïnes Stat. Aquestes proteïnes són fosforilades per Jak2 en els residus tirosil, i transloquen al nucli, on s'uneixen a l'ADN i promouen l'activació transcripcional dels gens. GH activa les proteïnes Stats 1, 3 i 5. En resposta a GH, Stat5 ha estat implicat com a factor transcripcional dels gens β -caseïna, Spi2.1, P450-3A10A/6 β -hidroxilasa, i insulina-1 (Smit *et al.* 1997; Galsgaard *et al.*, 1996).

Estudis amb ratolins han demostrat que els animals *knock-out* per Stat5a i Stat5b moren en néixer o abans de fer-ho (Snow *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2006).

També s'ha estudiat el cas d'un pacient descrit per Kofoed *et al.*, l'any 2004 el qual tenia les característiques clíniques i bioquímiques d'insensibilitat a la GH, però que tenia el gen GHR normal, i en canvi tenia una mutació en homozigosi (A630P) en el gen STAT5B. Aquest pacient tenia una combinació de fenotips. Tenia insensibilitat a la GH i immunodeficiència, consistent en un defecte en el sistema JAK/STAT.

Per tant, estudiar l'expressió de Stat5B serà útil per estudiar la bioactivitat de les proteïnes recombinants.

12. **IGF1**

L'IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) és un pèptid de 70 aminoàcids, amb un pes molecular d'uns 7,6 kDa (Rinderknecht and Humbel, 1978). L'IGF1 forma part de la família de les somatomedines o IGFs, i són una família de pèptids que juguen un paper important en el creixement i desenvolupament dels mamífers. Hi ha dos IGFs: l'IGF1 i l'IGF2 (Rotwein, 1986; Rosenfeld, 2003).

Rotwein *et al.* en utilitzar un sonda oligonucleotídica sintètica per fer un screening en una llibreria de cDNA de fetge humà, van trobar dos cDNA que codificaven per 2 precursors de proteïna IGF1. Tenien 153 i 195 aminoàcids, i els van anomenar

IGF1A i IGF1B, respectivament. Aquests autors van concloure que els dos ARN missatgers d'IGF1 resultaven del processament alternatiu d'un únic gen. El gen IGF1 té 5 exons. Els exons de l'1 al 4 codifiquen per l'IGF1B, i els exons 1,2,3 i 5 codifiquen per l'IGF1A.

Quan l'IGF1 es troba en circulació, aquest està predominantment unit a les IGFBPs, les quals prolonguen la vida mitja dels IGFs, i a més a més tenen un paper important a l'hora de distribuir les molècules pels diferents teixits. L'òrgan productor d'IGF1 per excel·lència és el fetge (fins el 75% de la producció Sjögren *et al.*, 1999; Yakar *et al.*, 1999), però la GH també indueix l'expressió d'IGF1 en altres teixits com els condrocits del cartílag de creixement.

Els ratolins *knock-out* en IGF1 tenen un retard important en el creixement esquelètic així com també defectes en el desenvolupament neuronal, indicant que l'IGF1 podria tenir un paper específic en el creixement axonal i en la mielinització (Ye *et al.*, 2002). A més a més, la mortalitat neonatal és important, indicant que el defecte d'IGF1 pot ser letal inclús en humans (Liu *et al.*, 1993). El pacient humà descrit per Woods *et al.*, l'any 1996 amb una deleció parcial del gen IGF1 presentava no solament un retard intrauterí i postnatal del creixement sinó també sordesa nerviosa i altres defectes del desenvolupament neuronal.

Així doncs, és molt útil estudiar l'expressió d'aquest gen per avaluar la bioactivitat de les proteïnes hGH recombinants produïdes al laboratori.

13. IGF1R

Aquesta molècula és una proteïna de 1367 aminoàcids incloent un pèptid senyal de 30 aminoàcids (Ullrich *et al.*, 1986). L'estructura de l'IGF1R és molt similar a la del receptor d'insulina, i a nivell d'aminoàcids comparteixen un 60% d'homologia (Le Roith *et al.*, 2001).

És un receptor transmembrana i s'activa per IGFI i IGF-II. Pertany a la família dels receptors tirosin kinasa.

Un cop s'ha estimulat aquest receptor, s'activen molts senyals cel·lulars que, en conjunt, produeixen senyals que disminueixen l'apoptosi cel·lular i, en canvi, augmenten la proliferació cel·lular (Le Roith *et al.*, 2001).

Estudis realitzats per Liu *et al.*, l'any 1993, on produeixen ratolins deficientes en IGF1R, mostren que aquests ratolins que no contenen cap còpia del gen IGF1R en els seus al·lels, moren en néixer de fallida respiratòria, i tenen una deficiència severa de creixement (aproximadament el 45% de la talla normal).

14. ESTUDI D'UN POLIMORFISME DEL RECEPTOR DE GHR: deleció de l'exó 3

El polimorfisme d3/fl-GHR [aquest polimorfisme consisteix en la deleció o inclusió de l'exó 3 en l'ADN d'un individu (Pantel *et al.*, 2000; Urbanek *et al.*, 1992)] s'ha relacionat recentment amb l'intensitat de la resposta a la teràpia amb GH exògena, tot i que alguns estudis han mostrat una associació significativa (Dos Santos *et al.* 2004; Jorge AA *et al.*, 2002, Binder *et al.*, 2006) mentre que d'altres no (Carrascosa *et al.*, 2006; Pilotta *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 2006).

L'únic estudi *in vitro* que ha analitzat la bioactivitat de la GH en funció dels genotips per al polimorfisme d3/fl-GHR ha estat el treball de Dos Santos *et al.*, l'any 2004 realitzat en fibroblasts (línia HEK293) transfectats amb les isoformes d3-GHR i fl-GHR: els cultius de cèl·lules contenen la isoforma d3-GHR presenten una major resposta a la GH per a activar el gen luciferasa. Malauradament aquest resultat no ha estat per ara confirmat per cap altre estudi realitzat en cèl·lules humanes en funció dels genotips de GHR.

Per això és d'interès estudiar aquest polimorfisme del gen del receptor de GHR en cultius de cèl·lules humanes per veure si el patró de polimorfismes d'aquest gen té alguna implicació en la resposta a la GH.

15. ESTUDI DELS ELEMENTS DE RESPOSTA EN REGIONS PROMOTORES DELS GENS EN ESTUDI

Per tal d'analitzar els resultats dels experiments *in vitro* realitzats amb les proteïnes recombinants que contenen canvis en la seqüència d'aminoàcids, es mesura l'expressió dels gens GHR, IGF1R, STAT5B i IGF1 en presència o absència de Vitamina D combinat amb les hormones de creixement recombinants o bé comercial. És interessant estudiar els promotors d'aquests gens estudiats, per veure si realment contenen elements de resposta que puguin ser útils per entendre els resultats obtinguts. Així doncs, s'utilitza el programa MatInspector. La pàgina web on es troba és la següent: <http://www.genomatix.de/matinspector.html> (Quandt *et al.*, 1995; Cartharius *et al.*, 2005).

Aquest programa i altres programes permeten predir el potencial d'una seqüència per unir un factor de transcripció, però no poden predir la funcionalitat del lloc d'unió. La funcionalitat d'un lloc d'unió només pot ser predita mitjançant tècniques de laboratori, ja que aquests programes informàtics són aproximacions teòriques.

OBJECTIUS

Objectiu general

Analitzar entre la població de pacients amb retard crònic de creixement si existeixen anomalies en la seqüència del gen GH1 i dintre de les anomalies detectades, analitzar les degudes a canvi d'aminoàcid en la molècula de GH.

Objectius concrets

1. Establir el mapa de SNPs en el gen GH1 en la població control amb talla adulta compresa entre -2 SDS i +2 SDS.
2. Seqüenciar el gen GH1 en dues poblacions de pacients amb retard crònic de creixement i detectar possibles mutacions que prediguin canvi d'aminoàcid:
a) pacients de l'Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron amb retard de creixement, deficiència de secreció de GH i/o resposta adequada al tractament amb GH i b) pacients amb retard intrauterí del creixement (RIUC), talla baixa i sense deficiència de secreció de GH.
3. Posar a punt la metodologia per a l'anàlisi dels trànscrips de GH1 expressats en leucòcits de sang venosa perifèrica i descriure els patrons en controls normals i en pacients seleccionats.
4. Realitzar l'estudi informàtic de l'efecte dels canvis d'aminoàcid detectats en pacients sobre l'estructura de la proteïna GH i la seva interacció amb el receptor de GH (GHR).
5. Posar a punt la tecnologia per a l'obtenció de proteïnes recombinants i obtenció de GH normal i mutants d'aminoàcid.
6. Posada a punt de models *in vitro* per a l'estudi de la bioactivitat de les GH recombinants i anàlisi de la bioactivitat de GH normal i mutants.
7. Analitzar l'interrelació entre els resultats dels estudis *in vitro* i els fenotips dels pacients.

SUBJECTES I MÈTODES

1. CARACTERITZACIÓ DELS POLIMORFISMES DEL GEN GH1 D'UNA POBLACIÓ DE CONTROLS AMB TALLA NORMAL I SEQÜENCIACIÓ DEL GEN GH1 EN UNA POBLACIÓ DE PACIENTS AMB RETARD CRÒNIC DEL CREIXEMENT, DEFICIÈNCIA DE GH I/O RESPOSTA ADEQUADA AL TRACTAMENT AMB GH I EN UNA POBLACIÓ DE NENS AMB RETARD DE CREIXEMENT INTRAUTERÍ I TALLA BAIXA

Part d'aquest treball ha consistit en caracteritzar el patró de polimorfismes a la nostra població no només del promotor del gen, sinó que també de la resta del gen. Per fer això s'ha buscat un grup control de persones amb fenotip normal per a la talla i s'ha analitzat el gen GH1.

1.1 Subjectes

1.2.1 Controls

La població control consta de 307 persones (164 dones i 143 homes) que tenen una talla adulta compresa entre -2 SDS i 2 SDS respecte la talla mitja corresponent al seu sexe en la nostra població (Esteban *et al.*, 2006). A aquestes persones se'ls van extreure 3 ml de sang (en un tub que contenia EDTA). La sang va ser emmagatzemada a -20°C, i es va analitzar en el transcurs dels mesos posteriors. En tots els casos es va obtenir el consentiment informat. El protocol va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Vall d'Hebron i forma part del Projecte FIS PI 020803/2002 "Caracterización molecular del gen GH1 en pacientes con déficit aislado idiopático de GH y en pacientes con retraso crónico de crecimiento y buena respuesta al tratamiento con GH exógena".

1.2.2 Pacients de l'Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron

S'ha seqüenciat el gen GH1 en 475 pacients índex amb retard de creixement, deficiència de secreció de GH i/o resposta adequada al tractament amb GH. El protocol va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Vall d'Hebron i forma part del Projecte FIS PI 020803/2002 "Caracterización molecular del gen GH1 en pacientes con déficit aislado idiopático de GH y en pacientes con retraso crónico de crecimiento y buena respuesta al tratamiento con GH exógena".

1.2.3 Pacients amb retard intrauterí del creixement (RIUC), talla baixa i sense deficiència de secreció de GH

En el marc de l'Assaig Clínic multicèntric d'àmbit nacional amb número de Registre 56/2001 "Estudio de eficacia y seguridad de Genotonorm® en pacientes de talla

baja con antecedentes de retraso de crecimiento intrauterino (RIUC). Evaluación genético-molecular y bioquímico-hormonal”, es va seqüenciar el gen GH1 en 253 pacients que amb l'antecedent de RIUC, tenien talla inferior a -2 SDS i en un test de secreció de GH no eren deficitaris.

1.2 Aïllament de l'ADN

Per fer l'extracció de l'ADN (àcid desoxiribonucleic) de sang congelada s'utilitza un mètode basat en un lisat inicial dels eritròcits deixant intactes els leucòcits, un segon lisat i finalment la solubilització dels leucòcits i els seus nuclis. Seguidament es fa una digestió amb RNAsa, després es precipiten les proteïnes cel·lulars mitjançant una precipitació amb sal i finalment l'ADN és concentrat i dessalat mitjançant una precipitació amb isopropanol. S'utilitza *el Wizard® DNA Purification Kit* de Promega.

1.3 Amplificació del gen GH1 a partir de l'ADN genòmic

S'amplifica el gen de l'hormona de creixement (GH1) mitjançant la tecnologia *nested-PCR*. Primer s'amplifica el gen sencer, i després cinc reaccions que amplifiquen el gen en 5 parts que se solapen parcialment. S'obtenen fragments de tamany apropiat per aplicar una seqüenciació automàtica sense purificació prèvia. Degut a l'alta homologia del gen GH1 amb els altres quatre gens del clúster, és difícil dissenyar encebadors per amplificar el gen d'interès sense l'interferència dels altres quatre. És per això que es decideix utilitzar la tècnica de *nested-PCR* per amplificar aquesta regió amb més especificitat que no pas es faria amb una reacció de PCR normal. D'aquesta manera s'enriqueix la mostra en el segment d'ADN genòmic que conté GH1, i el producte de la primera amplificació serveix per realitzar les reaccions *nested*. Finalment es procedeix a seqüenciar el gen sencer per analitzar tota la seqüència nucleotídica.

1.3.1 Primera reacció de PCR

La PCR va ser desenvolupada per Kary Mullis a mitjans dels anys 80. Amb aquesta tècnica tan revolucionària en el seu moment, el que s'aconsegueix és produir moltes còpies d'una seqüència específica que procedeix d'una barreja d'ADN sense haver de clonar. Així doncs, s'obté l'amplificació selectiva de les seqüències d'ADN. El punt de partida d'una PCR és tenir un ADN motlle que conté la seqüència d'ADN a ser amplificada i un parell d'encebadors (seqüència d'oligonucleòtids anomenats encebadors) que flanquegen la seqüència d'ADN d'interès.

El procediment general per fer una reacció de PCR consisteix en la repetició de cicles que es divideixen en les següents etapes:

1. Desnaturalització de l'ADN a cadenes simples: mitjançant una incubació a 94°C.
2. Hibridació dels encebadors específics que flanquegen la seqüència d'ADN a ser amplificada; la temperatura depèn de la seqüència dels encebadors.
3. Extensió de la cadena còpia: a partir dels encebadors amb l'enzim DNA polimerasa.
4. Aquest procés es repeteix el número de cicles que interressi i finalment hi ha una etapa d'extensió final a 72°C.

La primera PCR (on s'utilitza com a motlle l'ADN genòmic) es va fer del gen sencer, i s'utilitzà el sistema XLTaq (*rTth ADN Polymerase*) de Applied Biosystems.

S'utilitzà aquesta Taq, ja que s'havia d'amplificar un producte molt llarg (1650 nucleòtids). La rTth DNA Polimerasa, (XL extra long), és una polimerasa ultra pura, i termoestable. Està especialment formulada per donar grans quantitats de dos tipus d'activitat: la 5'-3' ADN polimerasa i la 3'-5' exonucleasa (proofreading). Permet aconseguir un increment en la fidelitat, la qual cosa és important per a la detecció de mutacions i polimorfismes, i una millor proporció de productes de PCR llargs. Utilitza un tampó que conté tampó tricina, acetat de potassi, glicerol i DMSO. Es comprova el resultat en un gel d'agarosa.

Els components de la mescla de reacció estan indicats a la Taula 4:

Components	Concentració Final
ADN genòmic	50 ng d'ADN
Tampó 3.3X XL Buffer II	3 µl
Mg(OAc) ₂ 25mM	0,9 mM
Encebador sentit 100 µM	0,27 µM
Encebador antisentit 100 µM	0,27 µM
rTth ADN Polimerasa 2 U/µl	0,4 U
GeneAmp 10 mM dNTP Blend	0,54 mM
H ₂ O	5,5 µl
Volum Total	11 µl

Taula 4. Components utilitzats a la reacció de PCR i concentració final de la mescla de reacció.

Els encebadors utilitzats per la primera reacció de PCR es troben indicats a la Taula 5:

Nom	Sentit/antisentit	Localització al GenBank (GI:183148)
1s	sentit	4156-5'-ACGGTCCGCCACTACGCCAGC -3'
1a	antisentit	6948-5'-TGCAGTGAGCCAAGATTGTGCC -3'

Taula 5. Encebadors dissenyats utilitzant el número d'accés del GenBank (GI:183148). El número davant la seqüència nucleotídica de l'encebador correspon al número de localització dins el GI 183148.

Tots els encebadors utilitzats en aquest projecte són oligonucleòtids liofilitzats i purificats mitjançant HPLC de la casa comercial ROCHE.

El programa de cicles de temps/temperatures dissenyat per a fer aquesta reacció al termociclador GeneAmp PCR System 2700 d'Applied Biosystems és el següent (Taula 6):

40 CICLES			
DESNATURALITZACIÓ	DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ I EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
5 min 94°C	1 min 94°C	3 min 30 seg 72°C	7 min 72°C

Taula 6. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR.

1.3.2 Segona reacció de PCR (Nested PCR)

La primera reacció de PCR amplifica el segment desitjat amb alta especificitat però baix rendiment. La segona reacció de PCR dona fragments abundants per a poder seqüenciar sense haver de purificar.

Per fer les cinc reaccions *nested*, s'utilitzà la taq Polimerasa de ECOTAQ (Ecogen). Aquest sistema utilitza una Taq polimerasa i utilitza un tampó que conté (NH₄)₂SO₄ 160 mM; TRIS-HCl 670 mM (pH 8,8 a 25°C); 0,1% Tween-20.

Es comprova el resultat en gel d'agarosa.

A les Taules 7 i 8 es mostren els components utilitzats per a fer les reaccions de PCR així com els encebadors dissenyats:

Components	Concentració Final
Producte de la 1 ^a amplificació	0,5 µl de la reacció anterior
Tampó 10X	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM
Encebador sentit 100 µM	0,3 mM
Encebador antisentit 100 µM	0,3 mM
Taq (5U/µl)	0,4 U
dNTPs (100 mM)	0,2 mM
H ₂ O	16 µl
Volum Total	20 µl

Taula 7. Components utilitzats a la 2^a reacció de PCR i concentració final de la mescla de reacció.

Nom	Sentit/antisentit	Localització al GenBank (GI:183148)
A	sentit	4573-5'-AAGGGGAGAGCAAAGTGTGG-3'
N	antisentit	5068- 5'-TGACGGGCTTGTGCTAAT-3'
B	sentit	4983- 5'-GGGAAGGGAAAGATGACAAG-3'
L	antisentit	5583-5'-GGATAAGGGAATGGTTGG-3'
C	sentit	5469-5'-TCTGTTGCCCTCTGGTTTC-3'
K	antisentit	6157- 5'- GGCGAAGACACTCCTGAG-3'
D	sentit	5843- 5'-TGGTGGGCGGTCCTTCTC-3'
I	antisentit	6601- 5'-AGCCCGTAGTTCTTGAGTAG-3'
F	sentit	6229- 5'-AACGCTGATGGGGGTGAGG-3'
P	antisentit	6948-5'-TGCAGTGAGCCAAGATTGTGCC -3'

Taula 8. Encebadors utilitzats per amplificar el gen GH1. Es va utilitzar la seqüència introduïda per Chen *et al* amb número d'accés al GI:183148 ([*Human growth hormone (GH-1 and GH-2) and chorionic somatomammotropin (CS-1, CS-2 and CS-5) genes, complete cds gi|183148|gb|J03071.1|HUMGHCSA[183148]*]). El número davant la seqüència nucleotídica correspon a la localització al GenBank (GI183148). Es tracta de la seqüència nucleotídica dels 5 gens del tàndem, que permet localitzar els encebadors per amplificar el gen GH1 sense que s'amplifiquin els altres gens del tàndem.

A la Figura 16 es mostra la seqüència de referència del gen GH1 i la localització dels encebadors utilitzats per fer les reaccions de PCR.

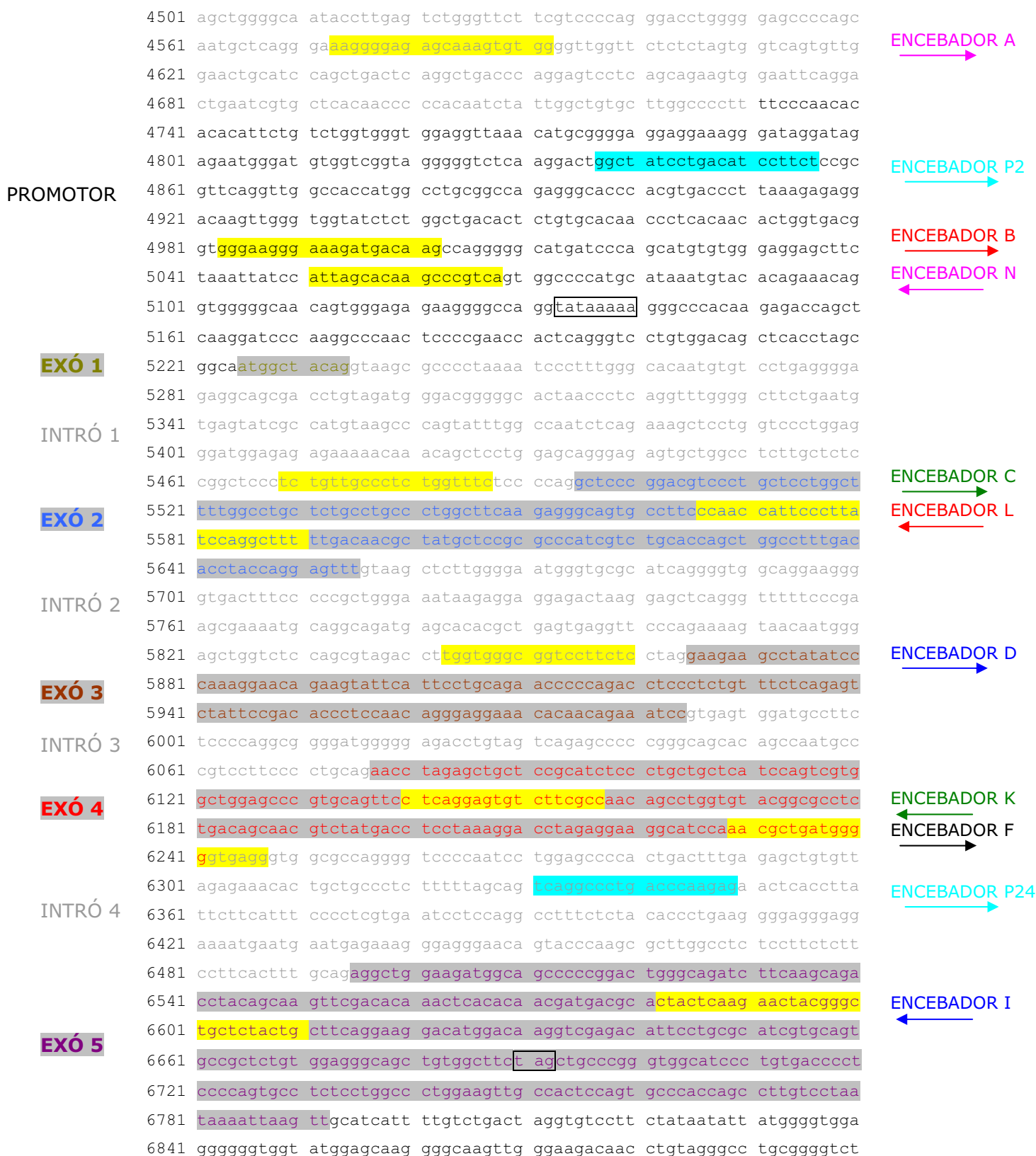


Figura 16. Seqüència nucleotídica del gen GH1 introduït al GenBank amb un número d'accés 183148. Subratllat de diferents colors es troben els exons. En groc, s'han assenyalat les seqüències on anellen el encebadors utilitzats per a les reaccions de PCR.

El programa de temps i temperatures està indicat a la Taula 9:

40 CICLES				
DESNATURALITZACIÓ	DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	EXTENSIÓ	EXENSIÓ FINAL
5 min 94°C	1 min 94°C	30 seg 58°C	1 min 72°C	7 min 72°C

Taula 9. Cicle de temps i temperatures per dur a terme la 2^a reacció de PCR.

1.4 Separació dels productes obtinguts per electroforesi en gels d'agarosa

Es fan servir gels d'agarosa comercials al 1,2% per visualitzar els productes de la PCR i assegurar que el tamany de les bandes corresponen a l'esperat.

Els gels d'agarosa s'utilitzen quan el tamany del trànscrip és gran, el poder de separació és inferior al dels gels de poliacrilamida, però en canvi, tenen un rang de separació més gran (va dels 200 pb als 50 kb). S'aplica un voltatge de 120V durant 10 min. Vam utilitzar el sistema *Ready-To-Run* (Amersham Pharmacia Biotec).

Aquests gels contenen 0,5 µg/ml de Bromur d'Etidi, que serveix com a mètode de visualització dels productes quan s'exposen a una font de llum ultravioleta en un transiluminador.

1.5 Seqüenciació

Es va realitzar en un seqüenciador automàtic (ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer d'Applied Biosystems). El sistema utilitzat va ser el *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* d'Applied Biosystems.

La seqüenciació de l'ADN es basa en que la DNA polimerasa pot incorporar anàlegs de les bases nucleotídiques a la cadena d'ADN. El mètode dels dideoxi (desenvolupat per Sanger *et al.*, 1977) utilitza com a substrats els 2',3'-dideoxinucleotids. Quan un dideoxinucleòtid és incorporat a l'extrem 3' de la cadena que s'està sintetitzant, l'elongació s'acaba selectivament a les A (adenina), C (citosina), G (guanina) o T (timina), segons quin sigui el dideoxinucleòtid que s'hagi incorporat, perquè a la cadena li manca el grup 3'-hidroxil, i no pot seguir creixent.

El mètode utilitzat és el marcatge dels terminadors amb un color diferent i fluorescent. Així cada terminador emet una ona de longitud diferent quan és excitada per un làser.

1.5.1 Seqüenciació cíclica

Es tracta de fer successives rondes de desnaturalització, hibridació i extensió en un termociclador. El resultat és un producte lineal. Cada cop que per atzar s'afegeix un terminador (un dideoxinucleòtid), es para la reacció d'amplificació i es torna a començar (Figura 17). D'aquesta manera, al final es tindran tots els tamanys que hi hagi (tants com nucleòtids tingui el producte que es vulgui seqüenciar). Seguidament s'injecten els productes en una electroforesi capil·lar i es separen per tamany.

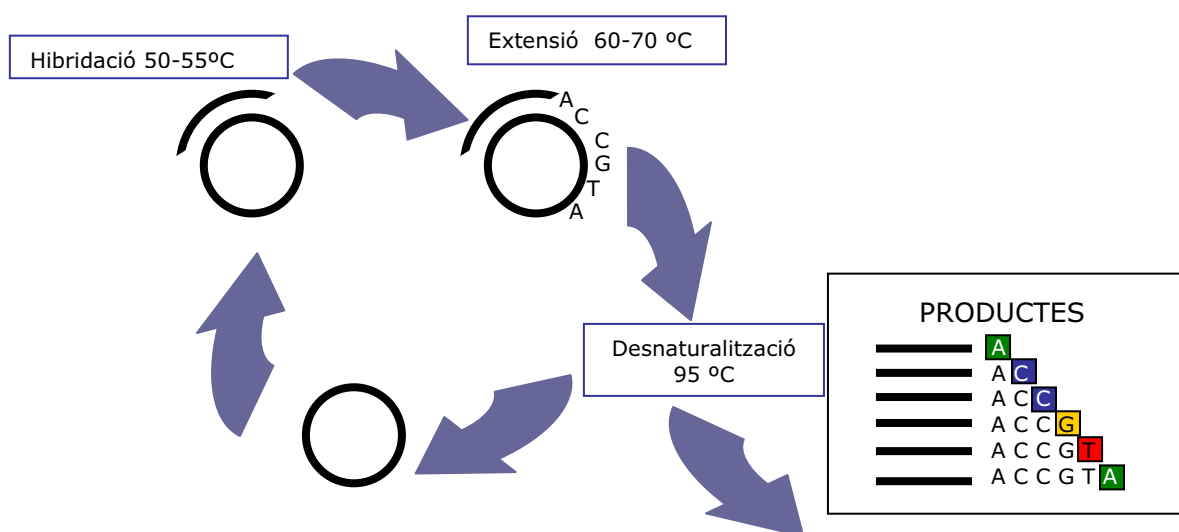


Figura 17. Representació esquemàtica del procés de seqüenciació automàtica.

L'enzim utilitzat per a la seqüenciació és l'AmpliTa^q® DNA polimerasa FS. Aquest enzim és una mutant de la *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerasa. Aquest canvi resulta en una menor discriminació dels dideoxinucleòtids de manera que encara hi ha una major intensitat de pic a l'electroforesi.

Aquesta Taq també té una mutació puntual a l'extrem amino terminal, que fa que no tingui activitat 5'-3' nucleasa. Això elimina artefactes produïts per l'activitat exonucleasa.

Els terminadors utilitzats (Big Dye d'Applied Biosystems) per fer les reaccions de seqüència tenen una estructura que consta d'un terminador que conté un donador de fluoresceïna, lligat a un dels quatre terminadors amb diclororodamina (dRodamina) i que són acceptors. La longitud d'ona d'excitació correspon a la de cada donador de fluoresceïna, mentre que l'espectre d'emissió correspon a la de l'acceptor que conté dRodamina. El terminador donador és optimitzat per absorbir

l'energia d'excitació que exerceixen els ions d'argó del làser que té el seqüenciador d'ADN. A la Taula 10 es mostra la relació de terminadors utilitzats:

Terminador	Acceptor Dye
A	Dicloro[R6G]
C	Dicloro[ROX]
G	Dicloro[R110]
T	Dicloro[TAMRA]

Taula 10. Terminadors utilitzats per a la seqüenciació automàtica, marcats amb els acceptors amb dRodamina.

La reacció de seqüència es va dur a terme segons les proporcions indicades a la Taula 11:

Component	Concentració	Volum
Ready Reaction Premix	2,5X	4 µl
BigDye Sequencing Buffer	5X	2 µl
Encebador	3,2 pmol	0,2 µl
ADN		1 µl
Aigua		13 µl
Volum total	1X	20 µl

Taula 11. Components utilitzats a la reacció de seqüència i concentració final de la mescla de reacció.

El programa de cicles de temps/temperatures dissenyat per a fer aquesta reacció és el següent (Taula 12):

25 CICLES				
2 min 94°C	10 seg 96°C	5 seg 50°C	4 min 60°C	4°C ∞

Taula 12. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR per a la seqüenciació.

1.5.2 Purificació dels productes de seqüenciació: mètode de precipitació en presència de sals

Feta la reacció de seqüència, es procedeix a la purificació de l'ADN:

1. Precipitació i eliminació dels terminadors. Als 20 µl de reacció s'afegeix 62,5 µl d'etanol al 100%, 14,5 µl d'aigua i 3 µl d'acetat de sodi 3M.
2. Incubació de 15 min.
3. Es centrifuga durant 20 min a 17000 x g.
4. Rentat del primer alcohol. S'afegeix 180 µl d'Etanol al 70%.
5. Es centrifuga durant 5 min a 17000 x g.
6. Es resuspèn en 20 µl de formamida (Applied Biosystems), que és el vehicle utilitzat per realitzar l'electroforesi capilar al seqüenciador ABI PRISM 3100.
7. Es desnaturalitza a 95°C durant 3 min i es deixa durant uns quants minuts en gel.

1.5.3 Detecció de canvis en la seqüència de nucleòtids

Un cop obtinguda la seqüència de nucleòtids, s'analitza informàticament mitjançant la secció BLAST del NCBI. Així es fa un alineament de la seqüència obtinguda amb la seqüència patró amb GI 183148.

Posteriorment, es fa una inspecció visual amb almenys dues persones revisant els canvis trobats respecte la seqüència patró. També es va utilitzar el programa informàtic *SeqScape d'Applied Biosystems* per analitzar automàticament les seqüències obtingudes.

2. AMPLIFICACIÓ D'ARN missatger DE GH1

2.1. Subjectes

La població control consta de 25 persones que tenen una talla adulta compresa entre -2 SDS i 2 SDS respecte la talla mitja corresponent al seu sexe.

Els pacients són nens i nenes d'edats diverses que han consultat per retràs de creixement (talla inferior a -2 SDS, velocitat de creixement disminuïda) i que han respost adequadament al tractament amb GH exògena.

2.2. Aïllament d'ARN

Les mostres utilitzades per fer aquest treball procedeixen de sang venosa perifèrica recollides en tubs de vidre amb EDTA i processades immediatament.

Per extreure l'ARN de les mostres de sang el primer que es fa és aïllar els leucòcits.

2.2.1 Aïllament de leucòcits a partir de sang fresca

L'aïllament es fa mitjançant una separació per gradient de densitat amb Lymphoprep (GIBCO), segons les instruccions del fabricant.

2.2.2 Extracció d'ARN total

Per extreure l'ARN total dels leucòcits de sang perifèrica es fa servir un mètode basat en l'extracció amb isotiocianat de guanidini combinat amb un mètode de purificació amb membrana de silica-gel. Es fa amb el sistema *RNeasy Mini* kit dissenyat per *Qiagen*.

Un cop s'han aïllat els leucòcits de sang perifèrica es procedeix a lisar-los amb el primer tampó que conté l'isotiocianat de guanidini, i aleshores es procedeix a la resta de l'extracció o es guarda a -20°C si no es processen les mostres aquell mateix dia. Aquest sistema recomana el tractament amb DNAsa per eliminar qualsevol traça d'ADN que pogués quedar a les mostres. Es segueixen les instruccions que recomana el proveïdor. L'ARN s'emmagatzema a -20°C.

2.3. Amplificació de l'ARNm mitjançant la tècnica de RT (Retrotranscripció) i posterior reacció de PCR

2.3.1 Retrotranscripció

La retrotranscripció es va fer amb el sistema de la *TaqMan ReverseTranscription Reagents (Applied Biosystems)*. Aquest sistema conté la *MultiScribe™ Reverse Transcriptasa* per la síntesi de la primera cadena de cADN.

Les quantitats que s'utilitzen són les indicades a la Taula 13:

Mescla	1X		Concentració final
10 X TaqMAN Buffer	10 µl		1X
25 mM MgCl ₂	22 µl		5,5 mM
dNTPs	20 µl		500 µM de cada dNTP
Random Hexamers	5 µl		2,5 µM
ARNsa Inhibitor	2 µl		0,4 U/µl
MultiScribe ReverseTranscriptase (50U/ µl)	2,5 µl		1,25 U/ µl
H ₂ O	19,25 µl	-	
ARN	19,25 µl	38,5 µl	
Volum Total	100 µl		

Taula 13. Components utilitzats a la reacció de retrotranscripció de l'ARN missatger i concentració final de la mescla de reacció.

Els *Random Hexamers* són oligonucleòtids de seqüència aleatòria (d(N)₆) que anellen aleatòriament a l'ARN.

A la Taula 14 es mostra el cicle de temperatures necessari per dur a terme la retrotranscripció:

10 min 25°C	30 min 48°C	5 min 95°C	4°C ∞
-------------	-------------	------------	-------

Taula 14. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la retrotranscripció de l'ARN missatger.

Un cop ja s'ha retrotranscrit l'ARN a cDNA, es fa és la reacció *nested-PCR*:

2.3.2 Reaccions de PCR**1ª PCR**

Els components de la primera PCR són els indicats a la Taula 15:

Components	Concentració Final
Tampó 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,48 mM
Encebador sentit 10 µM	0,2 µM
Encebador antisentit 10 µM	0,2 µM
Taq polimerasa 5 U/µl	0,044 U/µl
dNTPs 100 mM	0,22 mM
Mostra	9 µl de la reacció anterior
H ₂ O	9,5 µl
Volum Total	22,5 µl

Taula 15. Components utilitzats a la 1ª reacció de PCR i concentració final de la mescla de reacció. S'utilitza el sistema *EcoTaq* de la casa comercial ECOGEN.

I el programa de temps i temperatures és el següent (Taula 16):

40 CICLES			
DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
1 min 94°C	1 min 60°C	1 min 72°C	7 min 72°C

Taula 16. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la 1ª reacció de PCR.

2ª PCR

Els components de la segona PCR són els indicats a la Taula 17:

Components	Concentració Final
Tampó 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,48 mM
Encebador sentit 10 µM	0,2 µM
Encebador antisentit 10 µM	0,2 µM
Taq polimerasa 5 U/µl	0,044 U/µl
dNTPs 100 mM	0,22 mM
Mostra	0,1 µl de la reacció anterior
H ₂ O	18,38 µl
Volum Total	22,5 µl

Taula 17. Taula dels components utilitzats a la 2ª reacció de PCR i concentració final de la mescla de reacció. S'utilitza el sistema *EcoTaq* de la casa comercial ECOGEN.

El programa de temps i temperatures (Taula 18):

40 CICLES			
DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
1 min 94°C	1 min 60°C	1 min 72°C	7 min 72°C

Taula 18. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la 2ª reacció de PCR.

A la figura 18 hi ha una representació gràfica del procés de RT i posterior reacció de PCR:

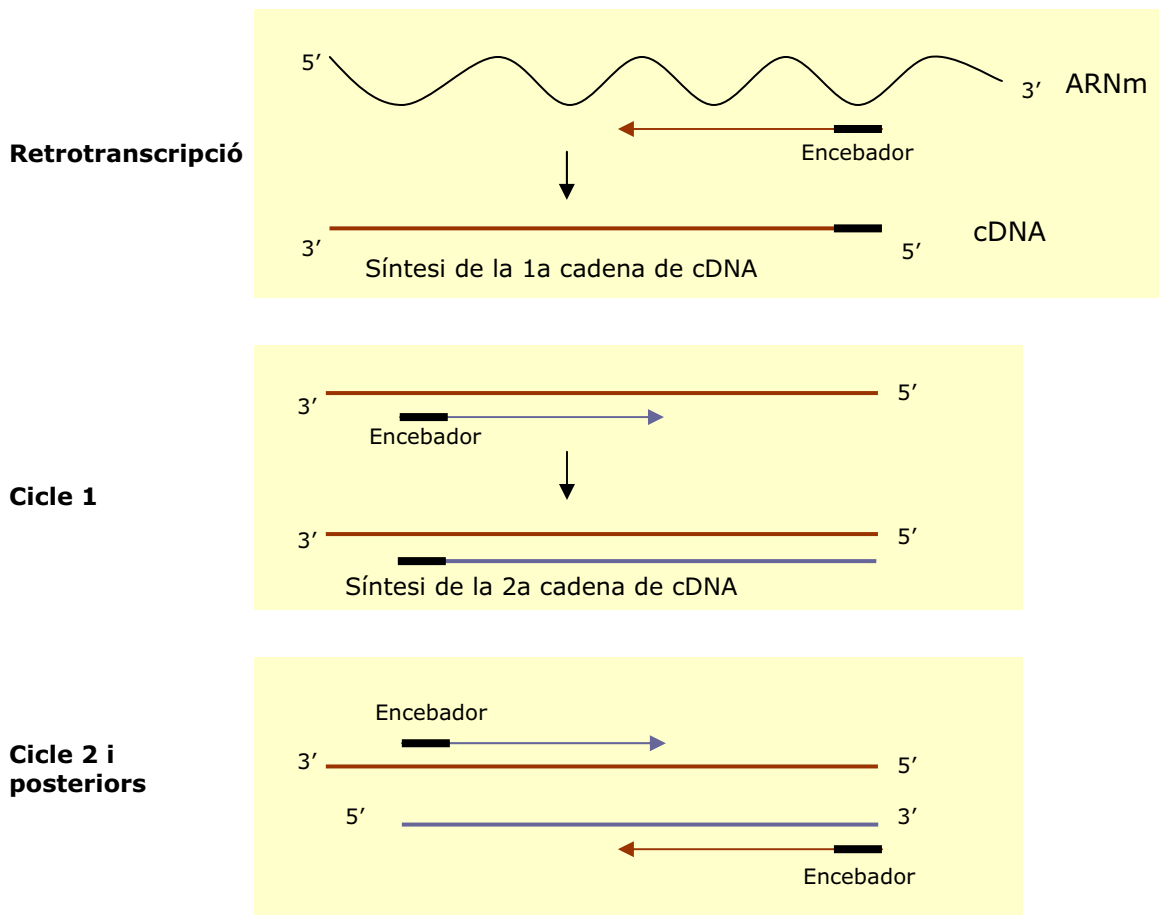


Figura 18. Representació esquemàtica del procés de RT-PCR per a l'amplificació de l'ARN missatger.

Aquest treball a l'inici es va basar en el treball realitzat per Binder i Ranke (1995), on aquests autors amplificaven l'ARNm de GH1 en sang perifèrica de 10 nens que tenien IGHD. La finalitat d'aquest treball era detectar mutacions en llocs d'*splicing*. Per fer-ho van dissenyar uns encebadors que amplificaven la variant 1 d'ARNm de GH1, i que al mateix temps també amplificava altres variants de GH1. Així doncs, el nostre treball va començar utilitzant aquests encebadors que ja estaven descrits a la literatura.

Encebadors1^a Amplificació

Els que ja estan descrits per Binder i Ranke, 1995 són (Taula 19):

mGH 1S	5' ACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGG 3'
mGH 1A	5' GCCCGTAGTTCTTGAGTAGTGCG 3'

Taula 19. Encebadors utilitzats per amplificar els trànscrips de GH1 que ja estan descrits a la literatura per Binder *et al.* 1995.

Aquests encebadors hibriden a l'exó 2 (mGH 1S) i a l'exó 5 (mGH 1A). D'aquesta manera no es pot veure el processament de l'intró 1. Com que nosaltres volíem estudiar el processament del gen complet vam decidir dissenyar uns encebadors que hibridessin a l'exó 1.

Els encebadors que hem dissenyat nosaltres estan indicats a la Taula 20:

mGH 3S	5' CTCAGGGTCCTGTGGACAG 3'
mGH 3A	5' ATTAGGACAAGGCTGGTGG 3'

Taula 20. Encebadors dissenyats al nostre laboratori utilitzats per fer la primera amplificació dels trànscrips de GH1.

Aquests encebadors hibriden a l'exó 1 (mGH 3S) i a l'exó 5 (mGH 3A). D'aquesta manera es pot estudiar tot l'ARNm complet, i es poden estudiar tots els processaments alternatius que es produeixin.

2^a Amplificació

Els encebadors que ja estan descrits a la literatura (Binder i Ranke 1995) són els indicats a la Taula 21:

mGH 2S	5' GCAGTGCCTTCCCAACCATTCCC 3'
mGH 2A	5' TGAGTTTGTGTCGAACTTGC 3'

Taula 21. Encebadors descrits per Binder *et al.*, 1995 utilitzats per fer la *nested*-PCR d'ARN missatger de GH1.

Aquests encebadors hibriden a l'exó 2 i al 5.

Els encebadors que hem dissenyat nosaltres per a la segona amplificació són els indicats a la Taula 22:

mGH 4S	5' CTCACCTAGCTGCAATGGC 3'
mGH 4A	5' GCACTGGAGTGGCAACTTC 3'

Taula 22. Encebadors dissenyats pel nostre laboratori utilitzats per fer la *nested*-PCR de l'ARN missatger de GH1.

Aquests encebadors també hibriden a l'exó 1 i a l'exó 5.

I els que són específics de variant i els de GAPDH, gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (que es fa servir com a control de la qualitat de l'ARNm obtingut) són els indicats a la Taula 23:

mGH-V2 S	5' CCAGGAGTTTAACCCCCAGAC 3'
mGH-V3 S	5' CCAGGAGTTTAACCTAGAGC 3'
mGH-V4 S	5' GAGTTTAGGCTGGAAGATGG 3'
mGH-V5 S	5' GGCTACAGAGGCTGGAAGATGG 3'
GAPDH-s	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'
GAPDH-a	5' GAAGATGGTGATGGGATTC 3'

Taula 23. Encebadors específics de variant dels tràncrits de GH1. També es mostren els encebadors dissenyats per amplificar ARNm de GAPDH.

Els quatre encebadors (sentit) es fan servir a la 2^a amplificació conjuntament amb l'encebador mGH 4A (antisentit).

Es fa control de qualitat de totes les mostres amplificant l'ARN de GAPDH. Si no s'amplifica aquest ARN, es considera que la mostra es troba en mal estat.

A la Figura 19 es pot veure on es troben els encebadors.

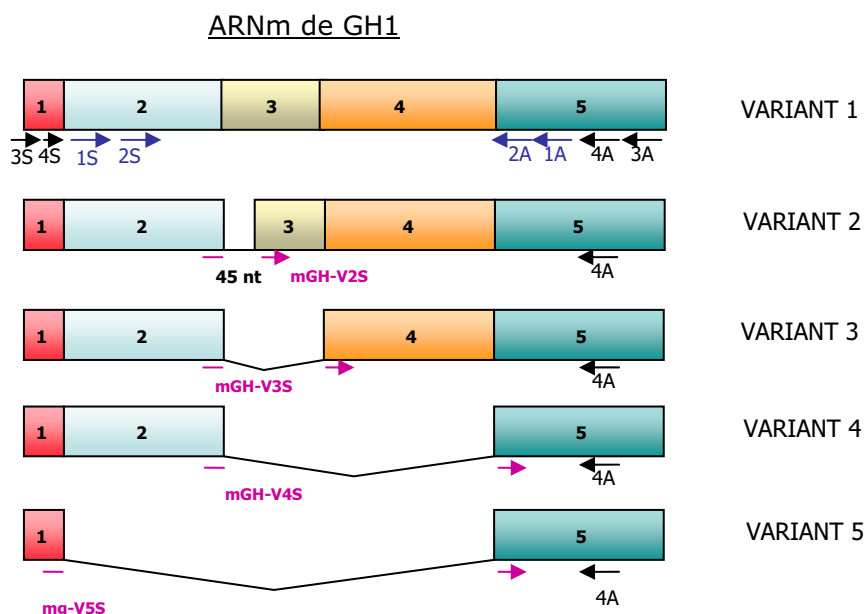


Figura 19. Representació esquemàtica de les 5 variants d'ARNm de GH1, on es mostren els processaments alternatius produïts en cada variant, i de diferents colors es mostra on anellen els encebadors dissenyats per nosaltres i els descrits a la literatura.

Utilitzant les parelles d'encebadors (1S-1A, 2S-2A; 3S-3A, 4S-4A) s'haurien d'amplificar les cinc variants d'ARNm de GH. Com que la primera variant és molt més abundant que les altres, el transcrit majoritari és aquest i per tant és difícil amplificar les altres variants en presència d'aquesta. És per això que s'han dissenyat els altres encebadors específics de variant. D'aquesta manera s'evita la competició per l'amplificació de les diferents variants.

2.4 Reamplificació de bandes retallades en gels de poliacrilamida

Per tal de separar bandes d'ADN múltiples i que són d'interès es procedeix a la reamplificació de les bandes retallant el gel de poliacrilamida, extraient l'ADN i reamplificant la seqüència d'interès mitjançant la reacció de PCR.

El procediment va ser el següent:

1. Retallar la banda d'interès.
2. Esmicolar la banda.
3. Hidratar amb 10 µl d'aigua.
4. Deixar-ho tota la nit a temperatura ambient per difondre l'ADN.
5. Seguidament es procedeix a la reacció de reamplificació de l'ADN amb els components indicats a la Taula 24.

Components	Concentració Final
Tampó 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM
Encebador sentit 10 µM	0,1 µM
Encebador antisentit 10 µM	0,1 µM
Taq polimerasa 5 U/µl	0,05 U/µl
dNTPs 100 mM	0,2 mM
Mostra	10 µl
H ₂ O	6,76 µl
Volum Total	22,5 µl

Taula 24. Components utilitzats a la reacció de PCR per reamplificar bandes retallades de gels de poliacrilamida i concentració final de la mescla de reacció.

Es fa el següent cicle temps i temperatures (Taula 25):

40 CICLES			
DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
1 min 94°C	1 min 60°C	1 min 72°C	7 min 72°C

Taula 25. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR per reamplificar bandes retallades de gels de poliacrilamida.

En tots els casos es comprova mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida si la reamplificació ha estat efectiva i, segons el cas, es seqüencia.

2.5 Electroforesi

S'utilitza l'electroforesi en gel com a mètode de separació de macromolècules. La separació de les macromolècules es basa en la filtració en gel així com en les mobilitats electroforètiques de les molècules que s'estan separant.

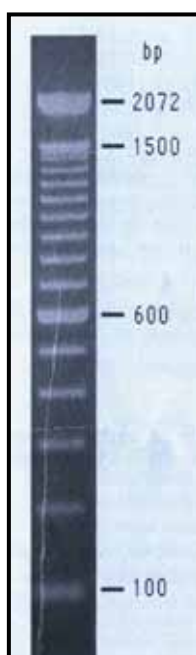
2.5.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida

Es fan electroforesis en gels de poliacrilamida (12,5% PAGE) dels productes obtinguts quan el tamany és inferior als 200 kD. Com que els productes obtinguts en amplificar l'ARN missatger de GH són molt poc abundants, és útil un sistema molt sensible com són els gels de poliacrilamida per visualitzar les bandes obtingudes a partir d'aquestes amplificacions. Aquests gels poden arribar a diferenciar cadenes d'ARN que només difereixin en una base en tamany. El tamany dels fragments que es poden separar van de 5 a 1000 pb. Es fan servir els gels *GeneGel Excel 12.5/24 kit* de la casa comercial Amersham Biosciences AB. Aquest sistema porta unes tires seques amb els tampons adequats per a l'ànode i el càtode. Per l'ànode el tampó és el següent: 0,45 mol/l de Tris/acetat, 4 g/l SDS i 0,05 g/l de orange G. Pel càtode el sistema és el següent: 0,08 mol/l Tris, 0,80 mol/l tricina i 6 g/l de SDS S'utilitza l'aparell *GenePhor Electrophoresis System* (Amersham Biosciences AB).

L'electroforesi en el sistema *GenePhor Electrophoresis System* es va realitzar a 12°C aplicant 600 V (voltatge), 25mA (corrent), 15 W (potència) durant 1 hora i 10 minuts.

El marcador de Pes Molecular és el *100 bp DNA Ladder d'Invitrogen* (Figura 20).

Figura 20. Patró de bandes del marcador de pesos molecular utilitzat en els gels tant d'agarosa com de poliacrilamida.



2.5.2 Tinció de gels de poliacrilamida

El revelat es fa mitjançant tinció amb plata. S'incuba el gel durant 30 minuts amb una primera solució fixadora formada d'àcid benzensulfònic al 3.0% w/v en una solució al 24% v/v d'etanol. Després es tenyeix amb una solució de nitrat de plata a l'1% w/v i àcid benzensulfònic al 0.35% w/v durant 30 minuts. Es fa un rentat amb aigua destil·lada durant 1 minut i després es procedeix al revelat amb una solució de carbonat de sodi al 12.5% w/v en aigua, formaldehid al 37% w/v en aigua i tiosulfat de sodi al 2% w/v en aigua. Aquesta solució es manté durant 6 minuts. Finalment la solució de parada és àcid acètic al 5% v/v, acetat de sodi al 25% w/v i glicerol al 50% v/v. Aquesta solució s'incuba durant 30 minuts. Per aquesta tinció s'utilitza el preparat comercial *DNA Silver Staining kit* (Amersham Biosciences).

2.6 Identificació dels haplotips de GH1 que corresponen als trànscrips obtinguts

Amb el fi d'identificar cada haplotip portador dels SNPs i dels canvis en la seqüència de GH1 trobats en heterozigosi es va realitzar la clonació d'al·lels de GH1 en alguns pacients. L'elevada freqüència d'aparició d'individus heterozigots en les posicions P2 i/o P24 permet amplificar per separat els dos al·lels. Coneixem ja els genotips dels pacients, per la qual cosa podem plantejar les reaccions per a la clonació i identificació d'al·lels segons siguin heterozigots en P2 i/o P24. En aquests casos, es realitza una reacció *nested-PCR* en la que la temperatura d'hibridació és 60°C i el temps d'extensió de cada cicle s'augmenta a 1 min 30 seg. S'utilitzen en aquesta reacció encebadors específics en 3' per el nucleòtid present en aquesta posició (indicats a la Figura 16).

- Clonatge en el vector pCR[®]2.1 del sistema *TA cloning* d'Invitrogen.

S'incuba durant tota la nit a 15°C la mescla de reacció indicada a la Taula 26:

Components	Concentració Final
Producte de PCR	0,5 µl
T5 ADN Ligasa	0,5 µl
Vector pCR2.1	0,5 µl
Tampó de ligació 10X	1 µl
H ₂ O	7,5 µl
Volum Total	10 µl

Taula 26. Components utilitzats a la reacció de lligació i concentració final de la mescla de reacció.

- Transformació en cèl·lules E.coli TOP10F'.

El producte de lligació s'introdueix en un vial que conté 50 µl de suspensió de cèl·lules i s'incuben durant 45 segons a 42°C. Es refreden en gel. S'afegeix 200 µl de medi SOC (Invitrogen; 2% triptona, 0,5% extracte de llevat, 10 mM clorur de sodi, 2,5 mM, clorur de potassi, 10 mM clorur de Magnesi, 10 mM de sulfat de magnesi i 20 mM de glucosa) i s'incuba durant 1 hora a 37°C, per permetre la reparació de membranes sense que s'iniciïn les divisions cel·lulars.

Es sembren les plaques de medi LB (Luria Bertani Invitrogen; 5 g/l NaCl, 10 g/l Peptona, 5 g/l extracte de llevat, 12 g/l agar) i s'incuben durant tota la nit a 37 °C.

El dia següent es piquen les colònies i es posen a incubar en medi de LB amb Ampicilina a una concentració de 100 µg/ml durant 5 hores 37°C.

- Aïllament del plàsmid

Es procedeix a purificar el plàsmid del cultiu cel·lular d'E.coli. S'utilitza el procediment clàssic descrit per Maniatis.

Un cop es té l'ADN del plàsmid aïllat es fa una reacció de seqüència per comprovar que l'insert es troba correctament dins el plàsmid.

S'identifica llavors la seqüència completa de cada al·lel (polimorfismes i altres canvis).

3. ESTUDI TEÒRIC DE LA TRADUCCIÓ A PROTEÏNA DE LES SEQÜÈNCIES D'ARN missatger MITJANCANT L'ORFfinder

Es va utilitzar el program informàtic ORFfinder (*Open reading frame finder*) per buscar quines proteïnes teòriques es podien derivar dels trànscrips anòmals trobats en l'estudi de l'expressió del gen GH1 en leucòcits de sang perifèrica. Aquest programa es pot consultar a la següent adreça electrònica:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>

Aquest eina informàtica identifica totes les proteïnes que es puguin derivar de la seqüència nucleotídica que es vulgui estudiar en les tres possibles pautes de lectura. Analitza les seqüències en sentit i antisentit.

4. PREDICCIÓ D'ESTRUCTURA DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS

Caracterització funcional de les variants F25Y, V173L

Es va estudiar la conservació evolutiva dels residus Phe25 i Val173 amb el programa ClustalW, on es va fer l'alineament de les proteïnes GH de 19 vertebrats. La pàgina web on es pot trobar el software és la següent: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Aquest programa serveix per fer alineaments múltiples de seqüències tant de proteïnes com d'ADN.

També es pot analitzar les relacions evolutives mitjançant la realització de Cladogrames i Filogrames amb el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 2.1) La pàgina web on es pot trobar el software és la següent: <http://www.megasoftware.net>

Es va estudiar l'estructura de la GH així com les interaccions amb la molècula de receptor de GH amb el programa informàtic *molecular modelling software suite* (Molsoft LLC, San Diego, CA). La pàgina web on es pot trobar el software és la següent: <http://www.molsoft.com>

5. ESTUDI DELS ELEMENTS DE RESPOSTA DE LES REGIONS PROMOTORES DELS GENS REGULATS PER STAT5 I/O VITAMINA D

Es van estudiar les regions promotores del gens STAT5B, IGF1, IGF1R i GHR amb el programa informàtic *MatInspector Release professional 7.4.1 Dec 2005 de*

Genomatix. Es va realitzar l'anàlisi mitjançant dues aproximacions diferents. La primera és considerant les regions promotores de cada gen (que poden arribar a ser aproximadament uns 500 pb de l'extrem 5' de l'exó 1). La segona és la forma automàtica, mitjançant un altre programa de *Genomatix* anomenat *Gene2promoter*. Aquest programa localitza els promotors dels gens i analitza els factors de transcripció que s'hi poden unir.

La primera versió de MatInspector és descrita per Quandt *et al.*, 1995. Cartharius *et al.*, l'any 2005, descriuen la versió actual del programa.

Es van buscar principalment els factors de transcripció VDR i STAT5, per estudiar l'efecte produït per la Vitamina D, i també per comprovar si els gens estudiats contenen un lloc de reconeixement de STAT5, que es troba a la via d'acció de la GH, i podria estar implicat en la mediació del senyal produït per GH, i que estimula IGF1.

5.1 Estudi de la regió 5'

Es van introduir entre 800 i 1300 pb a partir de la regió 5' de l'exó 1 o de la regió 5' UTR dels quatre gens en el programa informàtic per tal que aquest analitzés les regions.

Les seqüències que es van analitzar són les indicades a la Taula 27:

GHR	gi 21281492 gb AC114941.2 [21281492]	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2287M17, complete sequence.
STAT5	gi 28269667 gb AC099811.7 [28269667]	Homo sapiens chromosome 17, clone RP11-358B23, complete sequence
IGF1R	gi 22726103 gb AC118658.4 [22726103]	Homo sapiens chromosome 15, clone RP11-35015, complete sequence
IGF1	gi 6598666 gb AC010202.6 [6598666]	Homo sapiens 12q BAC RP11-210L7 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence

Taula 27. Gens analitzats amb el programa informàtic MatInspector.

5.2 Estudi automàtic

Es van introduir les referències dels quatre gens, i el programa informàtic Gene2promoter en va localitzar els possibles promotors dels gens.

El programa Gene2promoter proporciona l'accés a seqüències promotores de tots els gens que es trobin en genomes descrits.

El software de l'eina informàtica MatInspector utilitza una llibreria de descripcions de matrius per a llocs d'unió a factors de transcripció. Assigna uns criteris de

qualitat a les troballes i permet seleccionar els resultats en funció de la qualitat del resultat (és a dir, en funció de l'homologia de la seqüència a la base de dades utilitzada per comparar la seqüència introduïda).

El programa MatInspector proporciona uns valors per a cada element de resposta localitzat, i són el *Core similarity* i el *Matrix similarity*.

El *core sequence* d'una matriu es defineix com a les posicions més altament conservades de la matriu (normalment quatre). El màxim valor per al *core similarity* és 1.0, i només s'hi arriba quan les bases més altament conservades de la matriu coincideixen exactament amb la seqüència. Però un paràmetre més important que el *core similarity* és el *matrix similarity*, que té en compte totes les bases sobre la matriu sencera.

El paràmetre *matrix similarity* arriba a una puntuació de 1.0 quan cada posició de la seqüència correspon al nucleòtid més conservat en aquesta posició a la matriu. Un bon valor sol estar per sobre de 0.80 (>0.80). Diferències en posicions altament conservades de la matriu fan decreïxer aquest paràmetre més que diferències en posicions menys conservades.

En els resultats proporcionats pel programa es troben les bases marcades en vermell, que indiquen on la matriu exhibeix un perfil elevat de conservació i les bases marcades amb lletres majúscules, que denoten la *core sequence* utilitzada per MatInspector.

6. PRODUCCIÓ DE PROTEÏNA GH RECOMBINANT NORMAL I AMB MUTACIONS MITJANÇANT LA TECNOLOGIA DE MUTAGÈNESI DIRIGIDA I EXPRESSADA EN UN MODEL CEL·LULAR

6.1 Producció de proteïna GH recombinant Wild Type (WT) i amb mutacions

Per tal d'estudiar en models experimentals de cèl·lules en cultiu l'efecte de canvis en l'estructura de la proteïna GH, interessa expressar la GH a partir de seqüències d'ADN deduïdes a partir d'ARNs portadors de mutacions.

Per dur a terme aquest propòsit el que es fa és amplificar la primera variant de GH, expressar aquest ADNc en cèl·lules i obtenir d'aquesta manera l'hormona *in vitro*. Així doncs, s'utilitzen uns encebadors dissenyats per nosaltres que amplifiquen just la seqüència que dona lloc a la proteïna. Aquests encebadors són el mGH-wt 5p i mGH-wt 3p.

A la Figura 21 es veu on hibriden els encebadors si es treballa sobre el cADN:

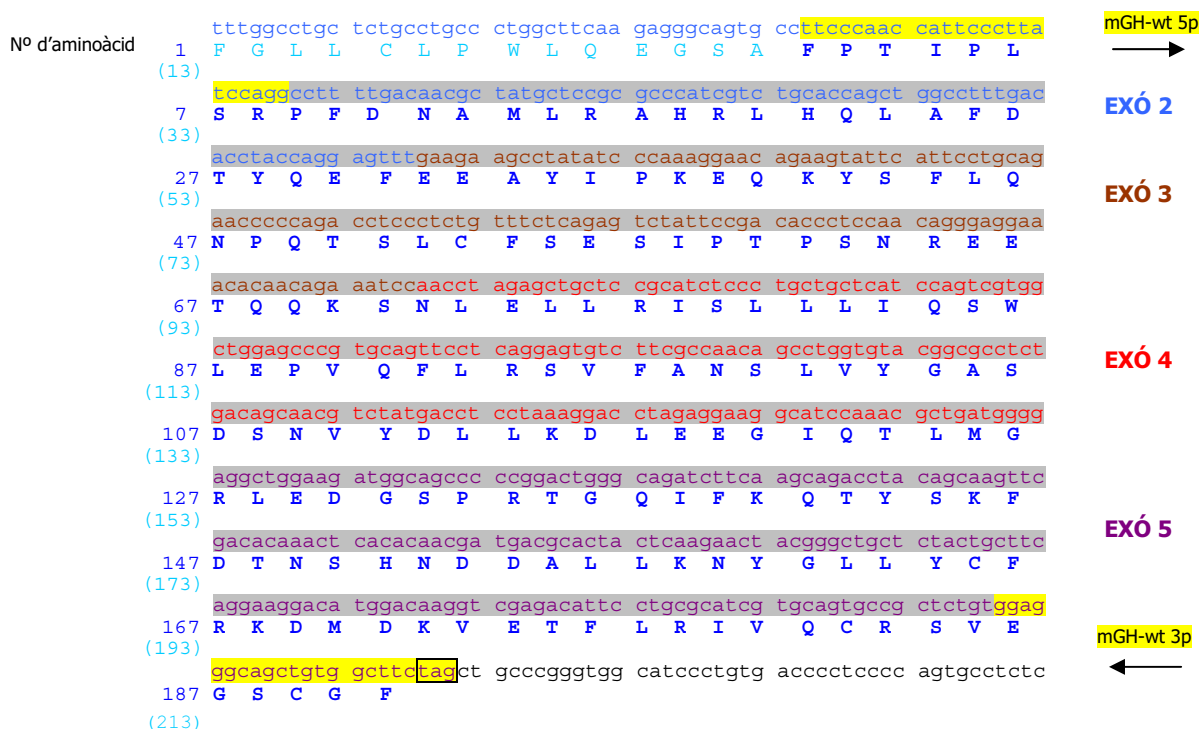


Figura 21. Representació esquemàtica de la seqüència d'ARN de GH1 amb la traducció a aminoàcids en color blau fosc. En blau clar es mostra la seqüència d'aminoàcids que es tradueix a pèptid senyal i que no forma part de la proteïna madura. En groc es mostren les seqüències on anellen els encebadors dissenyats per amplificar just el fragment que es tradueix a proteïna madura.

D'aquesta manera s'amplifica la zona que finalment es tradueix a proteïna. Cal remarcar que s'amplifica la zona que es transcriu a proteïna madura (aminoàcids en

color blau fosc). En canvi, la zona que es tradueix a pèptid senyal i, per tant, que no forma part de la proteïna madura no s'amplifica. Un cop es té expressada la proteïna que se'n deriva (WT), mitjançant mutagènesi dirigida es provoquen les mutacions trobades en pacients i que prediuen un canvi d'aminoàcid. La seqüència de nucleòtids dels encebadors es troba indicada a la Taula 28:

mGH WT 5p	5' TTCCAACCATTCCTTATCCAGG 3'
mGH WT 3p	5' CTAGAAGCCACAGCTGCCCTCC 3'

Taula 28. Encebadors utilitzats per amplificar la part codificant del cADN de GH1.

La PCR utilitza els components indicats a la Taula 29:

Components	Concentració Final
Producte de PCR	0,66 µl
Tampó 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,45 mM
Encebador sentit 10 µM	0,2 µM
Encebador antisentit 10 µM	0,2 µM
Taq (5 U/µl)	0,044 U/µl
dNTPs (100 mM)	0,22 µM
H ₂ O	81,68 µl
Volum Total	100 µl

Taula 29. Components utilitzats a la reacció de PCR per amplificar la part condificant de l'ADNc de GH1 i concentració final de la mescla de reacció. S'utilitza el sistema *EcoTaq* de la casa comercial ECOGEN.

El cicle de temps i temperatures realitzat és l'indicat a la Taula 30:

40 CICLES			
	DES NATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ I EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
5 min 94°C	1 min 94°C	2 min 60°C	7 min 72°C

Taula 30. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR per amplificar la part codificant de l'ADNc de GH1.

El resultat de la reacció dóna un producte de PCR de 576 pb, que es seqüència i es comprova que és correcta.

6.1.1 Clonatge en vector pQE-30UA

S'introdueix la seqüència anterior en un vector per transformar-ho en un model cel·lular, que en aquest cas son cèl·lules d'*E.coli*.

El vector triat és el pQE-30UA, l'estructura del qual es veu a la Figura 22:

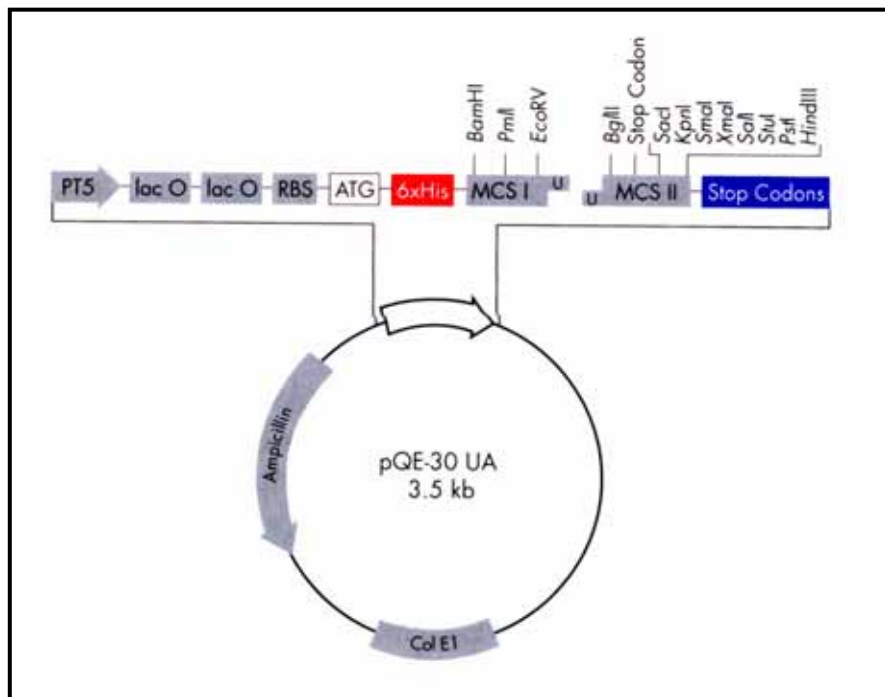


Figura 22. Representació esquemàtica del plàsmid pQE30UA on es veu el MCS (multicloning site), lloc on s'insereix l'insert que es vol expressar.

Aquests vectors es basen en el sistema de transcripció-transducció del promotor T5, que és reconegut per la RNA polimerasa d'*E.coli*. A més a més té dos operadors *lac*, que incrementen la unió del repressor de *lac* de manera que la repressió de l'operador sigui molt més eficient. També té un lloc d'unió a ribosoma (RBSII), que proporciona quotes de traducció molt elevades. Aquest vector conté una seqüència que codifica per una cua d'Histidines (6xHis-tag). També té un *multicloning cloning site* i codons de parada en totes les pautes de lectura. A més a més hi ha dos terminadors de la transcripció molt potents: t_0 (del fag lambda) i T1 de l'operó d'*E.coli rrnB*. Aquests dos terminadors serveixen per aturar la transcripció i per assegurar l'estabilitat del constructe expressat. El gen de la β -lactamasa (*bla*), confereix resistència a ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Té l'origen de replicació COLE1.

Aquest vector està dissenyat per clonar directament productes de PCR. El sistema aprofita que les Taq DNA polimerases i altres DNA polimerases que no tenen activitat *proofreading* afegeixen una A a l'extrem 3' dels productes de PCR. Això



Figura 23B. Seqüència nucleotídica del fragment del plàsmid pQE-30UA on es troba el *PCR cloning site*, el lloc d’inici de la traducció, el fragment que codifica per a la cua d’Histidines, i també es senyala la posició on hibriden els encebadors Type II/IV i Reverse Sequencing

Es fa la *lligació* a 16°C, 18 hores. S’utilitza el plàsmid pQE-30 UA que, com ja s’ha dit abans, admet productes de PCR. S’utilitza el kit *The QIA expressionist* de Qiagen. Es segueix el procediment segons instruccions del proveïdor.

Transformació i clonació.

Un cop ja es té lligat el producte de PCR al plàsmid pQE-30UA, cal transformar-lo en les cèl·lules *E.coli* (INV α F’), amb el sistema del *TA clonig kit* d’Invitrogen.

Purificació

S’utilitza el kit *Wizard plus SV Minipreps DNA purification system* de Promega. Aquest és un mètode que permet aïllar plàsmids d’ADN aptes per a la seqüenciació, és a dir, un ADN d’elevada qualitat i puresa.

Mitjançant seqüenciació automàtica es comprova que el ADNc s’ha inserat en l’orientació correcta.

Per fer això es fa la reacció de seqüència amb 1 μ g d’ADN. Es fa servir el kit de seqüenciació d’*Applied Biosystems, Big Dye 3 v.1.*

Els encebadors que s’utilitzen per a la seqüenciació són els indicats a la Taula 31:

Type III/IV	5’ CTTATAACAATTTACACAG 3’
Reverse Sequencing	5’ GTTCTGAGGTCATTACTGG 3’

Taula 31. Encebadors utilitzats per a la seqüenciació del plàsmid pQE-30UA.

Es pot veure la posició d’aquests encebadors a la Figura 23B.

I finalment es pot resumir el procés en l’esquema de la Figura 24:

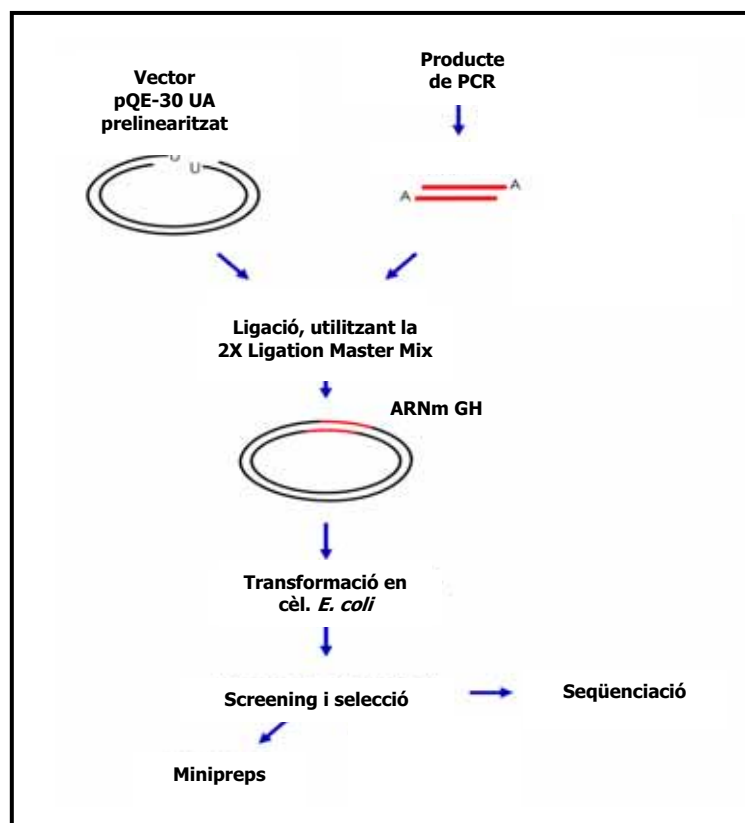


Figura 24. Representació esquemàtica del procés de clonació, lligació i transformació de l'insert estudiat dins el plàsmid pQE-30UA.

Com es veu a la Figura 24, un cop s'ha produït la lligació, es transforma en cèl·lules *E. coli* i s'amplifica. Es purifica aquest plàsmid i es seqüencia per comprovar que la seqüència nucleotídica és correcta. Després es fa la mutagènesi necessària, i finalment es transforma a les cèl·lules apropiades (M15[pREP4]) per expressar la proteïna.

La regulació de l'expressió en aquest sistema (com ja s'ha dit anteriorment) es produeix mitjançant el repressor *lac*. Les cèl·lules *E. coli* utilitzades per l'expressió (M15[pREP4]) tenen el gen de la proteïna repressora *lac* en *trans* respecte el gen de la proteïna que es vol expressar. En el sistema *trans*, la línia cel·lular conté un plàsmid "low-copy" de pREP4, que confereix resistència a kanamicina i expressa constitutivament el repressor *lac* (codificat pel gen *lac I*). Aquest plàsmid pREP4 és compatible amb tots els plàsmids que continguin l'origen de replicació ColE1, i es manté en *E. coli* sempre i quan estigui en presència de kanamicina a una concentració de 25 µg/µl. Així doncs, l'expressió de proteïnes recombinants mitjançant els vectors pQE és ràpidament induïda mitjançant l'addició de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosidasa), que s'uneix al repressor *lac* i l'inactiva.

Un cop el repressor *lac* és inactivat, la RNA polimerasa de la cèl·lula comença a transcriure des del promotor. Finalment els trànscrips produïts són traduïts.

Utilitzant aquest sistema d'expressió i purificació de proteïna, el que es fa és facilitar la producció i la caracterització de gairebé qualsevol proteïna. Per a la purificació, aquest sistema utilitza una cromatografia d'afinitat basada en la unió Niquel-àcid nitrilotriacètic (Ni-NTA) a biomolècules que continguin 6 residus d'histidina consecutius (6xHis tag), ja sigui al cap o a la cua de la proteïna. En aquest cas la cua d'Histidines s'afegeix al cap de la proteïna.

Com s'ha dit abans, l'objectiu final d'aquest procés és expressar una proteïna al laboratori que després es pugui utilitzar per fer estudis amb un línia cel·lular. En resum, el que es fa és produir una GH WT i una altra que contingui una mutació.

6.1.2 Mutagènesi dirigida

Aquesta tècnica pot ser utilitzada per crear mutacions puntuals o petites delecions o insercions.

L'essència d'aquesta estratègia tracta de produir un canvi en l'insert que hi ha al plàsmid a través d'un seguit de seleccions que es fan a partir de mutacions que s'introdueixen en dianes de restricció úniques que hi ha a la seqüència del plàsmid.

Això vol dir que el que s'ha de fer és mutar una diana de restricció única, així com mutar el lloc on volem el canvi (la mutació, és clar, és el canvi que desitgem en la seqüència). Aleshores es digereix amb l'enzim adequat, i com que la diana estarà canviada, en els llocs on hagi anat bé la mutagènesi l'enzim no tallarà, i en canvi aquells que no hagin anat bé (que no s'hagi produït la mutagènesi) sí que seran digerits per l'enzim. Així, els plàsmids digerits (linearitzats), no podran ser transformats en *E.coli* i per tant augmenta l'eficiència de la mutagènesi.

La mutagènesi es realitza amb el *Transformer site-directed mutagenesis kit* de BD Biosciences.

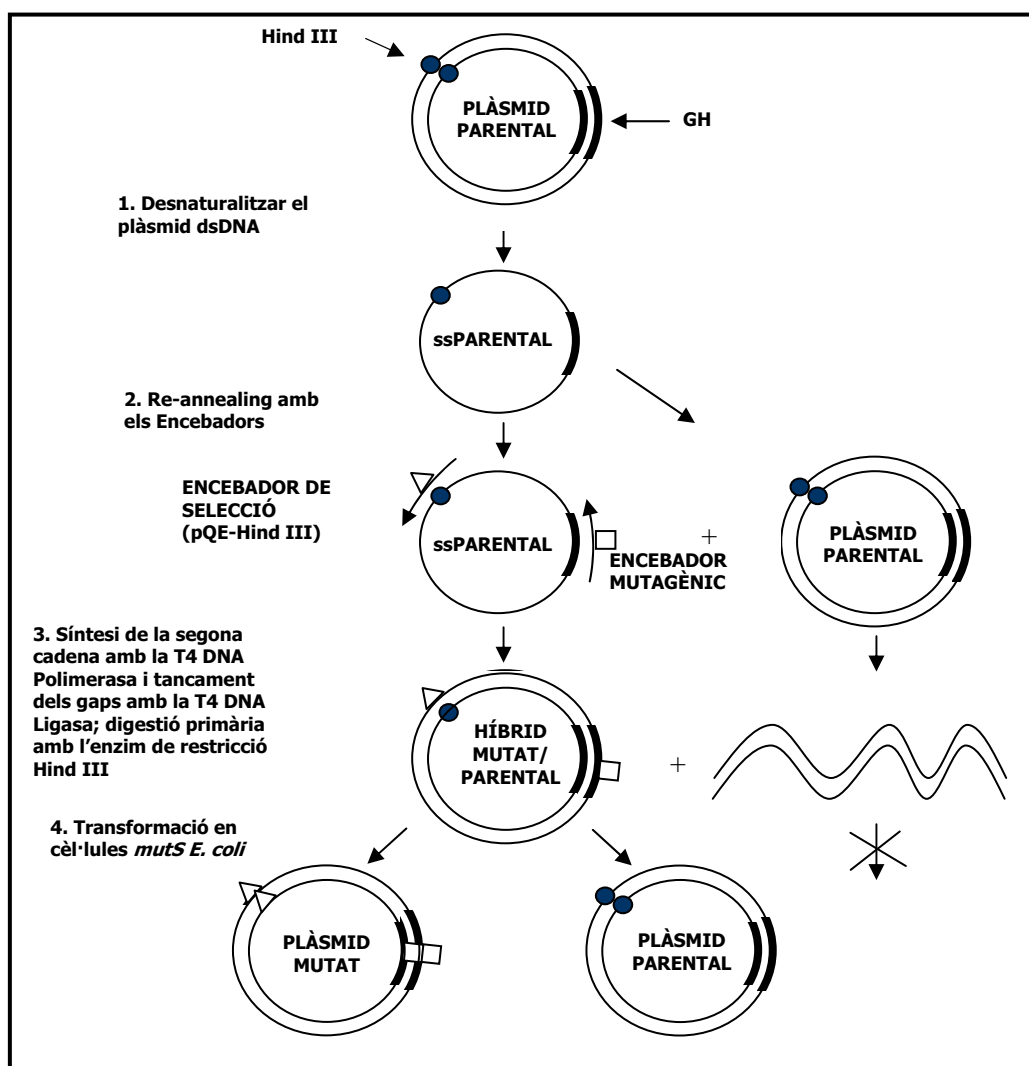


Figura 25. Representació gràfica del procés de mutagènesi dirigida.

Es va triar Hind III com a diana de restricció, perquè aquest lloc es trobava al plàsmid i en canvi no es trobava al gen GH1. Així, a l'hora de fer la digestió es va tallar el plàsmid per un únic lloc (veure Figura 25).

Es segueix el protocol recomanat.

Es realitza un canvi a l'hora de digerir amb l'enzim, ja que abans de fer la digestió es purifica per precipitació el plàsmid i d'aquesta manera s'eliminen les sals que hi puguin haver en el medi:

1. Es precipiten els 30 μl per eliminar les sals, i així es resuspèn en el tampó corresponent a l'enzim de restricció Hind III: s'afegeixen 4,5 μl d'acetat de sodi 3M, 93,75 μl d'etanol i 21,75 μl d'aigua.
2. Es resuspèn els 30 μl en 17 μl d'aigua, 2 μl de buffer 10 x, i 1 μl d'enzim. Així el volum final és de 20 μl .
3. S'incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ durant 1 hora.
4. Per inactivar l'enzim s'escalfa a 70 $^{\circ}\text{C}$ durant 5 min.

També es fan canvis en la transformació a les cèl·lules BMH 71-18 *mutS*.

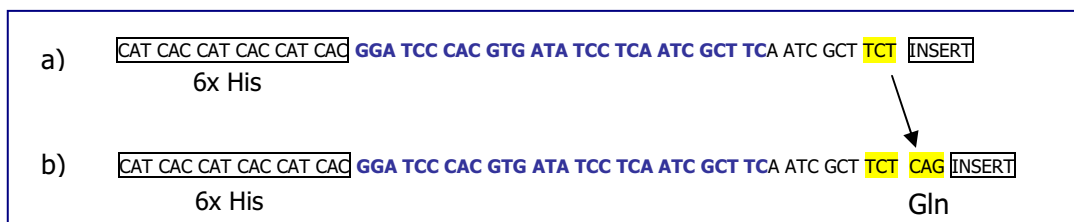
El propòsit d'aquest pas és amplificar la cadena mutada. Es fa en cèl·lules *mutS* d'*E.Coli*, que són incapaces de reparar mutacions.

1. S'afegeixen 2 µl de la mescla digerida a 25 µl de cèl·lules BMH 71-18 *mutS* i s'incuben amb gel durant 20 minuts.
2. Tot seguit s'incuba a 42 °C durant 1 min.
3. Després s'afegeixen 250 µl de medi LB sense antibiòtic, i s'incuba a 37 °C durant 1 hora.
4. Es fan plaques de LB agar amb ampicilina (100 µg/ml). Es sembren les plaques i es deixen créixer les colònies fins el dia següent.
5. Es piquen colònies de les plaques i es fan créixer en 1,5 ml de medi líquid LB amb ampicilina (100 µg/ml).
6. S'extreu el plàsmid amb el kit *Wizard plus SV Minipreps DNA purification system* de Promega.

En clonar el producte de PCR la seqüència teòrica a obtenir seria:



I la seqüència que realment s'ha obtingut en tots els clons ha estat (a). La seqüència obtinguda cal modificar-la per tal de respectar la pauta de lectura de la proteïna GH (b):



Aquest pas es va realitzar fent una nova amplificació amb els oligonucleòtids indicats a la Taula 32. L'encebador sentit afegia els tres nucleòtids en el lloc apropiat (Taula 32).

mGH WT 5p Gln (SENTIT)	5' CAG TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG 3' (MUTAGÈNIC)
mGH WT 3p (antisentit)	5' CTA GAA GCC ACA GCT GCC CTC C 3'

Taula 32. Encebadors utilitzats per afegir els tres nucleòtids davant de l'insert.

Un cop es va confirmar que s'havien introduït aquests nucleòtids es va procedir a la lligació al plàsmid pQE-30UA amb el kit *The Qiaexpressionist* de Qiagen.

S'introdueix aquesta Gln (Glutamina) per poder eliminar posteriorment la cua d'Histidines a l'extrem amino terminal. Mitjançant el sistema *TAGZyme* de Qiagen es pot proteolitzar la proteïna just abans de la Gln, i així al final obtenir la proteïna d'interès.

Els altres canvis que es van realitzar mitjançant mutagènesi dirigida són canvis trobats a la seqüència del gen GH1 de pacients. Aquests són:

- Phe 25 Tyr. 5636 T>A (I)
- Val 173 Leu. 6633 G>C (II)

I) Seqüència normal:

25
CAGCTGGCC[TTT]GACACC
Q L A F D T

Seqüència del pacient:

CAGCTGGCC[TAT]GACACC
Q L A Y D T

II) Seqüència normal:

173
ATGGACAAG[GTC]GAGACA
M D K V E T

Seqüència del pacient:

ATGGACAAG[CTC]GAGACA
M D K L E T

Un cop es tingueren aquests canvis realitzats, es procedí a expressar aquest plàsmid en les cèl·lules M15, i així s'obtingué la proteïna desitjada.

6.1.3 Expressió de GH en *E. coli* M15

6.1.3.1 Transformació en cèl·lules M15 [prep 4]

Es va fer la transformació del plàsmid en cèl·lules M15 de la següent manera:

1. Es transfereix 1 μ l de plàsmid a un tub de 1,5 ml on s'afegeix 100 μ l de cèl·lules M15 [prep 4].
2. Es manté a 0°C durant 20 minuts.
3. Es posa a 42°C durant 90 segons.
4. S'afegeix 500 μ l de medi Psi i s'incuba a 37°C durant 75 minut. El medi Psi és medi LB amb MgSO₄ 4mM i KCl 10 mM.

Es preparen plaques d'agar LB que contenen els antibiòtics Kanamicina (25 μ g/ml) i Ampicilina (100 μ g/ml). Es seleccionen les colònies que han crescut i es posen a créixer en 1,5 ml de LB + Ampicilina + Kanamicina. Seguidament es fa l'extracció del plàsmid i es seqüencia amb l'encebador abans descrit Type III/IV per comprovar que l'insert està insertat i que ho està de manera correcta.

6.1.3.2 Inducció amb IPTG

La inducció es fa fent créixer el cultiu de LB amb els antibiòtics ja descrits anteriorment sembrat amb l'alíquota que conté el plàsmid dins les cèl·lules M15 fins a una D.O λ_{600} de 0,5-0,6. Un cop s'ha arribat a aquest D.O, vol dir que les cèl·lules estan creixent exponencialment, i és aleshores quan es fa la inducció amb IPTG 1M. S'afegeix la quantitat necessària per a tenir una concentració final de 1mM. Es deixa a 37°C i en agitació durant 2,5 hores.

6.1.3.3 Lisat i purificació de la proteïna en condicions natives

Un cop s'ha fet la inducció amb IPTG es procedeix a la purificació de la proteïna.

1. Es centrifuguen els cultius i s'obté un precipitat de cèl·lules.
2. Es lisen els precipitats amb tampó de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl i 10 mM imidazole. pH: 8 (NaOH)). El NaCl s'utilitza per prevenir interaccions iòniques. L'imidazole s'utilitza a baixes concentracions per inhibir unions no específiques.
3. S'afegeix lisozim per a que la concentració final sigui de 1 mg/ml. S'incuba 30 minuts en gel.
4. Es sonica en gel a 200-300W, 6 vegades, fent pulsos de 10 segons, i amb pauses entremig de 10 segons sempre mantenint-ho en fred.
5. Es centrifuga el lisat a 10000 x g durant 30 min a 4 °C. La proteïna està al sobrenedant.

6. Per a 100 ml de cultiu inicial, s'afegeix 250 µl de Ni-NTA agarosa un cop ja està escorreguda sobre el sobrenedant anterior. Es posa en agitació durant 60 min a 4 °C.
7. S'afegeix la barreja anterior a una columna. S'exclou tot el contingut i queda retinguda l'agarosa amb la proteïna unida.
8. Es fan dos rentats amb un tampó que conté 50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl i 20 mM de imidazole.
9. Finalment s'elueix amb un tampó d'elució que conté 50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl i 250 mM de imidazole. La concentració d'imidazole desfà les unions entre la cua d'histidines i el Ni de l'agarosa. Es recupera la proteïna que ara ja és purificada.

6.1.4 Diàlisi de la proteïna

Per tal de tenir el tampó correcte per després fer el tractament amb enzims per digerir la cua d'histidines, es fa una diàlisi amb una membrana. La membrana és *Spectra/Por® 7 MWCO 8,000 Regenerated cellulose dialysis membrane* (Spectrum Laboratoires INC). Aquesta membrana reté les molècules que tinguin un pes molecular superior a 8000 Da (l'hormona de creixement té un pes molecular de 22000 Da).

El tampó que s'utilitza és el TAGzyme 1X (NaH₂PO₄ 20 mM, pH7, NaCl 150 mM). El pH és de 7,26. A la proteïna se li afegeix EDTA 125 mM. També s'afegeix NaN₃. Es dialitza durant tota la nit a 4°C.

6.1.5 Eliminació de cues d'Histidina

El mètode utilitzat és el que proposa la casa comercial Qiagen per a la proteolització de cues d'Histidina (*TAGZyme System, Qiagen*).

Aquest mètode està basat en unes digestions enzimàtiques que exoproteolitzen la proteïna des de l'extrem N-terminal fins arribar a una digestió difícilment anomenada *stop point*, que en aquest cas és quan s'arriba a la Gln. D'aquesta manera, mitjançant una columna d'afinitat s'obté la proteïna desitjada sense cap altre aminoàcid extra.

En la Figura 26 s'esquematitza el procés de digestió de la cua d'Histidines:

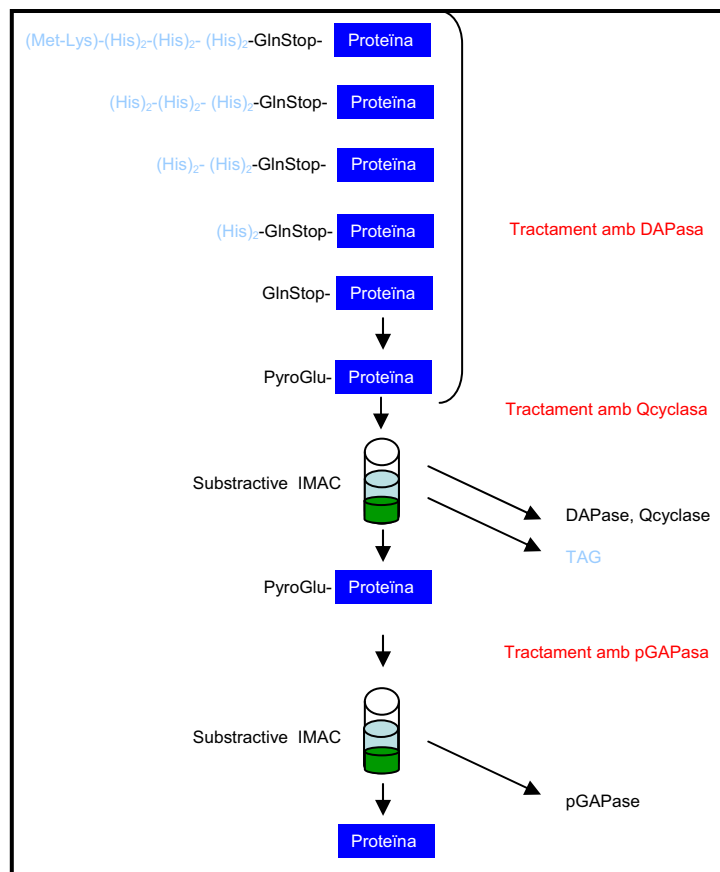


Figura 26. Representació esquemàtica del procés de purificació de la proteïna mitjançant la columna substractiva IMAC.

El procediment és el següent:

1. A 120 μ l de proteïna se li afegeix una barreja d'enzim DAPasa 1 U/ml (7,5 μ l) amb cysteamina 2mM (15 μ l) prèviament incubada 5 min a temperatura ambient, després a aquesta barreja se li afegeix 9 μ l de Qcyclasa (50 U/ml). Quan es té aquesta barreja s'afegeix als 120 μ l de proteïna, i es deixa incubar durant 2 hores a 37 °C en un bany d'aigua.
2. S'afegeix 3,75 μ l de DAPasa diluida + 7,5 μ l de Cisteamina incubats prèviament 5 min a temperatura ambient, + 4,5 μ l de Qcyclasa. Es deixa al bany d'aigua a 37 °C durant 3 hores més.

6.1.6 Quantificació de les proteïnes

6.1.6.1 Determinació de concentració de proteïna total

El mètode de quantificació utilitzat és una colorimetria basada en la reacció de les proteïnes en front l'àcid bicinconínic. L'àcid bicinconínic reacciona amb el Cu^{1+} que es forma quan el Cu^{2+} és reduït per les proteïnes en medi bàsic. Quan dues molècules d'àcid s'uneixen amb un ió Cu^{1+} és quan apareix el color porpre característic. Aquest complex aquós té una forta absorbància a 562 nm, zona en la qual és lineal l'absorbància en front a increments de concentració de proteïna.

Tot això es fa amb l'ajuda del kit *Micro BCA™ Protein Assay Reagent kit* (Pierce Rockford, IL).

Components:

Micro BCA™ Reagent A (MA)	Carbonat de sodi, bicarbonat de sodi i tartarat de sodi en NaOH 0,2 N.
Micro BCA™ Reagent B (MB)	Àcid bicinconínic (4,0%) en aigua.
Micro BCA™ Reagent C (MC)	Sulfat de coure (4,0%) pentahidratat en aigua.

6.1.6.2 Determinació de la concentració de proteïna GH

Es va realitzar la determinació de la concentració de proteïna GH per quimioluminiscència mitjançant un immunoanalitzador automatitzat *Immulite* de *Diagnostics Products Corporation* (Los Angeles, CA, USA). Aquest sistema utilitza un mètode immunològic enzimoluminiscent no competitiu de doble anticòs. Consta d'una fase sòlida (en forma de bola) recoberta amb un anticòs monoclonal de ratolí anti-hGH. També hi ha un reactiu que conté fosfatasa alcalina d'intestí de vedella conjugada a un anticòs policlonal de conill anti-hGH. Aquest reactiu i la hGH de la mostra són incubats juntament amb la fase sòlida on es troba l'anticòs monoclonal de ratolí anti-hGH per formar un complex d'anticòs tipus *sandwich*. El conjugat amb enzim no unit és eliminat mitjançant un rentat i posterior centrifugació. Finalment s'afegeix el substrat quimioluminiscent a la fase sòlida i el senyal es genera de manera proporcional a la quantitat d'enzim unit.

L'assaig s'estandarditza mitjançant un patró d'hGH recombinant (WHO NIBSC 2nd IS 98/574).

6.1.7 Electroforesi en gels de poliacrilamida

Es varen fer servir gels de poliacrilamida comercials perquè tenen una major resolució i la migració és millor. Es varen fer servir els *ExcelGel SDS homogeneous 12.5 gels* de *Amersham Biosciences*. Aquestes electroforesis es duen a terme en el *GenePhor Electrophoresis System (Amersham Biosciences AB)*, a 15°C, 600 V, 15 mA i 15 W durant 2 hores. El tampó del gel conté 0,12 mol/l de Tris, 0,12 mol/l de Acetat i 1g/l de SDS. Com que a les mostres se'ls afegeix SDS, fa que la càrrega de la proteïna sigui negativa, ja que recobreix la proteïna amb una capa uniforme que li confereix una càrrega negativa que fa que totes les mostres tractades d'aquesta manera tinguin la mateixa relació càrrega/massa. Així, la migració electroforètica és aproximadament proporcional al pes molecular de la cadena polipeptídica i no depèn de la càrrega que tingui.

Es fa un tractament no-reductor de la mostra (no s'hi afegeix DTT, que és l'agent reductor que s'utilitza en els tractaments reductors i que provoca un trencament entre dels ponts disulfur de la proteïna)

- El tampó de la mostra és el següent:

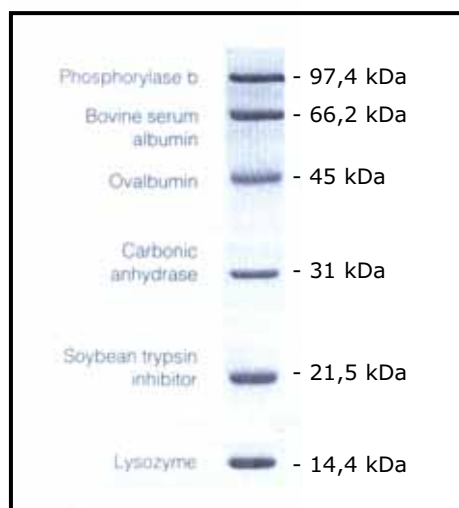
- Solució Stock: Tris 0,5 M. 3 g de Tris en 40 ml d' aigua destil·lada. Ajustar el pH a 7,5 amb Àcid acètic. Ajustar fins a 50 ml.

- A 5 ml de la Solució Stock s'afegeix 0,5 g de SDS i 5 mg de Blau de bromofenol. Ajustar a 50 ml amb aigua destil·lada i agitar (34 mM SDS, 0,14 mM Blau de bromofenol).

- S'afegeixen 10 µl d'aquesta solució a 3 µl de mostra de proteïna. I s'escalfa a 95°C durant 4 minuts. Aquest tractament deixa intactes els ponts disulfur entre les cadenes de la proteïna.

El marcador de pes molecular utilitzat és el *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* de *BIORAD* (Figura 27).

Figura 27. Patró de bandes del marcador de pes molecular utilitzat per les electroforesi en gels de poliacrilamida de proteïnes.



Tinció dels gels de poliacrilamida

El mètode utilitzat per a la detecció de les proteïnes en gel ha estat la tinció mitjançant Blau de Coomassie. Aquest mètode està englobat dins els mètodes de tinció amb colorants orgànics, on el gel és embegut en una solució colorant que s'uneix a les proteïnes. Per a la visualització de les bandes proteiques és necessari destenyir el gel amb el solvent utilitzat per a dissoldre el colorant.

El Blau de Coomassie és el mètode més utilitzat per a la tinció de proteïnes. El *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) és un colorant orgànic que en medi àcid s'uneix a les proteïnes mitjançant interaccions electrostàtiques amb els grup amino. Després de tenyir i destenyir el gel, les proteïnes es visualitzen com a bandes blaves. La sensibilitat d'aquest mètode és baixa. Es poden detectar fins a 0,2-0,5 µg de proteïna per banda.

S'ha utilitzat la preparació comercial de *BIORAD Coomassie Brilliant Blue Staining Solution* per a la solució de tinció, i es va preparar la solució de destinció de la següent manera:

- 10% Àcid acètic en una solució al 20% metanol-aigua.

6.1.8 Western Blot

1. Es realitza un gel de proteïnes tal i com s'ha explicat en l'apartat anterior. En un sol gel es carreguen les mateixes mostres i el marcador de pes molecular per duplicat. Un cop s'ha fet l'electroforesi, es talla el gel. Una meitat es tenyeix de la forma habitual, i l'altra serveix per fer el Western Blot.
2. El primer que s'ha de fer és transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,2 µm. D'aquesta manera es facilita l'accés de l'anticòs a la proteïna (Figura 28).

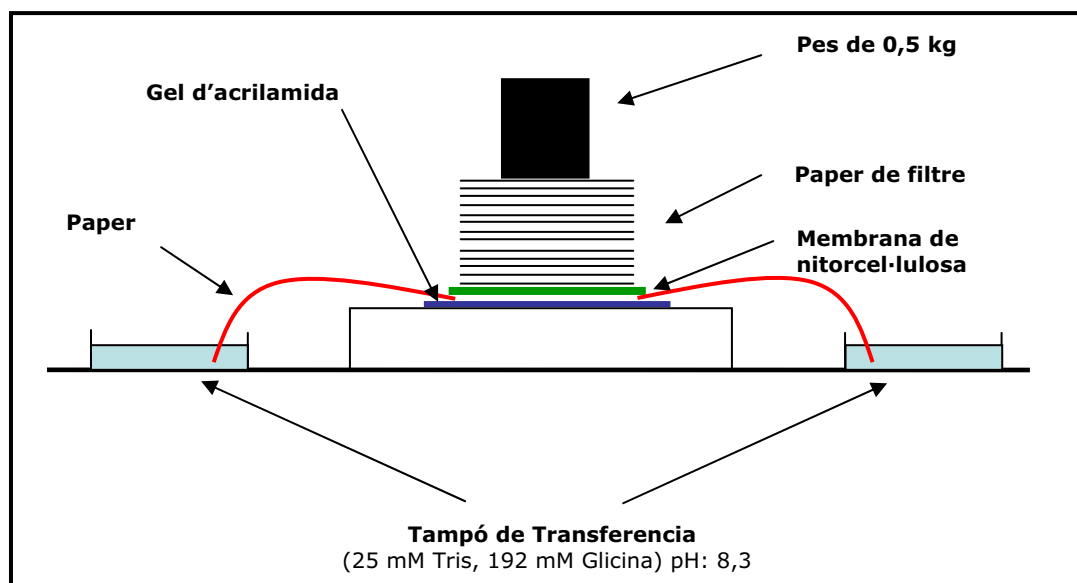


Figura 28. Representació esquemàtica del muntatge realitzat per dur a terme el *Western Blot*. Les proteïnes es transfereixen per adsorció del gel de poliacrilamida on es troben fins a la membrana de nitrocel·lulosa. Aquest suport permet treballar posteriorment en la identificació de la proteïna que s'està estudiant.

El muntatge es deixa durant tota la nit a temperatura ambient.

3. El dia següent es seca la membrana a l'aire.
4. Es bloquegen els llocs lliures de la membrana per immersió en Tampó PBS on s'ha afegit un 1% d'albumina.
5. S'incuba tota la nit a 4°C amb anticòs anti-GH de SIGMA (*monoclonal anti-human growth hormone. Clone GH-C2. Mouse Ascites fluid*). S'utilitza a una dilució 1/100.
6. S'incuba amb el segon anticòs proporcionat pel kit de DAKO (Carpinteria USA). Aquest sistema està basat en el mètode de l'estreptavidina-biotina (LSAB). Conté anticossos *anti-rabbit* i *anti-mouse* biotinilitzats. Posteriorment s'incuba amb estreptavidina conjugada a peroxidasa, i es revela amb una solució preparada de substrat-cromògen. El cromògen és una solució al 3% de 3-amino-9-etilcarbazole en N,N-dimetilformamida (DMF).

7. ESTUDI DE L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DE LES PROTEÏNES GH OBTINGUDES EN MODELS CEL·LULARS

Per tal d'estudiar l'efecte de les proteïnes mutants en un model cel·lular es va treballar amb models que poden respondre a l'hormona de creixement. Aquests models cel·lulars són cèl·lules HepG2, la línia condrocítica humana C-28/I2 i els condrocits humans fetals.

Es va analitzar mitjançant PCR semiquantitativa i PCR a temps real la quantitat d'ARN missatger d'IGF1 (principalment) i també l'ARN d'altres gens com STAT5B, GHR o IGF1R expressats en els cultius en resposta a la incubació amb GH.

LA PCR a temps real es va dur a terme mitjançant la tecnologia d'Applied Biosystems.

7.1 Cultius cel·lulars

7.1.1 Cultiu de HepG2

Els cultius de cèl·lules HepG2 (línia pre-establerta de carcinoma hepatocel·lular humà) van ser preparats a partir de la línia pre-establerta obtinguda de l'ATCC (referència HB-8065TM), i es va fer de la següent manera:

Es van dipositar 75.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous, amb medi MEM suplementat amb 0,35 g de NaHCO₃ i amb sèrum boví fetal (SBF) al 10% fins a un volum de 3 ml. Les cèl·lules es van deixar 7 dies creixent. Després es van deprivar durant 48 hores (amb medi MEM), i finalment es van incubar durant 48 hores amb medi MEM i les condicions que estan descrites a l'apartat 7.1.4.

Els flascons i caixes es van mantenir en estufa a 37°C amb CO₂ al 5% en aire i humitat.

7.1.2 Cultiu de C-28/I2

Els cultius de cèl·lules de la línia condrocítica C-28/I2 (línia de cèl·lules de condrocits immortalitzada provinent de condrocits costals de persona jove, descrita per Goldring *et al.*, 1994) es van dur a terme de la següent manera:

Es van dipositar 30.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous, amb medi de cultiu MEM suplementat amb 0,35 g de NaHCO₃ i SBF 10%. Es deixen 7 dies creixent, i després es sotmeten a 48 hores de deprivació amb medi MEM + HAM al 50%. Finalment s'incuben durant 48h amb medi MEM+HAM al 50% i les solucions que es troben descrites a l'apartat 7.1.4.

Els cultius es van mantenir en estufa a 37°C amb CO₂ al 5% en aire i humitat.

7.1.3 Cultiu de condrocits del cartílag epifisari de fetus humans

Els cultius de condrocits van ser preparats a partir del cartílag epifisari de fetus humans, de diferents edats gestacionals compresos entre 18 i 22 setmanes, recollits, prèvia autorització de necròpsia, en les primeres 24 hores "post mortem" i en condicions d'esterilitat.

El cultiu es va realitzar segons la tècnica posada a punt al nostre laboratori (Carrascosa *et al.*, 1985), i consisteix en:

1. Recollida de les epífisis femorals i tibials, en les primeres 24 hores "post mortem", sota el permís de necròpsia, en condicions d'esterilitat, dipositant-les en un tub que conté medi de cultiu estèril (HAM).
2. En una campana de flux laminar es van rentar les epífisis, separant el cartílag dels teixits adjacents i aponeurosis, tallant-se en fines làmines que són dipositades en una càpsula de petri que conté medi de cultiu HAM F-12, on són finament trossegades.

El teixit així obtingut va ser sotmès a dues digestions enzimàtiques successives:

1ª: tripsina 0,2% en PBS, durant 30 min a 37°C.

2ª: col·lagenasa 0,12% (segons l'activitat) en PBS, durant 30 min a 37°C.

Composició medi PBS:

KCl	200 mg/l
NaCl	8000 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1150 mg/l

La suspensió cel·lular obtinguda es va centrifugar a 800 g durant 10 min i el dipòsit cel·lular es va resuspendre en medi de cultiu HAM-F12. El número de cèl·lules va ser comptat en una cambra de Neubauer (test d'exclusió en blau Tripán).

- 1- Aproximadament 200.000 condrocits van ser dipositats en flascons de cultiu



de 75 cm² de superfície amb 14 ml de medi de cultiu HAM F-12 suplementat amb sèrum boví fetal al 10 % (SBF). Es va canviar el medi de cultiu cada 2 o 3 dies, fins a que es té un número de cèl·lules suficient per distribuir i fer els experiments que es considerin oportuns posteriorment.

- 2- Es varen cultivar 100.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous (en el primer passi del cultiu) i es van deixar creixent

durant 7 dies. Es va canviar el medi cada 2 o 3 dies. Després van estar 48h deprivades amb medi HAM sense SBF, i tot seguit 48 hores més incubades amb les condicions comentades més endavant.

Els flascons i caixes es van mantenir en estufa a 37°C amb CO₂ al 5% en aire i humitat.



Es van fer un total de 5 cultius de cartílag de fetus humans. Aquests fetus es varen considerar control perquè no tenien cap patologia relacionada amb el creixement.

7.1.4 Tractaments realitzats en les cèl·lules en cultiu

Els tractaments que es van realitzar a les cèl·lules en cultiu van ser els indicats a la Taula 33:

1	Control
2	Vitamina D 10 ⁻⁷ M
3	GH recombinant comercial (Genotonorm) 0,5 µg/ml
4	GH WT 0,5 µg/ml
5	GH F25Y 0,5 µg/ml
6	GH V173L 0,5 µg/ml
7	Vitamina D 10 ⁻⁷ M + GH (Genotonorm) 0,5 µg/ml
8	Vitamina D 10 ⁻⁷ M + GH WT 0,5 µg/ml
9	Vitamina D 10 ⁻⁷ M + GH F25Y 0,5 µg/ml
10	Vitamina D 10 ⁻⁷ M + GH V173L 0,5 µg/ml

Taula 33. Relació de tractaments utilitzats en els cultius cel·lulars per estudiar la bioactivitat de les proteïnes recombinants.

Passades 48 hores es recullen les cèl·lules.

7.1.5 Recollida de les cèl·lules

Les cèl·lules es recullen de la següent manera:

1. Sempre es treballa sobre gel.
2. S'aspira el sobrenadant de cada pou.
3. Es renta amb 2 ml de PBS fred i estèril.
4. Es recuperen les cèl·lules per rascat i s'aspiren.
5. S'elimina el rentat per centrifugació.
6. Es centrifuguen durant 5 min a 690 x g. Es resuspenen amb 1 ml de solució I de tampó del kit d'extracció d'ARN (Qiagen). Aquesta solució conté preservadors que actuen contra les RNAses.

Durant tot aquest procés es mantenen les plaques, els tubs i el tampó en gel per fer tot el procés a 4°C i evitar l'alliberació de lisozims.

7.2 Estudi de la incorporació de timidina-³H a l'ADN dels condrocits en cultiu

La valoració de la incorporació de timidina-[³H] a l'ADN s'ha realitzat seguint una metodologia similar a la descrita per Madsen *et al.*, 1983, i Carrascosa *et al.*, 1985, consistent en:

1. Quan els condrocits en cultiu, en flascons de 75 cm², van arribar a la fase de confluència cel·lular, es van tripsinitzar i es van repartir 20000 cèl·lules/pou en plaques de 96 pous amb capacitat de 0,3 ml. S'hi va afegir 0,3 ml de medi HAM. D'aquesta manera les cèl·lules van estar 48 hores deprivades.



Tot seguit es van incubar amb 250 µl de les solucions esmentades anteriorment (Taula 33) durant 48 hores, i durant les darreres 24 hores es van afegir 50 µl de solució de timidina-[³H] (5 µCi/ml).

2. En finalitzar el període d'incubació, el medi de cultiu va ser aspirat, les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb àcid acètic al 2,5 % en aigua destil·lada i a continuació es van tractar amb Tritón X-100 (260 µl/pou) durant 10 min. Les cèl·lules es van recollir en filtres de fibra de vidre amb l'ajut d'un col·lector cel·lular múltiple tipus Mash II. Es va procedir a recollir els filtres que contenen les cèl·lules i en presència del líquid de

centelleig es va quantificar la radioactivitat en un comptador Beta (Iscap 300 Searle).

3. Els resultats van ser detectats com cpm de radioactivitat per a cada pou.
4. Cada condició va ser realitzada per quadruplicat.
5. El resultat es va expressar com el terme mitjà dels quadruplicats. Es va prendre el control com a 100% i els resultats de les altres condicions es van referir al control expressat com a percentatge sobre aquest.

7.3 Estudi d'expressió gènica regulada per les GHs recombinants

7.3.1 Extracció d'ARN total

Per extreure l'ARN total de les cèl·lules en cultiu es fa servir un mètode basat en l'extracció amb isotiocianat de guanidini. Es va utilitzar el mateix mètode que l'emprat per l'extracció d'ARN total a partir de leucòcits de sang perifèrica, com s'explica a l'apartat 2.2.2.

7.3.2 Retrotranscripció

La retrotranscripció es va fer amb el sistema de la *TaqMan ReverseTranscription Reagents (Applied Biosystems)*. Es va fer servir el mateix mètode que l'explicat en l'apartat 2.3.1.

7.3.3 Quantificació de l'expressió gènica

Per tal d'avaluar els nivells d'expressió d'un gen d'interès s'han desenvolupat diferents tècniques de quantificació. Una tècnica és la determinació semiquantitativa mitjançant l'amplificació del gen d'interès per PCR convencional, i després utilitzar tècniques d'imatge per quantificar el gen, sempre referint a un patró conegut. Un altre mètode és la PCR quantitativa a temps real, tècnica que es desenvoluparà més àmpliament en un altre apartat.

7.3.3.1 Determinació de l'expressió gènica pel mètode semiquantitatiu

Primer es fa la Retrotranscripció, com ja s'ha explicat a l'apartat 2.3.1, i seguidament es fan les PCRs convencionals pels gens d'interès. Per això s'estudien les seqüències dels gens i dels ARNm i es dissenyen encebadors per a cada un dels gens. També es fa per GAPDH i Ciclofilina, que van ser els gens control.

Es varen fer quatre experiments diferents per a cada línia cel·lular (HepG2 i C-28/I2), i els resultats són expressats com a mitja d'aquests quatre experiments.

D'aquesta manera, s'analitzen els següents gens: IGF1A, IGF1B, STAT5B, GHR, IGF1R, GAPDH i ciclofilina que serveixen com a control.

Els encebadors utilitzats per fer aquestes PCRs són els indicats a la Taula 34:

Encebador	Seqüència	Referència	Tamany
IGF1A s	5' CCCGCTGCTAAACACACTGC 3'		327 pb
IGF1A a	5' CCAGTCATTATTTTCTGGTTTC 3'		
IGF1A-458	5' CGGAGCTGTGATCTAAGGAG 3'		200 pb
IGF1A-658	5' TGTCACTCTTCACTCCTCAG 3'		
IGF1B s	5' GAAGGAAAGGTTGGCCAAAG 3'		254 pb
IGF1B a	5' CAGCAGGCCTACTTTTCTTC 3'		
GHR s	5' AGCAAGAAGGCAAAAATAGTTTGG 3'		251 pb
GHR a	5' AGGAGTCTGGGGAGGTATAAAAGG 3'		
IGF1R s	5' CATCAGCAGCATCAAAGAGG 3'		252 pb
IGF1R a	5' GTAAGGCTGTCTCTCGTCG 3'		
STAT5B s	5' CGCGACCTCTCCATCTTCAG 3'	Ambrosio <i>et al.</i> , 2002	150 pb
STAT5B a	5' CCACCATGCACAGAAACT 3'	Ambrosio <i>et al.</i> , 2002	
GAPDH s	5' GAAGGTGAAGTCCGGAGTC 3'		226 pb
GAPDH a	5' GAAGATGGTGATGGGATTTTC 3'		
CYC s	5' TGGTGACTTCACACGCCATAATG 3'	Aikawa <i>et al.</i> , 2005	255 pb
CYC a	5' ATTCCTGGACCCAAAGCGCTCC 3'	Aikawa <i>et al.</i> , 2005	

Taula 34. Encebadors utilitzats a les reaccions de PCR per determinar l'expressió gènica pel mètode semiquantitatiu.

S'utilitzaren dues metodologies:

1. S'utilitzà el sistema d'ECOGEN pels gens IGF1A, IGF1B, GHR, IGF1R i CYC. La metodologia per amplificar aquests gens es va posar a punt al nostre laboratori (Taula 35A)
2. Pel gen STAT5B es va fer servir el sistema XL Taq (*rTth ADN Polymerase* de Applied Biosystemes). S'utilitza aquesta metodologia perquè es fa segons el treball publicat per altres autors. (Taula 35B)

35A

ECOGEN	IGF1A, IGF1B, GHR, CYC, IGF1R	GAPDH
Tampó 10X	1,1 µl	
Mg (50 mM)	1,5 mM	
Encebador s 10 µM	2,25 µM	
Encebador a 10 µM	2,25 µM	
Taq (5U/µl)	0,5 U	
dNTPs (100 mM)	0,23 mM	
Mostra (cADN)	9 µl	0,5 µl
Aigua	-	8,5 µl
Volum total	11 µl	

35B

XL TAQ	STAT 5B
Tampó	3 µl
Mg(Oac) ₂ 25 mM	2 mM
Encebador s 105 µM	0,27 µM
Encebador a 15 µM	0,27 µM
XL Taq (2U/µl)	0,4 U
dNTPs (10 mM)	0,54 mM
Mostra (cADN)	1 µl
Aigua	5,5
Volum total	11 µl

Taula 35. En aquestes taules queden resumits dos tipus de reaccions que es van dur a terme per fer la determinació semiquantitativa. A la taula 35A es troba el sistema d'Ecogen, utilitzat per amplificar el gens IGF1A, IGF1B, GHR, IGF1R, CYC i GAPDH. A la taula 35B es troba el sistema que utilitza la XLTaq, per amplificar STAT5B.

Es fan 35 cicles del següent programa de temperatures (Taula 36):

35 CICLES			
DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
1 min 94°C	1 min 60°C	1 min 72 °C	7 min 72°C

Taula 36. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR.

Un cop acabada la reacció de PCR es van fer gels de poliacrilamida tal i com es va explicar a l'apartat 2.5.1. El marcador quantitatiu utilitzat és el *Precision Molecular Mass Standard* de *Bio Rad*.

Es van fer gels de poliacrilamida per a cadascun dels gens que es volien estudiar i pel gen control (GAPDH o ciclofilina). Després es van quantificar les bandes mitjançant el sistema d'anàlisi d'imatges de BIORAD. Un cop es van tenir quantificades totes les bandes, es va analitzar informàticament (programa informàtic Quantity One).

Els càlculs es van fer relativitzant els resultats obtinguts per a cada gen i per a cada condició diferent amb el gen triat com a control. D'aquesta manera es minimitzaven els errors provinents de la manipulació individual de la mostra. Després es va relativitzar respecte el control de cada grup de condicions. Al valor anomenat

CONTROL se li va donar el valor de 100, i tots els altres es van relativitzar a aquest. Així es van poder comparar cada sèrie d'experiments, assegurant-nos que es reduïen al màxim les variabilitats intra i interexperimentals.

7.3.3.2 Quantificació de l'expressió gènica per la tècnica de PCR a temps real

A la PCR a temps real, els processos d'amplificació i detecció es produeixen de manera simultània en el mateix pou o tub, sense necessitat de cap acció posterior (com una electroforesi en el cas de la PCR convencional). A més a més, mitjançant la detecció amb fluorescència es pot mesurar durant l'amplificació la quantitat d'ADN sintetitzat en cada moment, ja que l'emissió de fluorescència produïda a la reacció és proporcional a la quantitat d'ADN format. Això permet conèixer i registrar en tot moment la cinètica de la reacció d'amplificació. La principal diferència entre la PCR semiquantitativa i la PCR a temps real és que en aquesta última es compara el cicle a partir del qual es comença a observar amplificació del fragment d'interès, mentre que en la PCR convencional es comparen els nivells d'ADN assolits al final de la reacció de PCR. A la PCR a temps real podem obtenir una representació gràfica de la intensitat de fluorescència a cadascun dels cicles de la seqüència de la reacció de PCR, mentre que en la PCR convencional es fa una quantificació de l'ADN al final de la corba, on la reacció d'amplificació de l'ADN ha arribat a una saturació (aconseguint una baixa capacitat de discriminació de nivells d'ADN). A la PCR a temps real, com que s'obté la corba de tot el procés d'amplificació, es pot saber el punt on s'inicia l'amplificació de l'ADN (*Ct*, *threshold cycle*). Així és possible una major exactitud en la comparació de nivells d'ADN entre diferents mostres, doncs una diferència d'un cicle en l'inici de l'amplificació (*Ct*) suposa una diferència del doble en la concentració d'ADN.

Els termocicladors on es du a terme la PCR a temps real porten incorporat un lector de fluorescència i estan dissenyats per poder mesurar en qualsevol moment la fluorescència emesa en cada un dels tubs o pous on es realitzi l'amplificació.

Un dels avantatges de la PCR a temps real és la rapidesa, ja que no es necessita cap procés addicional de detecció. També té l'avantatge que en utilitzar sistemes tancats, el risc de contaminació disminueix de forma molt important.

Els sistemes de detecció per fluorescència utilitzats a la reacció de PCR a temps real poden ser de dos tipus: agents intercalants i sondes específiques marcades amb fluorocroms, dissenyades de manera especial.

7.3.3.2.1 Sistemes de detecció de la fluorescència

Agents intercalants: Són fluorocroms que augmenten la seva emissió de fluorescència quan s'uneixen a ADN de doble hèlix. El més utilitzat és el SYBR Green I. L'increment d'ADN que hi ha en cada cicle es reflecteix en un augment proporcional de la fluorescència emesa. Aquest sistema té l'avantatge que és més econòmic que les sondes específiques, i que el procés d'optimització de les reaccions és més fàcil.

Sondes d'hibridació específiques: Són sondes marcades amb dos tipus de fluorocroms, un donador i un acceptor. El procés es basa en la transferència d'energia fluorescent mitjançant ressonància (FRET) entre les dues molècules. Les més utilitzades són les sondes d'hidròlisi, anomenades *TaqMan* [que són les utilitzades per nosaltres amb el sistema *ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)*, les sondes *molecular beacons* i les sondes FRET].

Sondes d'hidròlisi. Són oligonucleòtids marcats amb un fluorocrom donador (*reporter*) a l'extrem 5' que emet fluorescència en ser excitat i un acceptor (*quencher*) a l'extrem 3' que absorbeix la fluorescència alliberada pel donador. Per a que això succeeixi, les molècules donadora i acceptora han d'estar espacialment pròximes. A més a més, l'espectre d'emissió de la primera s'ha de solapar amb l'espectre d'absorció de la segona. Mentre la sonda està intacta, la fluorescència emesa pel donador és absorbida per l'acceptor. En canvi, durant l'amplificació d'ADN, la sonda s'hibrida amb la seva cadena complementària. La Taq polimerasa (que té activitat 5' exonucleasa) hidrolitza l'extrem lliure 5' de la sonda quan la Taq es desplaça al llarg de la cadena durant la síntesi de l'ADN. Com ara el donador i l'acceptor estan espacialment allunyats, la fluorescència emesa pel primer és captada pel lector (Figura 29)

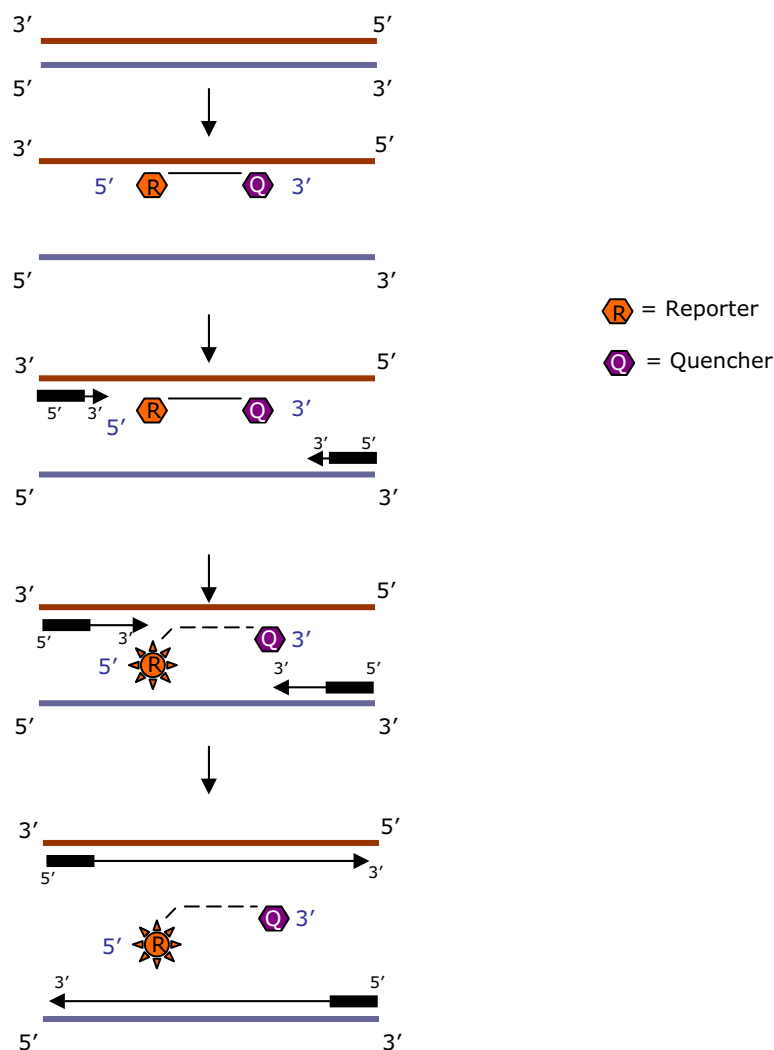


Figura 29. Representació esquemàtica del procés d'emissió de fluorescència de les sondes d'hidròlisi.

Molecular Beacons. Tenen una molècula donadora a l'extrem 5' i una acceptora a l'extrem 3' però, a més a més, tenen una estructura secundària en forma de nansa, on resideix la seqüència d'unió específica amb l'ADN diana. Els extrems es mantenen doblegats quan la sonda no està hibridada i d'aquesta manera el donador i l'acceptor estan molt a prop l'un de l'altre i la fluorescència emesa pel donador és absorbida per l'acceptor i no és captada pel lector de l'equip. En canvi, quan hibrida amb l'ADN diana, la sonda s'obre, allunyant-se el donador i l'acceptor, podent ser detectada la fluorescència emesa pel primer.

Sondes FRET. Són dues sondes que s'uneixen a seqüències adjacents a l'ADN diana. Una de les sondes porta un donador a l'extrem 3' i l'altre un acceptor a l'extrem 5'. Quan les sondes estan hibridades, els dos fluorocroms estan pròxims. En ser excitat, el donador transfereix la seva energia a l'acceptor que, al mateix temps, emet la fluorescència que detecta el lector de l'equip.

7.3.3.2.2 Quantificació de l'ADN diana de la mostra

A la PCR a temps real el programa informàtic va registrant l'increment de fluorescència (proporcional a l'augment d'ADN) a cada cicle, i aquesta informació es reflecteix gràficament en corbes de cinètica de la reacció per a cada una de les mostres i controls. Per a cada mostra el programa informàtic calcula el nombre de cicle en el que el lector comença a detectar un increment de fluorescència significatiu respecte al senyal de base. El cicle on es comença a detectar l'augment de fluorescència es denomina punt de tall (C_p , *crossing point*) o cicle llindar (C_t , *threshold cycle*) i és inversament proporcional a la concentració inicial d'ADN diana present a la mostra. Amb les concentracions prèviament conegudes dels controls externs i els seus C_p corresponents es dibuixa una corba patró. Interpolant en ells els valors de C_p de cada mostra problema es pot saber la seva concentració d'ADN inicial.

La quantificació relativa es pot realitzar pel mètode de la corba estàndard i el mètode de comparació de C_t o $\Delta\Delta C_t$. Nosaltres vam utilitzar el darrer:

- **Mètode de comparació de C_t o $\Delta\Delta C_t$.** Quan l'eficiència d'amplificació dels gens en estudi és semblant a la del control endogen (les corbes estàndards del gen problema i la del control endogen) en l'interval de les concentracions de l'ADN en estudi, el mètode emprat per la comparació del C_t de les diferents mostres és el delta delta C_t . En aquest mètode es compara el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ d'entre mostres que s'obté d'aplicar la següent fórmula:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{mostra}) - \Delta C_t (\text{calibradora})$$

ΔC_t : C_t gen diana
- C_t gen endògen

En el nostre cas, la mostra calibradora és la mostra que no porta cap tractament i que anomenem control.

Com ja es va dir anteriorment, el sistema utilitzat és el d'*Applied Biosystems*, i conseqüentment s'utilitza el sistema **TaqMan Universal PCR Master Mix** de la mateixa casa comercial per fer la PCR a temps real.

El kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* conté:

TaqMan Universal PCR MAster Mix, que ve comercialitzada a una concentració 2X. La barreja és optimitzada per fer aquestes reaccions ja que conté la *AmpliAq Gold ADN polimerasa*, *AmpErase UNG*, *dNTPs* amb *dUTP*, *Passive Reference*, i els components del tampó optimitzats.

- *AmpliAq Gold*[®] ADN polimerasa per tal d'eliminar la sonda TaqMan[®] durant la PCR. Aquesta Taq conté activitat 5' exonucleasa que pot eliminar el terminador reporter que conté la sonda a l'extrem 5', i el terminador *quencher* que conté a l'extrem 3'. En canvi, no conté activitat 3'-5' exonucleasa.

- *AmpErase*[®] uracil-N-glicosilasa (UNG). El tractament amb *AmpErase UNG* pot prevenir la reamplificació de productes de PCR que no es vulguin amplificar i que es vagin arrossegant d'altres reaccions que s'hagin fet anteriorment. La UNG elimina el fosfodièster de l'ADN que conté uracil, però no té cap efecte en l'ADN que conté timina. Això fa que es bloquegi l'acció de la replicació de les DNA polimerases, i que aquest ADN sigui molt làbil a les hidròlisis àcid/base. Com que la UNG no reacciona amb la *dUTP* i també és inactivat amb calor, això fa que sigui molt útil per les reaccions de PCR que es fan amb contaminants d'uracil enlloc de timines.

Assays on Demand

Cada *Assay-on-Demand Gene Expression Assay* consisteix en dos encebadors no marcats i una sonda marcada amb un terminador FAM[™] TaqMan[®] MGB (*minor groove binder*). S'anomena *TaqMan probe* i conté un oligonucleòtid amb un terminador fluorescent a l'extrem 5' (reporter) i un altre a l'extrem 3' (quencher). El que està situat a l'extrem 5' pot ser FAM[™], TET[™] o VIC[™]. (En el nostre cas serà FAM[™]). Aquests terminadors estan covalentment units a l'extrem. Cadascun dels reporters estan units a un terminador TAMRA[™] a l'extrem 3' que no és fluorescent.

Les sondes MGB augmenten la *T_m* ja que s'uneixen al *loop* menor dels dúplex d'ADN. D'aquesta manera permet l'ús de sondes molt curtes (de 13 pb). Això permet un millor disseny dels encebadors i de la sonda, i augmenta l'especificitat així com la flexibilitat a l'hora de dissenyar els *assays*. Un altre avantatge és que no s'utilitza un terminador *quencher* fluorescent, amb la qual cosa s'elimina el *background* fluorescent associat a altres mètodes que utilitzen *quenchers* fluorescents. Una altra característica dels *Assays-on-demand* és que tots estan dissenyats a una concentració universal (900 nM els encebadors, i a 250 nM la

sonda). També estan dissenyats perquè tots els *assays* puguin ser utilitzats a les mateixes condicions de PCR (d'aquesta manera es poden fer diferents experiments a la mateixa placa de PCR, on s'hi poden posar fins a 96 mostres).

Els *assays* utilitzats en aquest projecte han estat els indicats a la Taula 37:

Gen		Assay ID
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Hs00153126_m1
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	Hs00560035_m1
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Hs00609566_m1
GHR	Growth hormone receptor	Hs00174872_m1
CYC	Cyclophilin A (PPIA), MGB	4326316E (TaqMan Endogenous Control)

Taula 37. Taula on es mostra la relació dels *assays* utilitzats així com el Assay ID.

El cicle de temperatures pel qual estan dissenyats aquests *assays* és l'indicat a la Taula 38:

TEMPS I TEMPERATURES			
ETAPA	DESNATURALITZACIÓ INICIAL	40 CICLES	
		DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ/EXTENSIÓ
Activació UNG 2 min 50°C	10 min 95°C	15 seg 95°C	1 min 60°C

Taula 38. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR en el cas dels *Assays on Demand*.

Per tal de saber si el mètode funciona bé, es comença fent una corba de dilucions del cADN per veure que realment en aquell rang és lineal la concentració respecte la senyal de luminiscència que dóna l'aparell, tant pel control endogen com per als gens que volem estudiar.

S'estudia l'expressió dels gens IGF1, GHR, STAT5B, IGF1R i la Cyc (gen endogen).

Un cop es va comprovar que, efectivament, la resposta era lineal tant pel control endogen com pels gens que es volien estudiar, es va passar a fer el mètode del $\Delta\Delta Ct$.

En el nostre cas vàrem fer una quantificació relativa, ja que no vam utilitzar una corba patró per determinar la quantitat absoluta de cADN que teníem. Es va utilitzar un control endogen que s'amplifica de la mateixa manera a totes les mostres, i després es va comparar amb l'amplificació del gen que realment volíem estudiar. Es va normalitzar respecte aquest gen per a totes les mostres (per eliminar petites diferències de concentració de partida d'ADNc).

Sempre es fan triplicats de cada mostra, i el resultat de Ct es dóna com a la mitja dels tres. En cada placa sempre s'analitza cada mostra pel gen que es vol estudiar i pel gen endogen (Cyc).

Els valors de Ct dels diferents gens es determinaren i es normalitzaren amb el gen constitutiu Ciclofilina.

La mostra calibradora en el nostre cas és la mostra control que no té cap tractament.

8. ESTUDI D'UN POLIMORFISME DEL RECEPTOR DE GH: deleció de l'exó 3

Es va analitzar el polimorfisme que inclou o exclou l'exó 3 del Receptor de GH [formes fl-GHR (full length) o d3-GHR (del3)] en les cèl·lules condrocítiques (condrocits de cartílag epifiseal fetal).

8.1 Anàlisi del polimorfisme d3/fl-GHR a partir d'ADN

A partir de l'ADN extret de precipitats de condrocits fetals utilitzats per fer cada un dels cinc experiments descrits a l'apartat 7.1.4, es va estudiar el polimorfisme del gen GHR abans comentat.

Es va utilitzar la metodologia descrita per Pantel *et al.*, 2000 amb algunes modificacions.

Aquests autors fan una PCR competitiva utilitzant 3 encebadors anomenats G1, G2 i G3. L'esquema dels encebadors és indicat a la Figura 30:

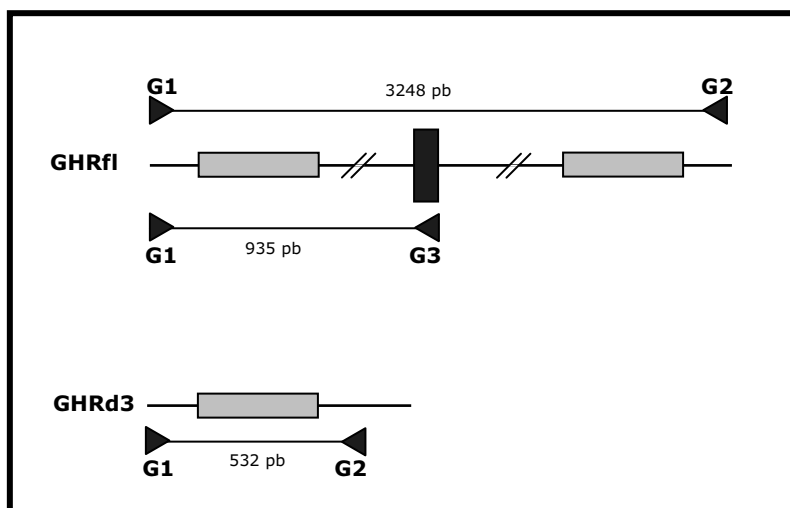


Figura 30. Representació esquemàtica de la regió fl-GHR que inclou l'Exó 3 (en negre) i els elements repetitius (en gris). L'al·lel GHRd3 conté una única còpia de la regió repetitiva (en gris). A l'esquema es marquen les posicions dels encebadors. Aquesta figura està extreta del treball realitzat per Pantel *et al.*

La modificació ha consistit en que quan un homozigot d3/d3 era detectat, es realitzava una segona PCR utilitzant només els encebadors G1 i G3 per descartar que es tractés d'un heterozigot en el que la banda gran no s'amplificava correctament.

Tots els resultats es van confirmar per electroforesi en gel d'agarosa.

Es va utilitzar el sistema de *Finnzymes Phusion™ High-Fidelity PCR kit*.

En la Taula 39 es mostren els components de la barreja de reacció:

Components	Concentració Final
5X Phusion HF Buffer	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM
Encebador G1 15 μM	0,3 μM
Encebador G2 15 μM	0,3 μM
Encebador G3 15 μM	0,3 μM
Phusion ADN polimerasa 2 U/μl	0,01 U/μl
dNTPs 10 mM	200 μM
ADN	200 ng
H ₂ O	X μl
Volum Total	50 μl

Taula 39. Taula dels components utilitzats a la reacció de PCR per amplificar el gen GHR i concentració final de la mescla de reacció.

Els encebadors utilitzats van ser els indicats a la Taula 40:

Nom	Seqüència	Referència
G1	5' TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG 3'	Pantel <i>et al.</i> , 2000
G2	5' AGTCGTTCTGGGACAGAGA 3'	Pantel <i>et al.</i> , 2000
G3	5' CCTGGATTAACACTTTGCAGACTC 3'	Pantel <i>et al.</i> , 2000

Taula 40. Encebadors utilitzats per analitzar el polimorfisme GHRd3 de GHR.

I el cicle de temperatures va ser l'indicat a la Taula 41:

35 CICLES				
DESNATURALITZACIÓ	DESNATURALITZACIÓ	HIBRIDACIÓ	EXTENSIÓ	EXTENSIÓ FINAL
30 seg 98°C	10 seg 98°C	30 seg 60°C	1,5 min 72°C	7 min 72°C

Taula 41. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR per amplificar el gen GHR.

I els resultats esperats per a cada tipus de polimorfisme es resumeixen en la Taula 42:

Polimorfisme del gen GHR	Encebadors	Tamany de la Banda
Homozigot per a la deleció (GHRd3)	G1-G2-G3	532 pb
		-
Homozigot per a la no deleció (GHRfl)	G1-G2-G3	-
		935 pb
Heterozigot per a la deleció (GHRd3/GHRfl)	G1-G2-G3	532 pb
		935 pb

Taula 42. Tamany de les bandes que s'han d'amplificar per a cada un dels polimorfismes del gen GHR.

8.2 Anàlisi del polimorfisme d3/fl-GHR a partir d'ARN

Es van confirmar els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi de l'ADN amb la tècnica de RT-PCR a partir de l'ARN extret dels condrocits humans utilitzats per analitzar la resposta d'aquestes cèl·lules a les proteïnes recombinants.

Els components de la reacció de PCR són indicats a la Taula 43:

Components	Concentració Final
2xMix (0,4 mM dNTPs, 2,4 mM MgSO ₄)	1X
Encebador sentit	0,75 µM
Encebador antisentit	0,75 µM
RT/ Platinum Taq Mix	0,5 µl
Aigua	
cADN	1 µl
Volum Total	10 µl

Taula 43. Components per a la reacció de RT-PCR per analitzar el polimorfisme d3/fl-GHR a partir d'ARN. El sistema utilitzat és el *SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq* (Invitrogen Life Technologies).

Els encebadors utilitzats van ser els indicats a la Taula 44:

Nom	Seqüència	Referència
mGHR 2s	5' GGTATGGATCTCTGGCAGC 3'	Mercado <i>et al.</i> 1994
mGHR+3s	5' GAGTCTGCAAAGTGTTAATCC 3'	Mercado <i>et al.</i> 1994
mGHR 4a	5' CAGCTGTATGGGTCCTAGG 3'	Mercado <i>et al.</i> 1994

Taula 44. Encebadors utilitzats per detectar el polimorfisme GHRd3 del gen GHR a partir d'una mostra d'ARN missatger.

I el programa de temperatures va ser l'indicat a la Taula 45:

40 cicles					
Retrotranscripció	Desnaturalització	Desnaturalització	Acoblament	Extensió	Extensió final
30 min 50°C	3 min 94°C	1 min 94°C	1 min 52°C	1 min 72°C	7 min 72°C

Taula 45. Cicle de temps i temperatures realitzats per dur a terme la reacció de PCR per a amplificar el polimorfisme d3/fl-GHR.

Per tal de comprovar que les bandes corresponien als trànscrips teòrics, es va realitzar la seqüenciació automàtica del producte amplificat amb els encebadors mGHR 3s i mGHR 4a. A la Taula 46 es mostra el resum dels tamanys teòrics dels trànscrips amplificats:

Polimorfisme	Encebadors	Tamany de les bandes
Homozigot per a la deleció (GHRd3)	mGHR 2s- mGHR 4a	189 pb
	mGHR 3s- mGHR 4a	-
Homozigot per a la no deleció (GHRfl)	mGHR 2s- mGHR 4a	255 pb
	mGHR 3s- mGHR 4a	151 pb
Heterozigot per a la deleció (GHRd3/GHRfl)	mGHR 2s- mGHR 4a	189 pb /255 pb
	mGHR 3s- mGHR 4a	151 pb

Taula 46. Tamany dels trànscrips teòrics de les bandes d'un gel de poliacrilamida per a cada tipus de polimorfisme d3/fl-GHR.

9. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic de la quantificació de l'expressió dels gens IGF1, IGF1R, GHR i STAT5B en els diferents cultius cel·lulars sota estímul de l'hormona GH es va realitzar amb el programa StatView 4.5. Es va aplicar el test-t de Wilcoxon. Els resultats són expressats com la mitja \pm error estàndard.

El test de Wilcoxon és un test no-paramètric que s'utilitza de manera alternativa al paired Student's t-test per mostres relacionades. S'utilitza quan no es té una distribució normal dels resultats.

10. ANÀLISI INFORMÀTIC DE LES SEQÜÈNCIES

Durant tot el treball s'han utilitzat diferents programes informàtics que es resumeixen en aquest apartat.

- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Les seqüències de nucleòtids del gen GH1 obtingudes van ser analitzades informàticament per tal de reconèixer possibles mutacions i canvis en els polimorfismes.

- BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

En aquesta pàgina web es va poder comparar la seqüència de nucleòtids obtinguts en l'apartat anterior, amb una seqüència del gen GH1 patró obtinguda al GenBank, que té el número de GI 183148 (seqüència de referència, RefSeq).

També s'utilitzà aquesta pàgina web per dissenyar els encebadors utilitzats en el projecte, intentant dissenyar els encebadors sobre seqüències conegudes d'ARN o ADN dels gens d'interès.

-ORFfinder (Open reading frame finder): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>
Es va utilitzar aquesta eina informàtica per localitzar possibles ORF (*open reading frame*) i d'aquesta manera buscar quines proteïnes teòriques es podien derivar dels trànscrips anòmals que es van trobar.

- ESEFinder <http://exon.cshl.org/ESE>. Aquesta eina informàtica serveix per localitzar llocs ESE (*exonic splicing enhancer*). (Cartegni *et al.*, 2003).

- ICM molecular modelling software suite (Molsoft LLC, San Diego, CA). S'utilitza aquest software per visualitzar la proteïna GH així com el seu receptor, i les diferents interaccions que tenen lloc entre elles. La pàgina web on es pot trobar el software és la següent: <http://www.molsoft.com>

- Es va utilitzar el ClustalW per fer els alineaments múltiples. L'adreça de la pàgina web és la següent: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (Thompson *et al.*, 1994).

- Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 2.1) (Kumar *et al.*, 2001). S'utilitza per realitzar els arbres filogenètics de l'Hormona de Creixement. La pàgina web on es pot trobar és la següent: <http://www.megasoftware.net>

RESULTATS

1. CARACTERITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA DEL GEN GH1 EN ADN DE POBLACIÓ CONTROL I DE PACIENTS. DETERMINACIÓ DE MUTACIONS AMB CANVI D'AMINOÀCID

1.1 Estudi de la població control

Es va seqüenciar el gen GH1 de la població de controls per tal d'establir el mapa de polimorfismes d'aquest gen i d'aquesta manera, en seqüenciar el gen GH1 de la població de pacients, poder diferenciar entre els punts que són polimòrfics dels que es consideren mutacions.

La Taula 47 resumeix els punts que contenen una variabilitat superior a l'1%, així com les proporcions dels canvis en la nostra població control (Esteban *et al.*, 2006).

Freqüències de genotips als punts considerats SNPs del gen GH1						
Posició ^(a)	Regió funcional ^(b)	Localització ^(c)	Nucleòtid ^(d)	Percentatge		
				Homozigot GI 183148	Heterozigot	Homozigot alternatiu
P1 = 4825		Promotor	G-del	95.1	4.9	0
P2 = 4856		Promotor	T-G	5.2	32.9	61.9
P3 = 4863		Promotor	T-G	5.2	32.6	62.2
P4 = 4886		Promotor	G-T	31.6	50.8	17.6
P5 = 4996		Promotor	T-C	97.1	2.9	0
P6 = 5089	Pit 1p RE	Promotor	A-G	72.6	24.4	3.0
P7 = 5107	VDR/RA/T3 RE	Promotor	G-T	39.7	48.9	11.4
P8 = 5116	VDR/RA/T3 RE	Promotor	G-A	98.7	1.3	0
P9 = 5131	TATA box	Promotor	G-del	84.1	14.0	1.9
P10 = 5157		Promotor	A-G	27.7	49.8	22.5
P11 = 5162		Promotor	A-T-C	81.4	16.9 (AT) / 0.9 (AC)	0.6 (TT)
P12 = 5178		5' UTR	A-G	94.1	5.9	0
P13 = 5187		5' UTR	A-C	94.8	5.2	0
P14 = 5221		5' UTR	G-T	0	6.5	93.5
P15 = 5231	Thr 3 Ala/Pro	Exó I	A-G-C	96.4	3.3 (AG) / 0.3 (AC)	0
P16 = 5286		Intró I	A-G	98.1	1.9	0
P17 = 5290		Intró I	A-T	98.4	1.6	0
P18 = 5443		Intró I	T-C	94.5	5.5	0
P19 = 5681		Intró II	A-T	98.1	1.9	0
P20 = 5686		Intró II	G-A	98.3	1.7	0
P21 = 6191	Val 110 Ile	Exó IV	G-A	98.4	1.6	0
P22 = 6232	Thr 123	Exó IV	G-A	97.1	2.9	0
P23 = 6263		Intró IV	C-T	95.8	3.9	0.3
P24 = 6331		Intró IV	T-A	27.7	54.4	17.9
P25 = 6358		Intró IV	T-G	98.1	1.9	0

Taula 47. Freqüències de genotips als punts considerats SNPs del gen GH1 en la població control

- (a) Els SNPs són identificats correlativament des de P1 a P25. S'identifica la numeració corresponent al nº accés al GenBank GI 183148.
- (b) Elements de resposta prèviament descrits en la regió promotora del gen GH1. Tres SNPs estan localitzats en codons.
- (c) Localització dins el gen.
- (d) Nucleòtids trobats en aquesta posició.

S'han trobat 25 punts polimòrfics al llarg del gen (Taula 47), tres dels quals es troben en exons (P15, P21 i P22), i dos d'ells provoquen substitució d'aminoàcid quan conté el nucleòtid pel canvi.

1.2 Estudi dels pacients de l'Hospital Materno-infantil Vall d'Hebron

En els 475 pacients índex de l'Hospital Vall d'Hebron s'han detectat en el gen GH1 canvis diferents dels SNPs de la població control en 45 pacients índex (9,5%). Els canvis trobats en la població de pacients i que no es troben en la població de controls es mostren a la Taula 48. Entre els canvis, els que afecten un nucleòtid que prediu un canvi d'aminoàcid es troben en 6 pacients índex (13,3% dels canvis i 1,2% dels pacients). Els canvis d'aminoàcid estan indicats a la Taula 49.

Mutacions trobades en els pacients de l'Hospital Vall d'Hebron		
Posició de la Mutació al GenBank GI:183148	Localització	Nº de casos
4688 G>A	Promotor	3
4695 C>G + 5123-5130 Recombinació GAACT amb gen CS-2 o CS-5	Promotor	1
4804 A>G	Promotor	1
4804 A>G + 5306 G>A + 5354 G>C + 5758 C>T + 6377 G>A	Promotor+I1+I1+I2+I4	1
4812 T>G	Promotor	1
4855 C>T + 5103-5107 deleció en heterozigosi	Promotor	1
4856 G>C + 4850 T>G + 4837 C>T	Promotor	1
4859 G>C	Promotor	2 (1 família)
4871 G>A + 4875 C>A	Promotor	1
4903 G>C + 4907 C>A	Promotor	1
4937 C>T	Promotor	1
5162 A>C + 5165 G<C	Promotor + 5'UTR	2
5162 A>C + 5165 G<C + 5985 G>A	Promotor + 5'UTR +I3	1
5220 C>T	5' UTR	1
5266 T>C	Intró 1	1
5318 C>del + 5910 A>G [Asn47Asp]	Intró 1 + Exó 3	1
5354 G>C + 6298 G>A	Intró 1 + Intró 4	1
5608 C>T [Arg16Cys]	Exó 2	1
5618 G>A [Arg19His]	Exó 2	1
5634 C>A + 5636 T>A [Phe25Tyr] + 6409 A>del	Exó 2 + Exó 2 + Intró 4	3 (2 famílies)
5679 G>C	Intró 2	6
5795 G>C	Intró 2	1
6056 A>C + 6061 C>G	Intró 3	5
6118 G>A	Exó 4	1
6337 C>G	Intró 4	1
6344 C>T	Intró 4	2
6427 A>G	Intró 4	3 (2 famílies)
6453 A>G	Intró 4	2 (1 família)
6461 G>A	Intró 4	1
6653 C>G [Ile179Met]	Exó 5	1

Taula 48. Canvis trobats en la seqüència del gen GH1 diferents dels SNPs de la població control en els pacients de l'Hospital Vall d'Hebron.

Canvis d'aminoàcid trobats a pacients de l'Hospital Vall d'Hebron				
Posició	Mutació	Localització	Nº de casos	Referències a la literatura
5608 C>T	Arg16Cys	Exó 2	1 pacient	Millar <i>et al.</i> , 2003
5618 G>A	Arg19Hys	Exó 2	1 pacient	-
5636 T>A	Phe25Tyr	Exó 2	3 pacients de 2 famílies	-
5910 A>G	Asn47Asp	Exó 3	1 pacient	Millar <i>et al.</i> , 2003
6653 C>G	Ile179Leu	Exó 5	1 pacient	-

Taula 49. Substitucions en la seqüència de l'ADN del gen GH1 que prediuen un canvi d'aminoàcid en els pacients de l'Hospital Vall d'Hebron. Es descriu en quina part del gen es troba la mutació així com el nombre de pacients que presenten aquest canvi i en el cas que la mutació hagi estat descrita, la referència bibliogràfica.

1.3 Estudi dels pacients amb RIUC, talla baixa i sense deficiència de secreció de GH

En els 253 pacients de l'Assaig Clínic amb número de Registre 56/2001 s'han detectat en el gen GH1 canvis diferents dels SNPs de la població control en 32 pacients (12,6%) que es mostren a la Taula 50. Entre els canvis, els que afecten un nucleòtid que prediu un canvi d'aminoàcid es troben en 3 pacients (9,4% dels canvis i 1,2% dels pacients). Aquestes substitucions es resumeixen a la Taula 51.

Mutacions trobades en els pacients amb RIUC		
Posició de la Mutació al GenBank GI:183148	Localització	Nº de casos
4804 A>G	Promotor	1
4850 T>G + 4856 C>G + 4861 G>A	Promotor	1
Recombinació CS5	Promotor	1
5111-5125:GCAGGGAGAGAGAACT	Promotor	1
5165 G>C	5'UTR	4
5165 G>C + 5354 G>C	5'UTR + Intró 1	1
5165 G>C + 6056 A>C + 6061C<G	Intró 1 + Intró 3	1
5266 T>C	Intró 1	1
5354 G>C + 6056 A>C + 6061C<G	Intró 1 + Intró 3	1
5414: inserció AGAA	Intró 1	1
5608 C>T [Arg16Cys]	Exó 2	1
5679 G>C	Intró 2	3
5690 G>A	Intró 2	1
6056 A>C + 6061C<G	Intró 3	3
6190 C>T	Exó 4	1
6337 C>G	Intró 4	1
6344 C>T	Intró 4	3
6427 A>G	Intró 4	1
6431 A>G	Intró 4	1
6453 A>G	Intró 4	2
6633 G>C [Val173Leu]	Exó 5	1
6653 C>G [Ile179Met]	Exó 5	1

Taula 50. Canvis trobats en el gen GH1 a la població de pacients amb RIUC diferents dels SNPs de la població control. Es mostren les localitzacions de les substitucions així com el número de casos trobats.

Canvis d'aminoàcid trobats als pacients amb RIUC				
Posició	Mutació	Localització	Nº de casos	Referències a la literatura
5608 C>T	Arg16Cys	Exó 2	1 pacient	Millar <i>et al.</i> , 2003
6633 G>C	Val173Leu	Exó 5	1 pacient	-
6653 C>G	Ile179Met	Exó 5	1 pacient	Lewis <i>et al.</i> , 2004

Taula 51. Substitucions en la seqüència del DNA del gen GH1 que prediuen un canvi d'aminoàcid en els pacients amb RIUC. Es descriu en quina part del gen es troba la mutació així com el nombre de pacients que presenten aquest canvi i en el cas que la mutació hagi estat descrita, la referència bibliogràfica.

1.4 Estudi del canvi que comporta la mutació F25Y

Entre la població de pacients de l'Hospital Vall d'Hebron (Taula 48), es van trobar dues famílies que presentaven una substitució en la seqüència de nucleòtids que predeia un canvi d'aminoàcid a la proteïna a part d'altres dos canvis que no provoquen substitució d'aminoàcid. Aquestes substitucions no es trobaven en controls i a més a més anaven acompanyades d'un fenotip de talla baixa, la qual cosa podia fer suposar que la causa de la talla baixa en aquests pacients eren els canvis que tenien a la seqüència del seu gen GH1.

La Taula 52 mostra els haplotips del gen GH1 per els SNPs descrits per Esteban *et al.*, 2006 en els tres pacients i en els pares d'una de les dues famílies així com els tres canvis en la seqüència diferents dels SNPs que s'inclouen en el mateix al·lel compartit per els tres pacients i el pare d'una de les famílies.

POSICIÓ AL GENBANK GI:183148	LOCALITZACIÓ	HAPLOTIPS DEL GEN GH1 PER ALS CASOS DESCRITS (NUCLEOTIDS TROBATS EN LES POSICIONS CORRESPONENTS)											
		FAMÍLIA 1						FAMÍLIA 2					
		PACIENT 1		PARE		MARE		PACIENT 2		PACIENT 3			
P1 4825	Promotor	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
P2 4856	Promotor	G	G	T	G	G	G	T	G	T	G	T	G
P3 4863	Promotor	G	G	T	G	G	G	T	G	T	G	T	G
P4 4886	Promotor	T	G	G	G	T	T	G	G	G	G	T	G
P5 4996	Promotor	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
P6 5089	Promotor	G	A	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A
P7 5107	Promotor	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
P8 5116	Promotor	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
P9 5131	Promotor	del	G	G	G	G	del	G	G	G	G	G	G
P10 5157	Promotor	A	G	G	G	G	A	A	G	A	G	A	G
P11 5162	Promotor	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P12 5178	5' UTR	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P13 5187	5' UTR	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P14 5221	5' UTR	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
P15 5231	Exó I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P16 5286	Intró I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P17 5290	Intró I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P18 5443	Intró I	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
P19 5681	Intró II	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P20 5686	Intró II	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
P21 6191	Exó IV	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
P22 6232	Exó IV	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
P23 6263	Intró IV	T	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
P24 6331	Intró IV	A	T	T	T	A	A	T	T	T	T	T	T
P25 6358	Intró IV	T	T	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T
ALTRES CANVIS													
5634	Exó 2	C	A	C	A	C	C	C	A	C	A	C	A
5636(Phe25Tyr)	Exó 2	T	A	T	A	T	T	T	A	T	A	T	A
6409	Intró 4	A	del	A	del	A	A	A	del	A	del	A	del
HAPLOTIP DEL PROMOTOR SEGONS HORAN ET AL. ⁽¹⁾		-	-	8	-	5	-	3	-	3	-	3	-
HAPLOTIP SEGONS LA NOSTRA NOMENCLATURA ⁽²⁾		B	M1	C	M1	D	B	A	M1	A	M1	A	M1

Taula 52. Haplotips pels punts considerats polimòrfics en la població control en 5 persones de dues famílies diferents i canvis trobats a la seqüència de l'ADN que no es troben a la població i són considerats mutacions. Totes aquestes persones tenen el canvi F25Y.

⁽¹⁾El promotor n°8 representa el 1,9% dels haplotips estudiats per Horan *et al.*, i produeix un lleu augment del nivell de l'expressió del gen (sempre en comparació amb l'haplotip 1). En canvi el promotor n°5 el presenten el 4,2% dels haplotips estudiats i produeix una reducció de l'expressió del gen (aproximadament del 47%). L'haplotip n° 3 que el porten els dos nens de la Família 2 el presenten el 16,2% dels haplotips estudiats i produeix una reducció de l'expressió del gen (aproximadament del 68%). Els altres haplotips no són descrits per aquests autors.

⁽²⁾En aquesta columna es vol destacar que els al·lels que porten els canvis tenen el mateix haplotip en les dues famílies (M1).

La Figura 31 mostra els electroferogrames amb el canvi en heterozigosi (Phe25Tyr) així com els altres dos canvis descrits a la Taula 52.

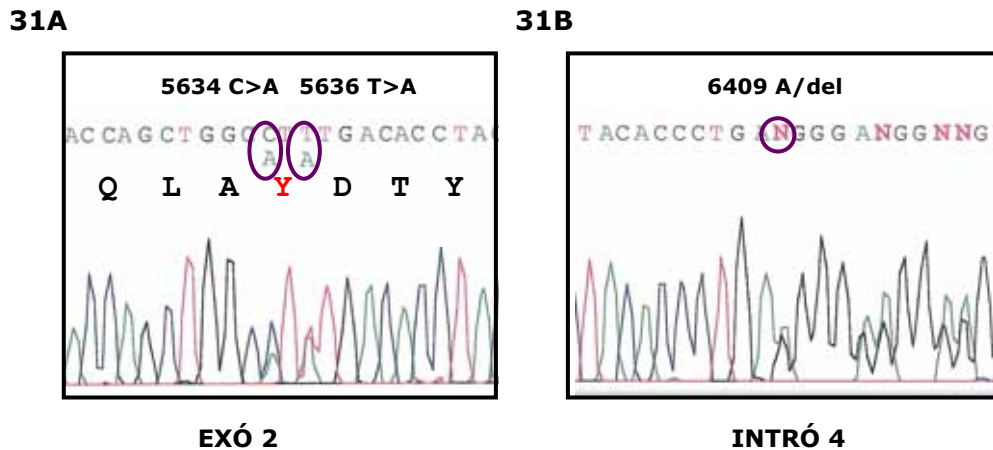
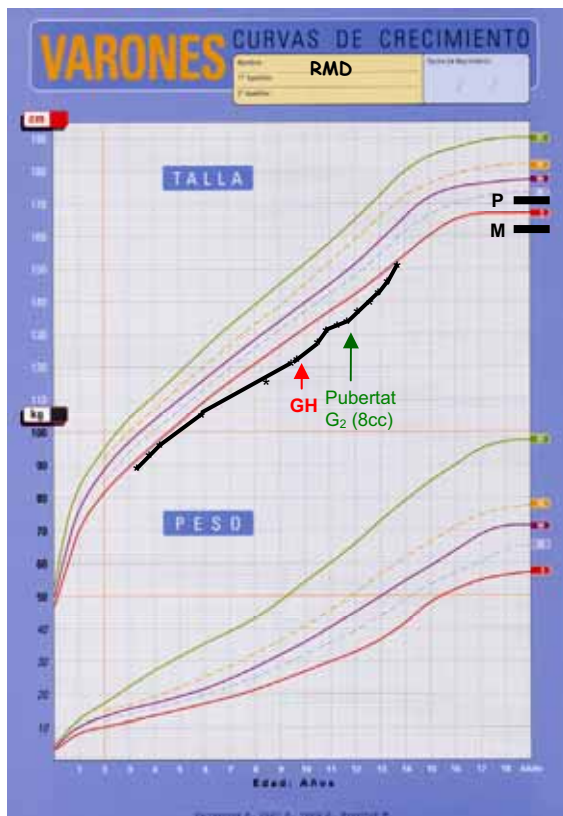


Figura 31. Electroferogrames amb els canvis trobats en heterozigosi en el gen GH1 i que són canvis que no porta la població control. A l'electroferograma 31A es mostren els canvis a les posicions 5634 i 5636, i al 31B es mostra la deleció en heterozigosi al punt 6409. Correspon a la seqüència de l'amplificació a partir d'ADN genòmic mitjançant la tècnica de PCR del gen GH1 d'aquests pacients.

1.4.1 Clínica dels pacients amb el canvi F25Y

Les Figures 32, 33 i 34 mostren l'evolució de les corbes de creixement del Pacient 1 de la Família 1 i els Pacients 2 i 3 de la Família 2 representades sobre les corbes de creixement de la població actual de l'àrea de Barcelona (Carrascosa *et al.*, 2004), així com les talles dels pares corresponents i l'efecte de l'administració de GH exògena.

Família 1. Pacient 1



Proves de secreció de GH	GH (pic màxim)	IGF1	Edat
L-Dopa	1,6 ng/ml	83,6 ng/ml (-2,1 SDS)	8 ^(6/12) anys
*HI	4,7 ng/ml		9 ^(7/12) anys

*HI: hipoglucèmia insulínica

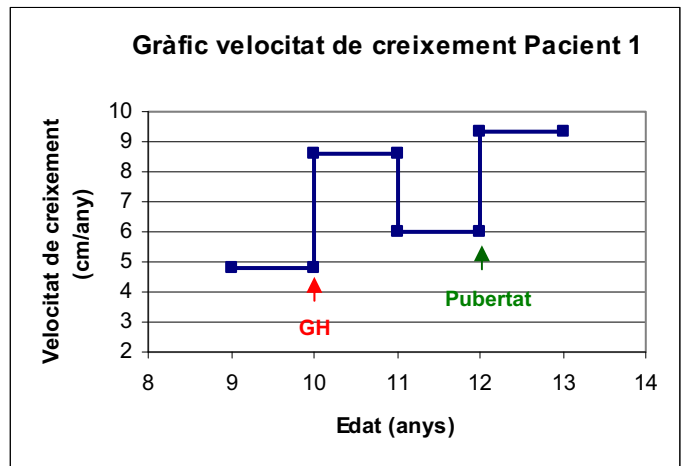
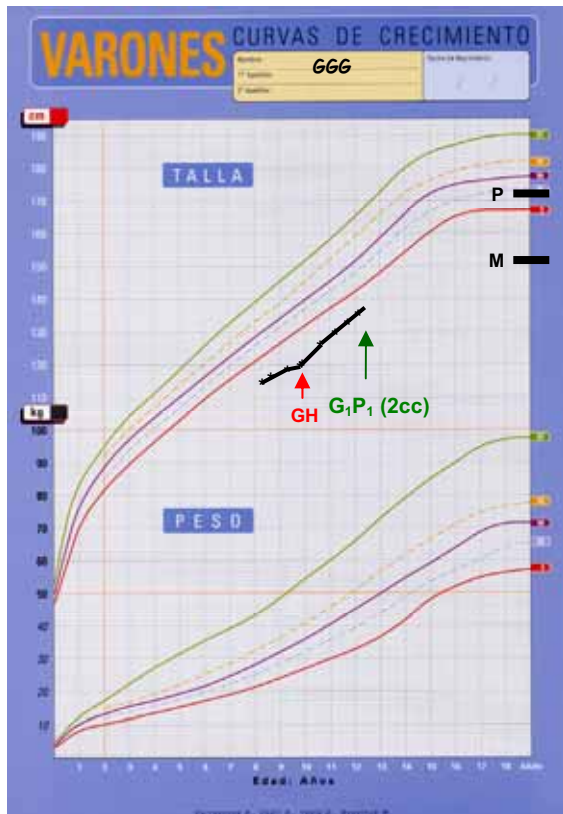


Figura 32. Corba de creixement del Pacient 1 de la Família 1, taula resum de diferents proves realitzades a aquest pacient i gràfic on es mostra la velocitat de creixement del Pacient 1.

El Pacient 1 té uns valors de GH sota estímulo disminuïts (una prova inferior a 10 ng/ml es considera que correspon a una deficiència de GH). Es va administrar GH exògena a partir dels 9 anys i 11 mesos. Com es pot veure hi ha una ràpida recuperació de la velocitat de creixement en el primer any. Aquest pacient encara es troba en seguiment.

A la Família 1 el pare és el portador de l'al·lel afectat.

Família 2. Pacient 2



Proves de Secreció de GH	GH (pic màxim)	IGF1	Edat
L-Dopa	11,1 ng/ml		8 ^(11/12) anys
HI	5,9 ng/ml		8 ^(11/12) anys
		126,7 ng/ml (-1,65 SDS)	9 ^(4/12) anys

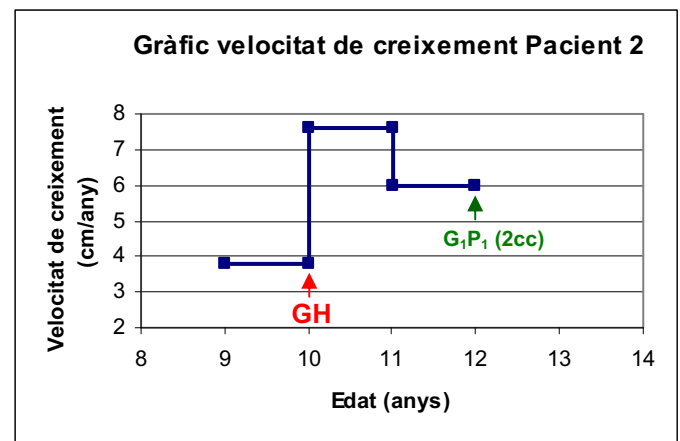
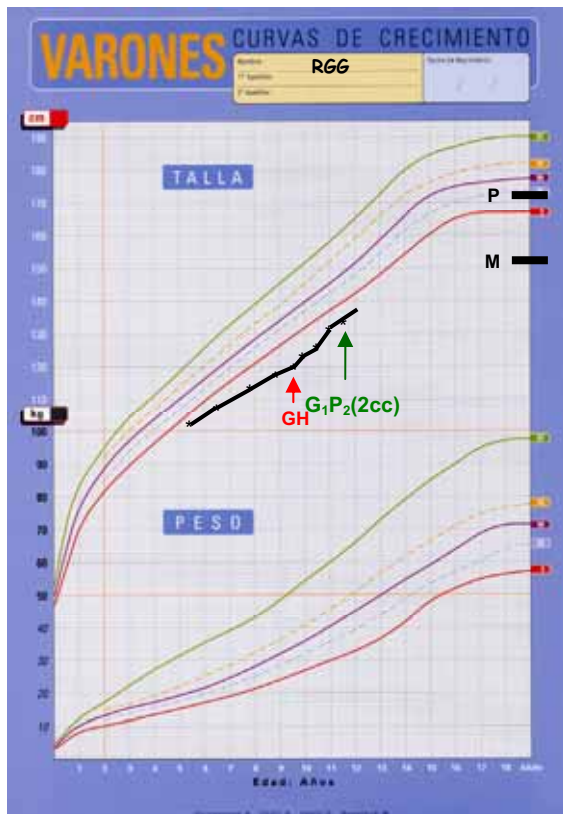


Figura 33. Corba de creixement del Pacient 2, taula resum de diferents proves realitzades a aquest pacient i gràfic de la velocitat de creixement del Pacient 2.

El Pacient 2 és germà del Pacient 3 de la família 2. De les dues determinacions de GH sota estímul de secreció que se li van realitzar, una és superior a 10 ng/ml (límit superior per considerar dèficit de GH) i l'altre és inferior. Es va administrar GH a partir de l'edat de 9 anys i 11 mesos i es mostren els resultats durant els dos primers anys.

Família 2. Pacient 3



Proves de Secretió de GH	GH (pic màxim)	IGF1	Edat
L-Dopa	7,1 ng/ml	49,2 ng/ml (-3,38 SDS)	8 ^(11/12) anys
HI	9,6 ng/ml		9 ^(1/12) anys

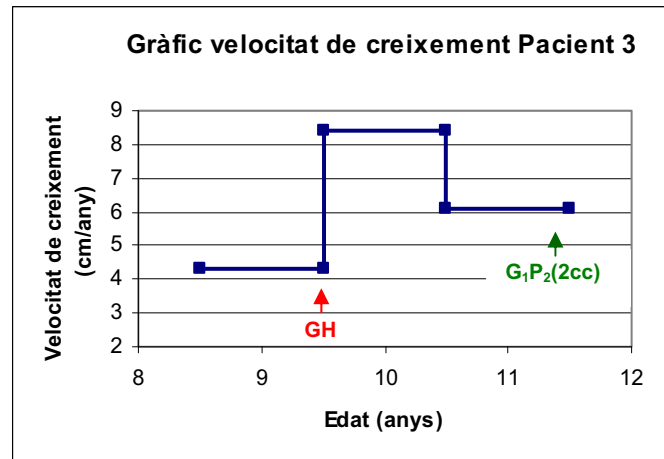


Figura 34. Corba de creixement del Pacient 3, taula resum de diferents proves realitzades a aquest pacient i gràfic on es mostra la velocitat de creixement del Pacient 3.

El Pacient 3 és el germà del Pacient 1 de la família 2. Pateix de dèficit de GH segons les proves d'estimulació de GH i se li ha administrat GH exògena des dels 9 anys i 7 mesos. Va fer una ràpida recuperació del creixement durant els dos primers anys. (Figura 34).

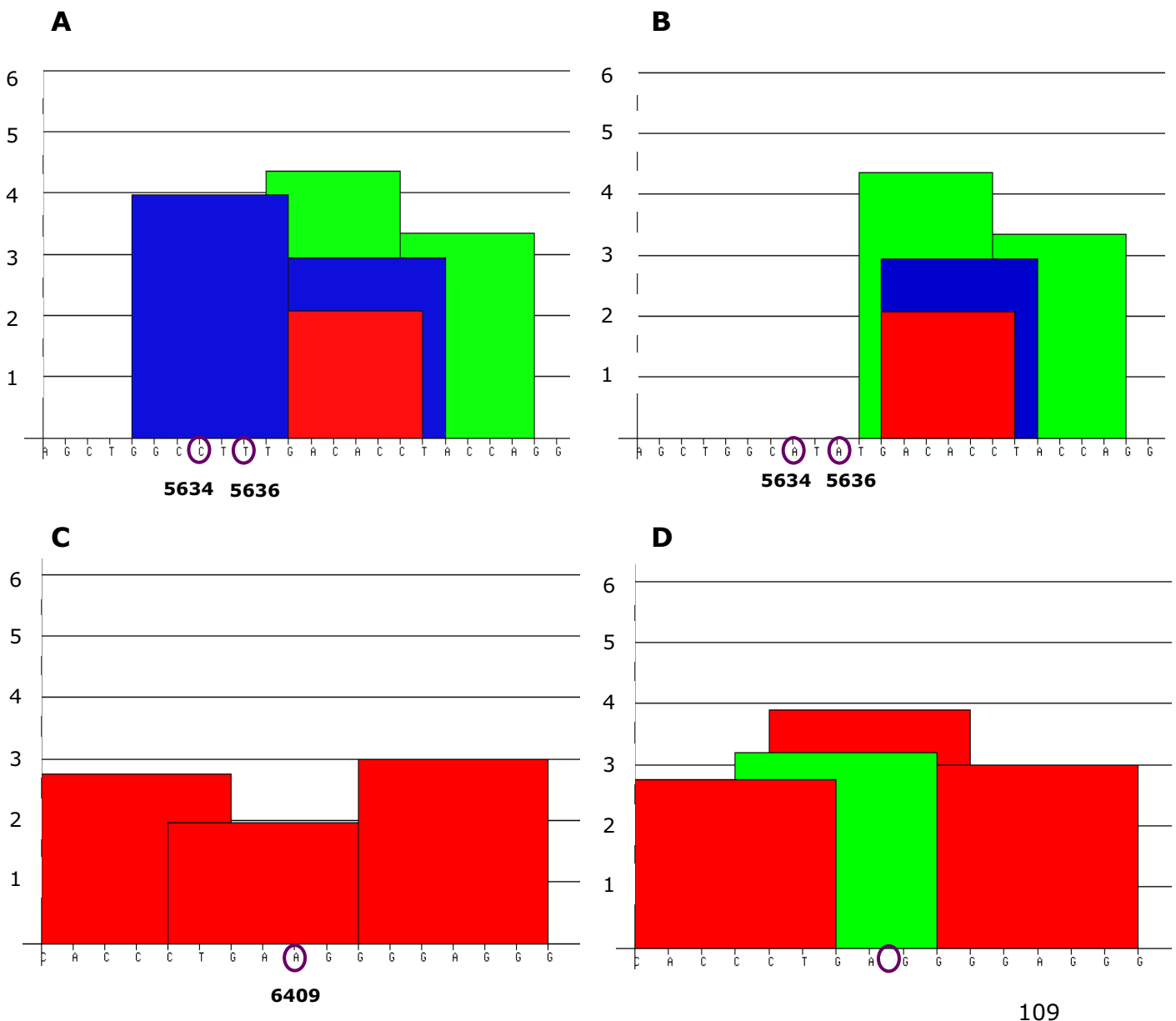
No s'ha disposat de l'ADN dels pares per determinar els corresponents haplotips.

1.4.2 Anàlisi mitjançant ESEFinder

La substitució trobada al nucleòtid 5634 C>A no provoca canvi d'aminoàcid. La substitució en la posició 5636 T>A sí que provoca el canvi d'aminoàcid (Phe25Tyr). Aquestes substitucions es troben a l'exó 2, i es pot estudiar aquesta regió mitjançant el ESEFinder, programa que identifica llocs d'unió a proteïnes SR (proteïnes amb un domini C-terminal ric en Ser/Arg, que participen en múltiples passos del procés d'*splicing*), generant un resultat que reflecteix la força d'aquest lloc d'unió. Les proteïnes SR són essencialment factors d'*splicing* i són molt importants tant en l'*splicing* constitutiu com l'alternatiu. Aquestes proteïnes reconeixen específicament llocs ESE (*exon splicing enhancer*), i el complex resultant estimula la proteïna U2AF, fet important pels primers passos de la constitució de l'*spliceosoma*.

Fins l'any 1998 es coneixien 9 proteïnes SR humanes: SF2/ASF, SC35, SRp20, SRp40, SRp75, SRp55, 9G8, SRp30c, i la SRp54.

També s'estudia la deleció a l'intró 4 (6409 A>del).



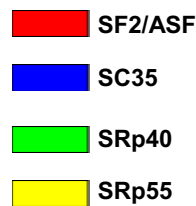


Figura 35. Representació gràfica dels resultats obtinguts mitjançant el programa ESEFinder. A l'eix de les Y es troba representat el motif score.
A: Seqüència normal regió exó 2. B: Seqüència de l'ADN dels pacients a la regió exó 2. C: Seqüència normal regió intró 4. D: Seqüència de l'ADN dels pacients a la regió intró 4.

Es va analitzar aquesta seqüència amb el ESEfinder. Els canvis consecutius de l'exó 2 produeixen la pèrdua del lloc d'unió per a una proteïna SC35 (Figures 35A i 35B). En canvi, la deleció d'una adenina en la posició 6409 produeix l'aparició d'un lloc d'unió per a proteïna SRp40 i augmenta l'afinitat per la proteïna SF2/ASF d'un dels llocs d'unió, passant de 2 a quasi 4 (Figures 35C i 35D).

Dels canvis que porten aquestes dues famílies en aquest treball s'estudia *in vitro* la substitució que comporta canvi d'aminoàcid mitjançant l'estudi de la proteïna mutant (veure apartats 6.2.4 i 6.2.5). La deleció trobada a l'intró 4 s'estudia mitjançant RT-PCR i es troba que no hi ha noves variants d'*splicing* en leucòcits de sang perifèrica (veure apartat 2.1 Resultats)

L'al·lel anomenat per nosaltres M1 (mutat) (Taula 52), i que porta els tres canvis en la seva seqüència d'ADN el comparteixen les dues famílies. És el mateix al·lel en dues famílies que aparentment no tenen cap relació entre sí. Això pot induir a pensar que aquestes dues famílies tenen un origen comú, tot i que pugui ser molt remot.

1.5 Estudi del canvi que comporta la mutació V173L

Entre els pacients amb retard intrauterí del creixement (RIUC), talla baixa i sense deficiència de secreció de GH segons les proves d'estimulació de secreció de GH, es va trobar una pacient que a la seva seqüència del gen GH1 presentava un canvi de nucleòtid que predeia el canvi aminoacídic (Val173Leu). En la Taula 53 es mostren els haplotips del gen GH1 d'aquesta pacient i el canvi trobat a l'Exó 5 del gen GH1.

POSICIÓ AL GENBANK GI:183148	LOCALITZACIÓ	HAPLOTIP DEL GEN GH1	
		PACIENT 4	
P1 4825	Promotor	G	G
P2 4856	Promotor	G	G
P3 4863	Promotor	G	G
P4 4886	Promotor	G	G
P5 4996	Promotor	T	T
P6 5089	Promotor	A	A
P7 5107	Promotor	T	T
P8 5116	Promotor	G	G
P9 5131	Promotor	G	G
P10 5157	Promotor	A	A
P11 5162	Promotor	A	A
P12 5178	5' UTR	A	A
P13 5187	5' UTR	A	A
P14 5221	5' UTR	T	T
P15 5231	Exó I	A	A
P16 5286	Intró I	A	A
P17 5290	Intró I	A	A
P18 5443	Intró I	T	T
P19 5681	Intró II	A	A
P20 5686	Intró II	G	G
P21 6191	Exó IV	G	G
P22 6232	Exó IV	G	G
P23 6263	Intró IV	C	C
P24 6331	Intró IV	T	T
P25 6358	Intró IV	T	T
ALTRES CANVIS			
6633 (Val173Leu)	Exó 5	G	C
HAPLOTIP DEL PROMOTOR SEGONS HORAN ET AL. ⁽¹⁾		1	1
HAPLOTIP SEGONS LA NOSTRA NOMENCLATURA ⁽²⁾		E	M2

Taula 53. Haplotips del gen GH1 d'una pacient que té el canvi que produeix la mutació V173L.

⁽¹⁾Aquest promotor el tenen el 33,44% dels haplotips estudiats per Horan *et al.*, 2003. No hi ha dades de l'herència ja que no es disposen de dades dels pares.

La pacient és homozigota pels haplotips pels SNPs (Taula 53) i en ser el més freqüent en la població estudiada per Horan *et al.*, és considerat el número 1 en l'estudi realitzat de l'activitat transcripcional mitjançant la determinació d'activitat luciferasa.

Es va detectar la mutació mitjançant la seqüenciació de l'ADN del gen GH1 sencer. A la Figura 36 es mostra el canvi en heterozigosi que aquesta pacient conté a l'Exó 5 del gen GH1.

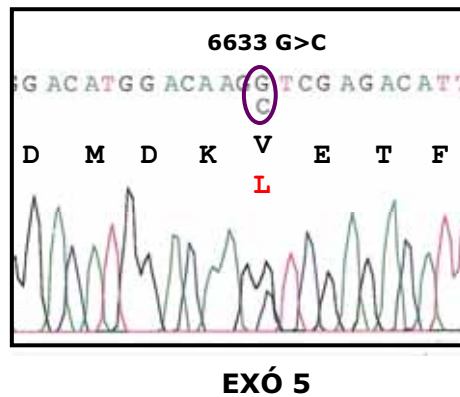
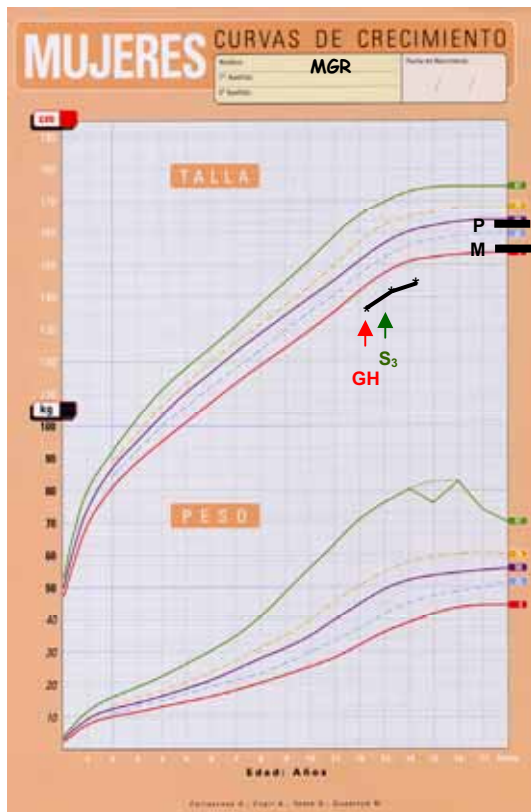


Figura 36. Electroferograma que mostra el canvi en heterozigosi que comporta un canvi d'aminoàcid en el gen GH1 en la pacient. Aquest canvi no es troba a cap control de la població estudiada.

1.5.1 Clínica de la pacient amb el canvi V173L

Pacient 4



Proves de secreció de GH	GH (pic màxim)	IGF1	Edat
HI	12,9 ng/ml	407 ng/ml (-0,19 SDS)	12 ^(4/12) anys
		514 ng/ml (+0,4 SDS)	13 ^(4/12) anys

Talla al néixer	-2,2 SDS
Pes al néixer	-1,45 SDS
Talla diana	-1,52 SDS
Velocitat Creixement (VC) any previ	6,9 cm/any
VC primer any tractament amb GH	5,7 cm/any
VC segon any tractament amb GH	3,1 cm/any

Aquesta pacient presenta un valor de GH superior a 10 ng/ml i per tant no es va considerar deficiència de GH. En el marc de l'assaig clínic de tractament amb GH va ser tractada durant 2 anys tot i que el seu estadi puberal ja corresponia a l'estadi 3 de Tanner i la maduració òssia era de 12 anys.

Figura 37. Corba de creixement de la Pacient 4, així com taula resum de diferents proves realitzades a aquesta pacient.

1.5.2 Anàlisi mitjançant ESEFinder

Es va realitzar l'anàlisi mitjançant el ESEFinder en la regió on aquesta pacient portava el canvi en la seqüència nucleotídica. Com es pot observar a la Figura 38, aquest canvi provoca l'aparició d'un lloc d'unió a proteïna SC35.

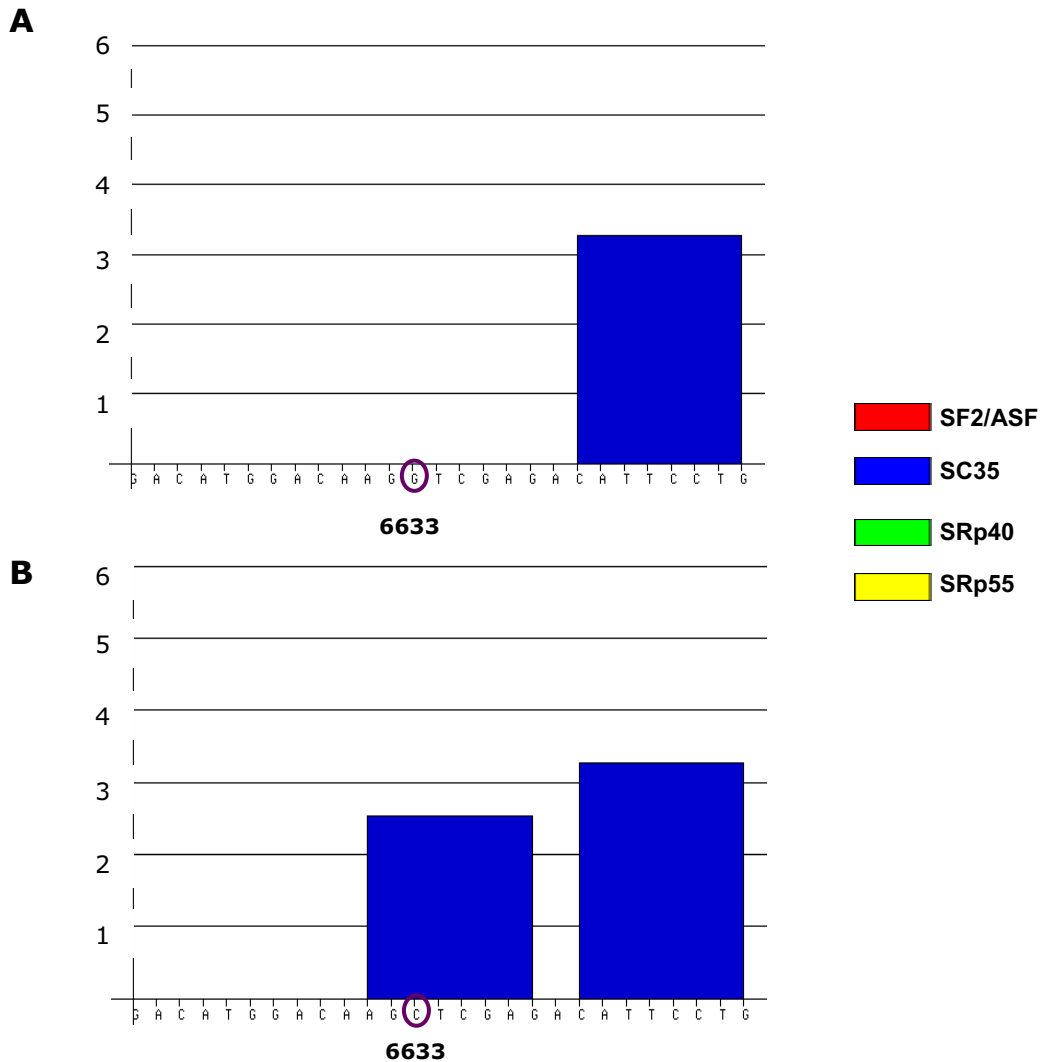


Figura 38. Anàlisi de l'ESEfinder per la posició 6633 G>C, substitució que provoca un canvi d'aminoàcid Val173Leu en el gen GH1. Aquest canvi provoca l'aparició d'un nou lloc d'unió a la proteïna SC35. A: Seqüència normal. B: Seqüència del pacient regió Exó 5.

2. CARACTERITZACIÓ DELS TRÀNSCRITS ALTERNATIUS DEL GEN GH1 EN LEUCÒCITS DE PACIENTS

Mitjançant RT-PCR s'han amplificat diversos patrons de trànscripats d'ARNm de GH1 expressats en leucòcits de sang perifèrica en pacients.

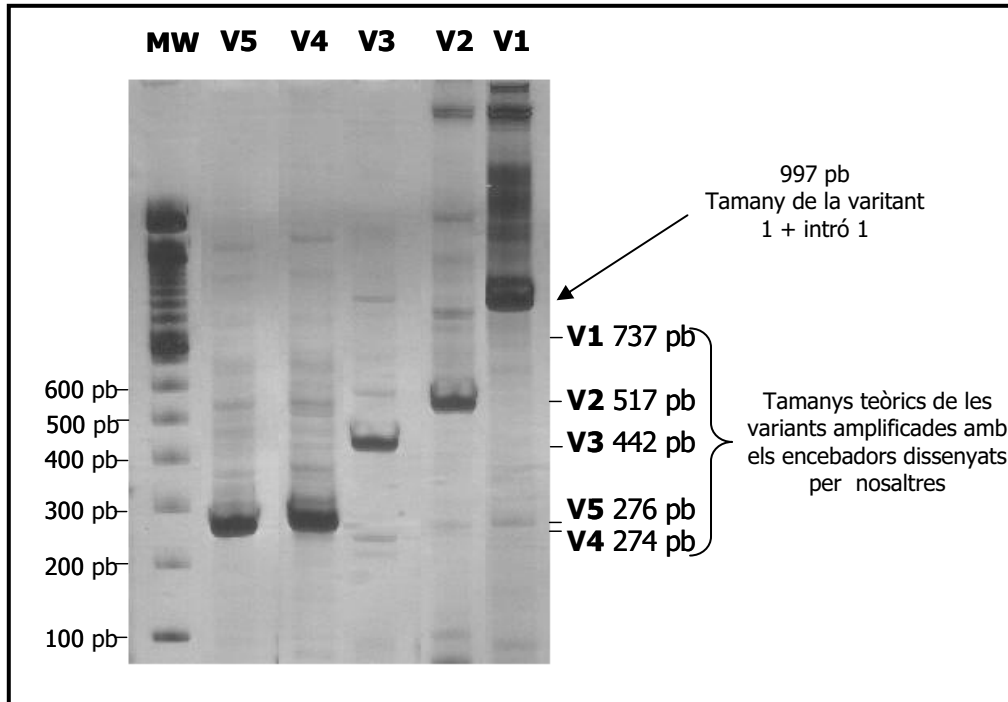
Es va establir el mètode a partir del treball realitzat per Binder i Ranke (1995), per tal d'estudiar l'expressió d'ARN de GH1 en leucòcits de sang perifèrica. L'amplificació de l'ARN d'aquest gen és complicada, degut a la poca expressió en leucòcits de sang perifèrica. A més a més, l'expressió de GH1 està molt ben estudiada en hipòfisi, però en canvi no se sap amb certesa com s'expressa aquest gen en leucòcits.

Es va intentar amplificar l'ARN de GH1 tant en pacients com en controls, i l'expressió va ser molt variable [només es va amplificar alguna variant de GH1 en 8 controls dels 25 estudiats (32% dels controls)]. En tots els casos va haver-hi amplificació del gen GAPDH, demostrant que la qualitat de l'ARN era correcta i que la falta d'amplificació del gen GH1 era deguda a una expressió ni constant ni constitutiva d'aquest gen en leucòcits de sang perifèrica. Així doncs, no es va poder establir com a mètode per estudiar l'afectació dels canvis en la seqüència del gen mitjançant l'expressió d'ARN missatger en leucòcits.

En tots els casos en que s'amplificava la variant 1 de GH1, l'intró 1 era mantingut en el procés d'*splicing*.

A la Figura 39A es poden veure els tamanys dels trànscripats obtinguts quan s'amplifiquen totes les variants d'ARN missatger de GH1 en leucòcits de sang perifèrica d'un control. Com es pot observar, es va trobar un trànscrip que no està descrit a la literatura, tractant-se de la variant 1 d'ARNm de GH1 que conté l'intró 1, degut a un processament alternatiu d'aquest intró. Es va comprovar mitjançant seqüenciació del trànscrip amplificat que no contenia cap altre intró a la seva seqüència. A la Figura 39B hi ha l'electroferograma on es demostra que no s'ha perdut l'intró 1 en el procés d'*splicing*.

39A



MW : marcador de pes molecular (100bp)
 V1: variant 1
 V2: variant 2

V3: variant 3
 V4: variant 4
 V5: variant 5

39B

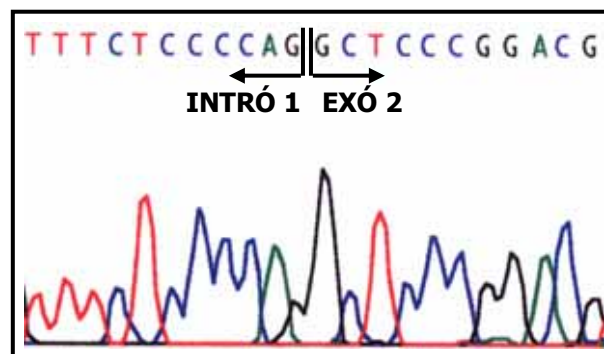
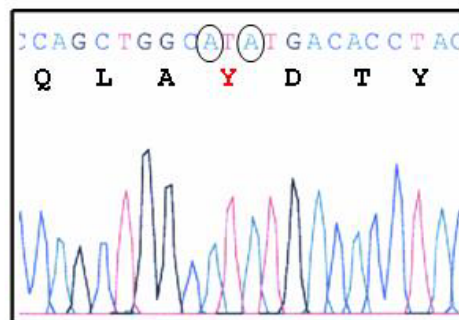


Figura 39. (39A) Electroforesi en gel de poliactalmidina i tinció de plata on es mostren les 5 variants i s'indiquen els tamanys corresponents obtingudes a partir d'ARN missatger de GH1 de sang perifèrica d'un control. (39B) Electroferograma que demostra que la variant 1, tot i fer l'*splicing* correcte de tots els exons, manté l'intró 1 a la seqüència de l'ARN.

Es va utilitzar aquesta mateixa tècnica per amplificar l'ARN d'un pacient portador del canvi F25Y, i també es va estudiar una família portadora d'una mutació que predeia la deleció de l'exó 3 en l'ARN missatger de GH1.

2.1 Estudi dels trànscrips d'ARN expressats en leucòcits de sang perifèrica a la Família 1 (Pacient 1)

Com ja s'ha explicat en l'apartat Subjectes i Mètodes, es van separar els diferents trànscrips que s'expressen d'ARN a partir de l'ADN del gen GH1 del pacient 1 i es va comprovar que els canvis que conté a la seva seqüència de l'ADN també els porta a la seqüència de l'ARN (els canvis que es troben a l'Exó 2), i que efectivament es troben al mateix al·lel (Figura 40). També es va comprovar que el canvi que es va trobar a l'intró 4 no afecta a l'*splicing* d'aquest trànscrip, ja que la resta de seqüència de l'ARN era normal. D'aquesta manera es dedueix que el canvi trobat a la regió de l'intró 4 no influeix en la transcripció del gen almenys en el teixit estudiat (leucòcits de sang perifèrica).



EXÓ 2

Figura 40. Electroferograma on es mostren els canvis trobats a l'Exó 2 del gen GH1. Com es pot observar, les dues substitucions es troben al mateix al·lel. La segona substitució comporta el canvi d'aminoàcid F25Y. En canvi, la primera substitució no comporta canvi d'aminoàcid. Aquesta seqüència va ser obtinguda a partir del producte amplificat a partir de l'ARNm del pacient 1.

2.2 Estudi dels trànscrips d'ARN expressats en leucòcits de sang perifèrica a la Família 3 (Pacient 5)

En un pacient amb deficiència de GH i diagnòstic molt precoç als 6 mesos d'edat i en el que s'havia trobat la mutació en heterozigosi al lloc d'*splicing* de l'Intró 3 (+1G>A) (Cogan *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 2001), s'han fet les reaccions de PCR amb els encebadors descrits per Binder i Ranke 1995, i la única forma d'expressió de GH en leucòcits ha estat la forma que perd l'exó 3. Per tant es confirma el que ja es descriu a la literatura (Binder i Ranke, 1995).

La Figura 41 mostra el gel de poliacrilamida amb els productes de PCR obtinguts de l'ARN de leucòcits del Pacient 5 i de la seva mare, així com l'electroferograma del pacient i d'un control, on es veu la pèrdua de l'exó 3 que pateixen el pacient i la seva mare. També s'han fet controls de l'expressió de GAPDH.

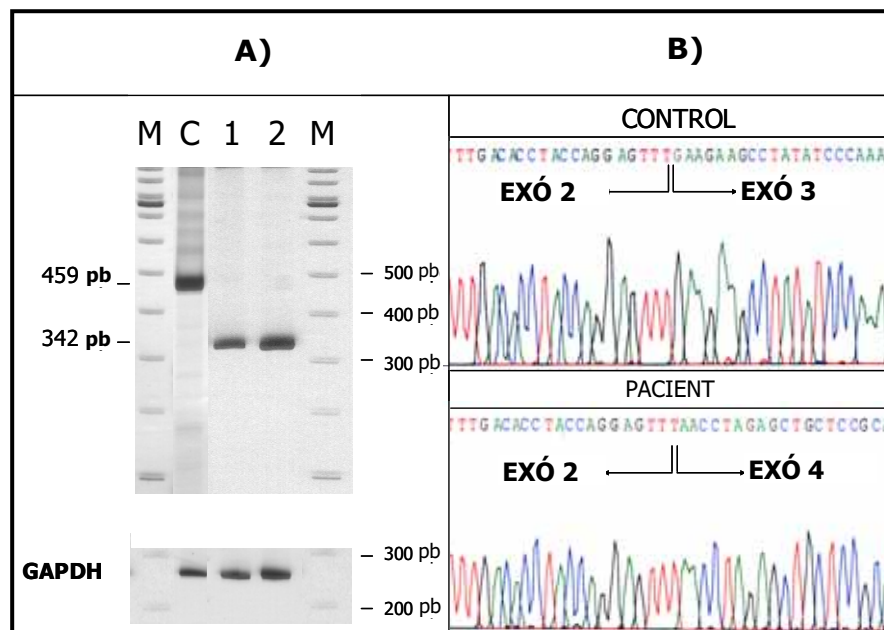


Figura 41. (41A) C: control. 1: pacient. 2: mare. M: marcador de pes molecular (41B) Electroferogrames del RNA missatger de GH1 procedent de leucòcits de sang perifèrica del pacient i un control.

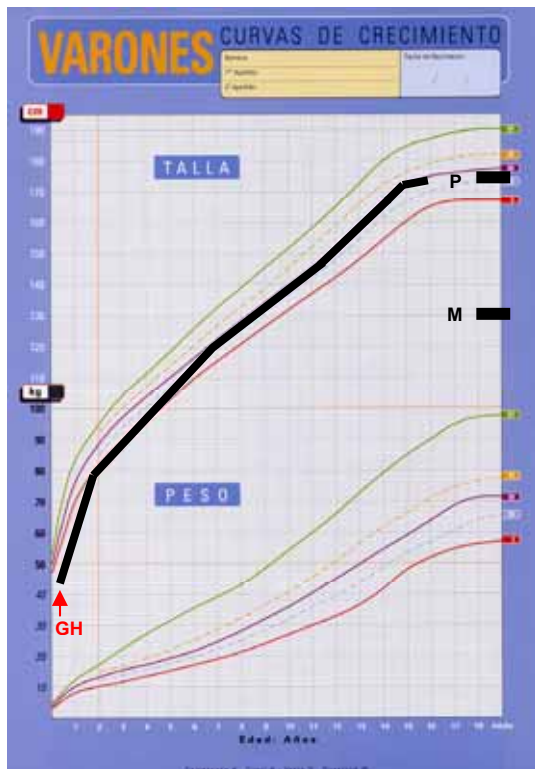
A la Taula 54 es mostra el patró de polimorfismes del gen GH1 tant en el pacient descrit com en la mare portadora de la mutació a l'intró 3 i també deficitària de GH. En vermell s'indiquen el canvis que comporten la pèrdua de l'exó 3.

POSICIÓ AL GENBANK GI:183148	LOCALITZACIÓ	HAPLOTIP DEL GEN GH1					
		FAMÍLIA 3					
		PACIENT 5		MARE		PARE	
P1 4825	Promotor	G	G	G	G	G	G
P2 4856	Promotor	G	G	G	T	G	G
P3 4863	Promotor	G	G	G	T	G	G
P4 4886	Promotor	T	T	T	T	T	T
P5 4996	Promotor	T	T	T	T	T	T
P6 5089	Promotor	A	A	A	A	G	A
P7 5107	Promotor	G	G	G	G	G	G
P8 5116	Promotor	G	G	G	G	G	G
P9 5131	Promotor	del	G	del	G	G	G
P10 5157	Promotor	G	A	G	G	G	A
P11 5162	Promotor	A	C	A	A	A	C
P12 5178	5' UTR	A	G	A	A	G	G
P13 5187	5' UTR	A	C	A	A	C	C
P14 5221	5' UTR	T	T	T	T	T	T
P15 5231	Exó I	A	A	A	A	A	A
P16 5286	Intró I	A	A	A	A	A	A
P17 5290	Intró I	A	A	A	A	A	A
P18 5443	Intró I	T	T	T	T	T	T
P19 5681	Intró II	A	A	A	A	A	A
P20 5686	Intró II	G	G	G	G	G	G
P21 6191	Exó IV	G	G	G	G	G	G
P22 6232	Exó IV	G	G	G	G	G	G
P23 6263	Intró IV	C	C	C	C	C	C
P24 6331	Intró IV	A	A	A	T	A	A
P25 6358	Intró IV	T	T	T	T	T	T
ALTRES CANVIS							
5985*	Intró III	A	G	A	G		
HAPLOTIP DEL PROMOTOR SEGONS HORAN ET AL.(1)		18	-	18	8	11	-
HAPLOTIP SEGONS LA NOSTRA NOMENCLATURA		M3	I	M3	H	F	I

Taula 54. Haplotips del gen GH1 del Pacient 5 i els seus pares. Tant la mare com el fill tenen una mutació a l'intró 3 que produeix la deleció de l'exó 3 produint una proteïna més petita (17,5 kb).

⁽¹⁾El promotor 18 el presenten el 0,97% dels haplotips estudiats per Horan *et al.* Aquest promotor expressaria un 20% menys que el promotor nº1 descrit per Horan *et al.* El promotor número 8 el tenen el 1,94% dels haplotips estudiats per Horan *et al.* Aquest promotor expressaria un 33% més que el promotor 1 descrit per Horan *et al.* El promotor 11 el tenen el 1,62% dels haplotips estudiats per Horan *et al.* Aquest promotor expressaria un 60% menys que el promotor 1 descrit per Horan *et al.*

El Pacient 5 presenta la mateixa mutació que la seva mare, i els dos tenen dèficit de GH. El fill va ser diagnosticat per hipoglicèmies severes, va rebre GH exògena des dels 6 mesos d'edat i ha arribat a una talla final de 170 cm. En canvi, la mare no ha estat tractada, arribant a una talla final de 131 cm.



	PACIENT 5 a l'adolescència			Mare
	Sota tractament amb GH	1 any sense tractament	2 anys sense tractament	No tractada
Edat	15,0 a	16,0 a	17,0 a	47 a
Talla (cm)	172	172	172	130
SDS	-0.9	-0.9	-0.9	-5.9
Pes (Kg)	71.8	74.7	74.9	71.6
SDS	-0.12	+0.15	+0.17	+2.3
IGF-I (ng/ml)	515	81	60	22
IGF-I (SDS)	-0.7	-10.9	-12.6	-6.6
IGFBP-3 (mg/ml)	6	2	1.8	0.6
IGFBP-3 (SDS)	+2.0	-1.5	-1.8	-8.0
DMO (SDS)	+1.3	+1.0	+0.9	-3.9 -2.13 *
Testosterona (ng/dl)	610	719	645	-

Figura 42. Corba de creixement del Pacient 5, així com una taula resum de diferents proves realitzades a aquest pacient i a la seva mare. SDS = desviacions típiques segons edat i sexe. DMO = densitat mineral òssia. * DMO lumbar corregida per talla.

A la Figura 42 es mostra el seguiment del creixement del Pacient 5. Com es pot observar hi ha una recuperació del creixement fins arribar a una talla semblant a la del pare. També es pot observar la talla de la mare que pateix la mateixa mutació que el pacient però que no va ser tractada amb GH exògena. Aquesta corba de creixement mostra un exemple clar de l'efecte produït per la GH exògena en un pacient amb dèficit de GH d'inici precoç i tractat fins a talla final.

3. ESTUDI TEÒRIC DE LA TRADUCCIÓ A PROTEÏNA DEL TRÀNSCRIT ALTERNATIU DEL GEN GH1 QUE CONTÉ L'INTRÓ 1 A LA SEVA SEQÜÈNCIA MITJANÇANT L'ORFfinder

Amb aquest programa informàtic del NCBI, es va estudiar la traducció a proteïna de les seqüències trobades en forma d'ARN. Aquest programa informàtic és teòric, i en cap cas vol dir que les proteïnes que se'n deriven existeixin realment, sinó que són proteïnes o pèptids que teòricament es podrien traduir a partir d'una determinada seqüència d'ARN. Aquest programa analitza la seqüència d'ARN tant en la cadena sentit, com en la cadena antisentit, i també analitza les tres possibles pautes de lectura que se'n podrien derivar.

Es van analitzar les següents seqüències teòriques:

Trànscrips d'ARN que contenen l'intró 1 a la seva seqüència

Mitjançant el programa ORFfinder es va introduir la seqüència d'ARN missatger que contenia l'intró 1 a la seva seqüència. El programa troba dues metionines a partir de les quals es podia iniciar la traducció.

En el primer cas, l'anàlisi de la seqüència proporciona una proteïna de 7 aminoàcids que comença a la posició 1 de la seqüència d'ARN i acaba al codó número 7 (Figura 43)

A partir de la segona metionina que es troba a la seqüència d'ARN, en sorgeix una proteïna de 63 aminoàcids que comença a la posició 179 de l'intró 1 de la seqüència d'ARN introduïda i que acaba al codó número 63 (Figura 44). Així doncs, a partir d'una seqüència d'ARN que conté l'intró 1 en podrien sorgir 2 pèptids de tamanys diferents.



Figura 43. Traducció a aminoàcids de la seqüència d'ARN d'un trànscrip de GH1 que conté l'intró 1, quan l'inici de la traducció coincideix amb l'inici de la seqüència d'ARN.

179	atg	gagagagaaaaacaaacagctcctggagcagggagagtgctg	}	INTRÓ 1
	M	E R E D Q T A P G A G R V L		
224	gcctcttgctctccggctccctctgttgccctctggtttctcccc			
	A	S C S P A P S V A L W F L P		
269	aggctcccggacgtccctgctcctggccttttgccctgctctgcct	}	EXÓ 2	
	R			L P D V P A P G F W P A L P
314	gccctggcttcaagagggcagtccttcccaaccattcccttatc			
	A	L A S R G Q C L P N H S L I		
359	caggctttttga	370		
	Q	A F *		

Figura 44. Traducció a aminoàcids de la seqüència d'ARN d'un transcrit de GH1 que conté l'intró 1, quan l'inici de la traducció es troba a la posició 179 de la seqüència d'ARN.

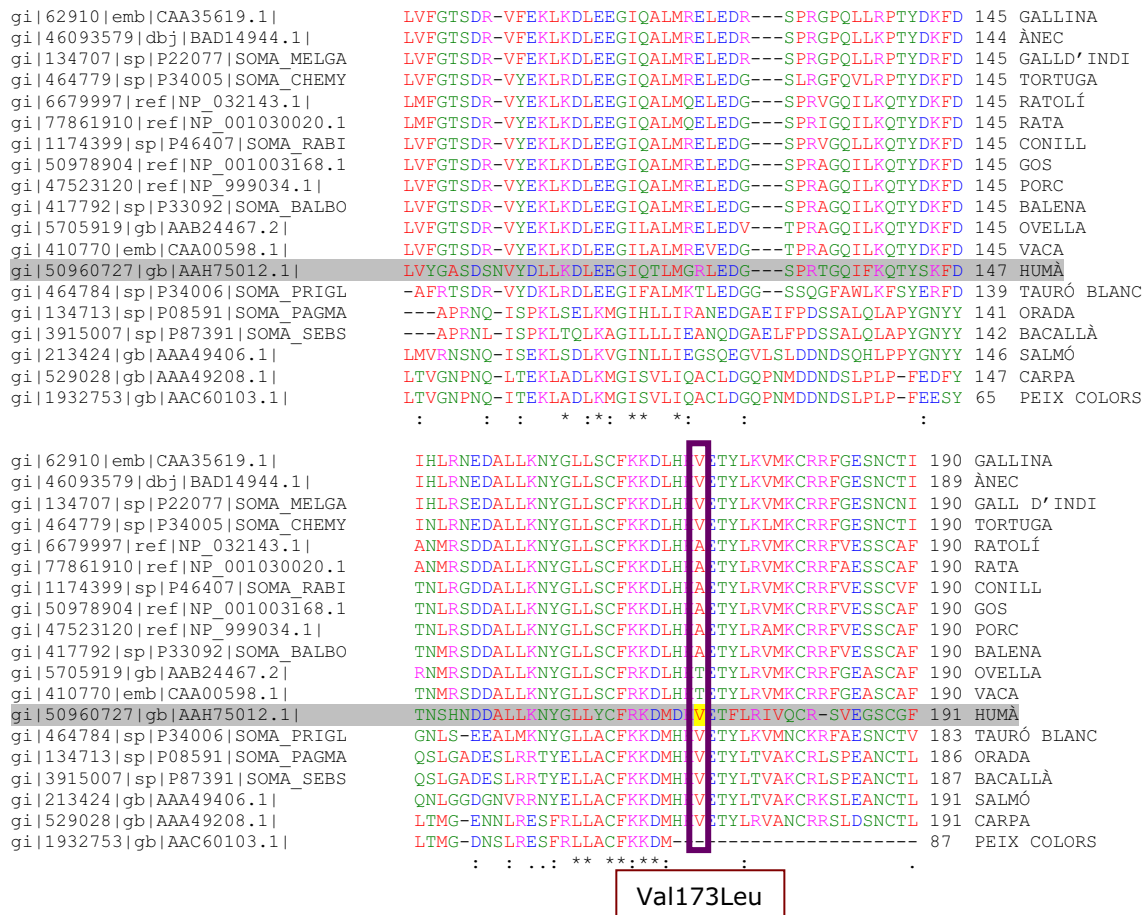


Figura 45. Alineament de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna GH de 18 vertebrats realitzat amb el programa *ClustalW*.

Els colors utilitzats representen el següent:

- En vermell estan representats els residus petits i hidrofòbics (inclosos els aromàtics menys la Tyr).
- En blau els àcids.
- En magenta els bàsics.
- En verd els hidroxil, amines i bàsics (menys la Gln)
- En gris tots els altres.
- "*" significa que els residus d'aquesta columna són idèntics en totes les seqüències dels alineaments.
- "." significa que hi ha substitucions conservatives.
- "-" significa que hi ha substitucions semi-conservatives.

Com es pot observar en aquest alineament (Figura 45), per la primera mutació estudiada, la Phe25Tyr, no hi ha cap altre animal vertebrat estudiat que presenti una Fenilalanina en la seva seqüència, així com tampoc hi ha cap animal que presenti l'aminoàcid Tirosina. En canvi, pel que fa al segon canvi estudiat Val173Leu, sí que hi ha altres animals que presenten una Valina en aquesta posició. Tampoc hi ha cap animal que tingui l'aminoàcid Leu en aquesta posició en la seqüència de la proteïna GH.

4.1.1.2 Alineament realitzat amb proteïnes de la seva família (hormones somatomamotropines) realitzat amb el CDD (Conserved domain database)

		10	20	30	40	50	60	70	80		
	*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....									
gi 130988	17	LLMSNLFLEWKE	---VSSAPINAS	---EAvLSDLKDLFADNTVLSGEMSKLGV	MRKEFFMNSFSSETfnkiilDL	---	---	---	---	85	
3hhra(query)	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	46	
gi 1174402	21	LASSVPLDCREeqgiLSRCPSIS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	80	
gi 267016	4	VVLMLSVLSLG	---VSSQPITD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	60	
gi 130299	9	LLAFALLCLPwlqeAGAVQTVP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	70	
gi 20141664	9	LLAFGLLCLSwlqeGSAPPTIP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	70	
gi 464475	17	LVVSNLLLWEK	---AASIPACMVe	-dGGcWDP	LRFAFNATQRAETLRNLD	DLYVEFFQNFSSRQfadlssQL	---	---	---	87	
gi 131022	20	LLMSNLLLWEN	---VASVPRHASgagRG	-EMSLHGLLDHAIILAHNVTE	LAMNSVFLLEDVLYKPGR	---	---	---	---	85	
gi 131020	17	LLVSNLLLWENT	---ASAMRAKLLn	-VHnYTSYGD	TWNQAIKISQDMNQY	SOLSTHVKIFYAQGRG	---	---	---	80	
gi 1172526	16	LLVSNLLLWEN	---MASKPTVLVs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	73	
gi 131019	26	LVMSNLLLCQ	---GILCPSLCPdgdDVeRASL	IDLDFVHASVLS	TGMVNTV	KMFD	DFDQY	AQGKE	---	90	
gi 131018	1	MVMSNLLLCQ	---VNSCPSCCPdvfDIpLES	LTHLFLNASRSLSHDIVNH	T	MFHE	FDEK	YQNQP	---	65	
gi 131014	26	LLMSNLLLCQ	---GKSCPSCGPdvfVSLRKS	FTDRFMNAASL	SHDFYND	T	MFNE	FDEK	YAGKL	90	
gi 130293	26	LVVSNLLLCQ	---GISCPCSGPdmfVSLRKS	LDVFINAASL	SHDFHNL	T	MFNE	FDEK	YAGKL	90	
gi 130290	26	LVVSNLLLCQ	GvedyAPYCKNQPGn	---cRIP	LQSLFERATL	VASNNYRL	R	MFNE	FNQF	GEGKN	
gi 130945	16	LLVNSLLWKN	---VASFPMCAm	-nGrCFMS	EDT	FE	LAGS	LSHN	ISIE	S	
gi 417534	9	NLFLTALLCL	---ASQGYAVG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	63	
gi 130917	8	TKLHLAVLCL	---VVSCHAIG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	62	
	*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....									
gi 130988	86	HKSTenitkafNSCHTVP	INVVPE	TVDEV	VRKTSFEE	FLKMLVHMLL	LAWKE	PLKHLV	TELSALPE	CC--PYRILSKAE	EAI
3hhra(query)	47	NPQT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	113
gi 1174402	81	NQVF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	151
gi 267016	61	NKIFl	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	129
gi 130299	71	LHDSq	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	139
gi 20141664	71	LQNp	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	139
gi 464475	88	IRLDe	tvtkagTYCHSNRAK	-PKSR	---GVN	IDIEEY	LKMS	INFCG	FMDQPL	FHLVIEL	SAMEGV
gi 131022	86	PERDl	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
gi 131020	81	ERRT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	151
gi 1172526	74	DRIL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	144
gi 131019	91	INVS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
gi 131018	66	INAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	136
gi 131014	91	INVT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
gi 130293	91	INAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
gi 130290	91	TSKVi	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	162
gi 130945	81	DKSP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	151
gi 417534	64	MPPR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	135
gi 130917	63	MPPR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	135
	*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....									
gi 130988	164	NKD	LLEYI	IRIIS	KVN	--PAIKENEDYPT	WSDLLS	LSKSAD	KETQFFALY	MFSF	CLRIDLE
3hhra(query)	114	LKD	LEEG	IQTLMGR	LEdg	SPRTGQIF	KQTY	SKFD	---TNSH	NDDALL	KNYGLLYCFR
gi 1174402	152	LIS	LEQG	VVVL	LKMLde	GMLTINH	SEQGL	LQNG	---VQP	QMLE	SVMRDY
gi 267016	130	IHL	LIRAN	EDGAE	LFPds	SALQLAPY	GDYH	SPG	-----	-----	-----
gi 130299	140	LKD	LEEG	IQTLMGR	LEdg	SRRTGQIL	KQTY	SKFD	TN	---SH	NDDALL
gi 20141664	140	LKD	LEEG	IQTLMWR	LEdg	SPRTGQIF	NQSY	SKFD	---TK	SH	NDDALL
gi 464475	163	NRQ	LLDD	LRWILT	KVF	---P	TAEI	KEE	PPSWD	YLS	FLKSSN
gi 131022	158	IKEL	MDV	LKGI	LNKI	Q---P	GSP	QNER	PPM	WELAY	LRSP
gi 131020	152	NIK	LDA	IKNI	AKGN	---F	EIN	QKANY	TAW	SEL	GLF
gi 1172526	145	NLI	I	LEGL	QKIF	NR	TQ	t	kVE	ENEN	FDP
gi 131019	162	LKEL	QAL	I	ER	PF	QVI	f	t	ARR	KMY
gi 131018	137	IEE	LQAF	I	ER	QFS	QVI	yp	V	IRT	I
gi 131014	162	SEK	LQAF	I	ER	QFS	KI	I	vp	V	LNT
gi 130293	162	SEK	LQAF	I	ES	QFR	KI	I	vp	V	LMI
gi 130290	163	TKV	LE	G	V	EM	I	Q	R	V	h
gi 130945	152	INA	V	R	G	N	V	A	L	M	S
gi 417534	136	SNS	L	S	S	G	L	D	R	L	I
gi 130917	136	SKS	L	G	D	L	M	V	N	K	M

Phe25Tyr

Val173Leu

gi_130988	240	C	240
3hhra(query)	189	C	189
gi_1174402	228	C	228
gi_267016	202	C	202
gi_130299	215	C	215
gi_20141664	215	C	215
gi_464475	238	C	238
gi_131022	234	C	234
gi_131020	227	C	227
gi_1172526	223	C	223
gi_131019	239	C	239
gi_131018	213	C	213
gi_131014	238	C	238
gi_130293	238	C	238
gi_130290	236	C	236
gi_130945	224	C	224
gi_417534	209	C	209
gi_130917	211	C	211

Figura 46. Alineament múltiple realitzat amb proteïnes de la família de les hormones somatomatotropines.

- En **vermell** es marquen els residus conservats en tots els membres de la família.
- En **gris** es marquen els residus no alineats i les posicions on no totes les proteïnes tenen residu aminoacídic.
- En **blau** es marquen els residus no conservats.

Per fer aquest alineament, es va estudiar la proteïna GH amb número d'accés del PDB (Protein Data Bank) 3HHR (de Vos *et al.* 1992). Primer es va estudiar l'estructura de la proteïna al MMDB (*Molecular Modeling Database; Entrez's macromolecular 3D Structure database*, Chen *et al.*, 2003). Tot seguit es va estudiar l'alineament múltiple amb proteïnes de la seva mateixa família al *Conserved Domain Database (CDD)*, Marchler-Bauer *et al.*, 2005 . La proteïna pertany a la família de les hormones somatomatotropines, i es va buscar l'alineament amb 17 proteïnes de la mateixa família (Figura 46).

Es troben marcades en groc les proteïnes que contenen el canvi d'aminoàcid trobat en els pacients estudiats.

A la Figura 47 es mostren les proteïnes utilitzades per fer aquest alineament múltiple. Subratllades en groc es mostren les proteïnes que tenen el canvi d'aminoàcid en la posició 25 o 173. Aquestes proteïnes en lloc de tenir l'aminoàcid que té la GH WT en aquestes posicions, tenen l'aminoàcid de les proteïnes mutants F25Y o V173L.

GI 130988	Proliferin-related protein precursor (PRP). Mus musculus
GI 1174402	Somatolactin precursor (SL). Cyclopterus lumpus
GI 267016	Somatotropin precursor (Growth hormone). Acanthopagrus butcheri
GI 130299	Chorionic somatomammotropin hormone precursor (Choriomammotropin) (Lactogen) Homo sapiens
GI 20141664	Growth hormone variant precursor (GH-V) (Placenta-specific growth hormone (Growth hormone 2)). Homo sapiens
GI 464475	Placental prolactin-like protein C precursor (PRL-like protein C) (PLP-C) (Growth hormone-related placental protein 2). Rattus norvegicus
GI 131022	Placental prolactin-like protein B precursor (PRL-like protein B) (PLP-B). Rattus norvegicus
GI 131020	Placental prolactin-like protein A precursor (PRL-like protein A) (PLP-A). Rattus norvegicus
GI 1172526	Chorionic somatomammotropin hormone 1 variant precursor (Placental lactogen I variant) (PL-IV). Rattus norvegicus
GI 131019	Placental prolactin-related protein 4 precursor (PLP-III). Bos taurus
GI 131018	Placental prolactin-related protein 3 precursor (PRC-III) (bPRCIII). Bos taurus
GI 131014	Placental prolactin-related protein 1 precursor (PRC-I) (bPRCI). Bos taurus
GI 130293	Chorionic somatomammotropin hormone 2 precursor (Placental lactogen II) (BPLP-II). Bos taurus
GI 130290	Chorionic somatomammotropin hormone 1 precursor (Placental lactogen I) (BPLP-I). Bos taurus
GI 130945	Proliferin-1 precursor (Mitogen-regulated protein 1). Mus musculus
GI 417534	Prolactin precursor (PRL). Anguilla anguilla
GI 130917	Prolactin I precursor (PRL-I). Oncorhynchus keta

Figura 47. Quadre on es mostra la relació de les proteïnes estudiades en aquest alineament múltiple.

En el cas del canvi F25Y: La proteïna que conté l'aminoàcid Tyr (Y) en el codó número 25 en lloc de l'aminoàcid Phe (F), és la *Growth hormone variant precursor* (GH-V) o *Growth hormone 2* (Figura 46). El GI corresponent és el 20141664. Com ja s'ha comentat, aquesta proteïna es troba en el mateix clúster que la proteïna GH, i és expressada en placenta humana (veure alineament de les proteïnes del clúster a l'apartat 4.1.1.3).

Això podria fer pensar que aquest canvi s'ha produït mitjançant recombinació gènica entre aquests dos gens.

En el cas del canvi V173L: Les proteïnes de la família de les hormones somatomamotropines que presenten l'aminoàcid Leu (L) al codó 173 enlloc de la Val (V) són dues hormones expressades en *Bos taurus* (*Placental prolactin-related protein 4 precursor* i *Placental prolactin-related protein 3 precursor*) (Figura 46). El que se sap d'aquestes dues proteïnes és que tenen una funció específica durant la gestació.

4.1.1.3 Alineament de la hGH amb les altres 4 proteïnes que provenen del clúster del gen

Es va realitzar l’alineament amb les altres 4 proteïnes que provenen dels gens del mateix clúster on es troba el gen GH1 i que dóna lloc a la proteïna GH (Figura 48):

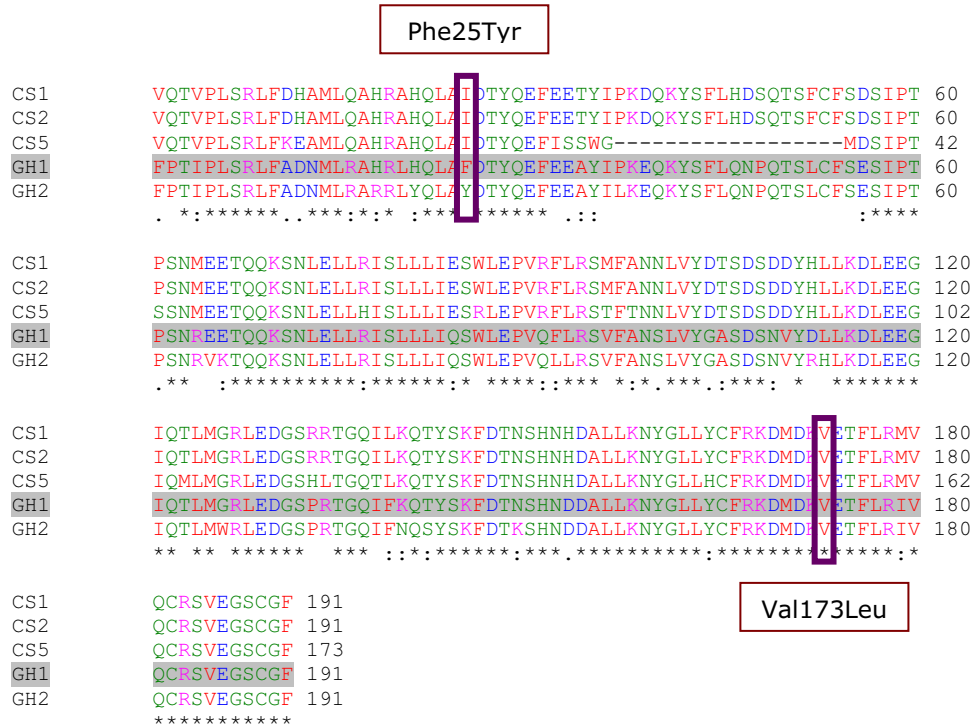


Figura 48. Subratllat en gris es mostra la seqüència d’aminoàcids de la proteïna GH1. Alineament realitzat amb el programa *ClustalW*. La llegenda utilitzada és la següent:

- En vermell estan representats els residus petits i hidrofòbics (inclosos els aromàtics menys la Tyr).
- En blau els àcids.
- En magenta els bàsics.
- En verd els hidroxil, amines i bàsics (menys la Gln)
- En gris tots els altres.

- "*" significa que els residus d’aquesta columna són idèntics en totes les seqüències dels alineaments.
- ":" significa que hi ha substitucions conservatives.
- "." significa que hi ha substitucions semi-conservatives.

Comparant amb els gens paràlegs (gens que deriven de l’amplificació d’un gen original ancestral i que es diversifiquen de forma independent i que normalment tenen una funció diferent) del clúster humà de la GH, es va comprovar que el residu anàleg a la F25Y en GH2 (GI: 20141664) és la Tyr (Figura 48). Això podria demostrar que el canvi F25Y podria haver esdevingut per conversió gènica.

En canvi, cap dels gens paràlegs del clúster tenia una Leu a la posició 173 (Figura 48), la qual cosa podia indicar que aquest canvi no procedia de la conversió gènica entre els gens del clúster. Buscant les homologies dels dominis conservats en la família de les hormones somatomamotropines, es va poder comprovar que la

Placental prolactin-related protein 4 precursor i la *Placental prolactin-related protein 3 precursor* (GI corresponents: 131019 i 131018) sí que contenien l'aminoàcid Leucina a la posició 173, i en canvi no ho feia la GH2, la qual contenia una Val.

4.1.2 Anàlisi filogenètics de la proteïna GH

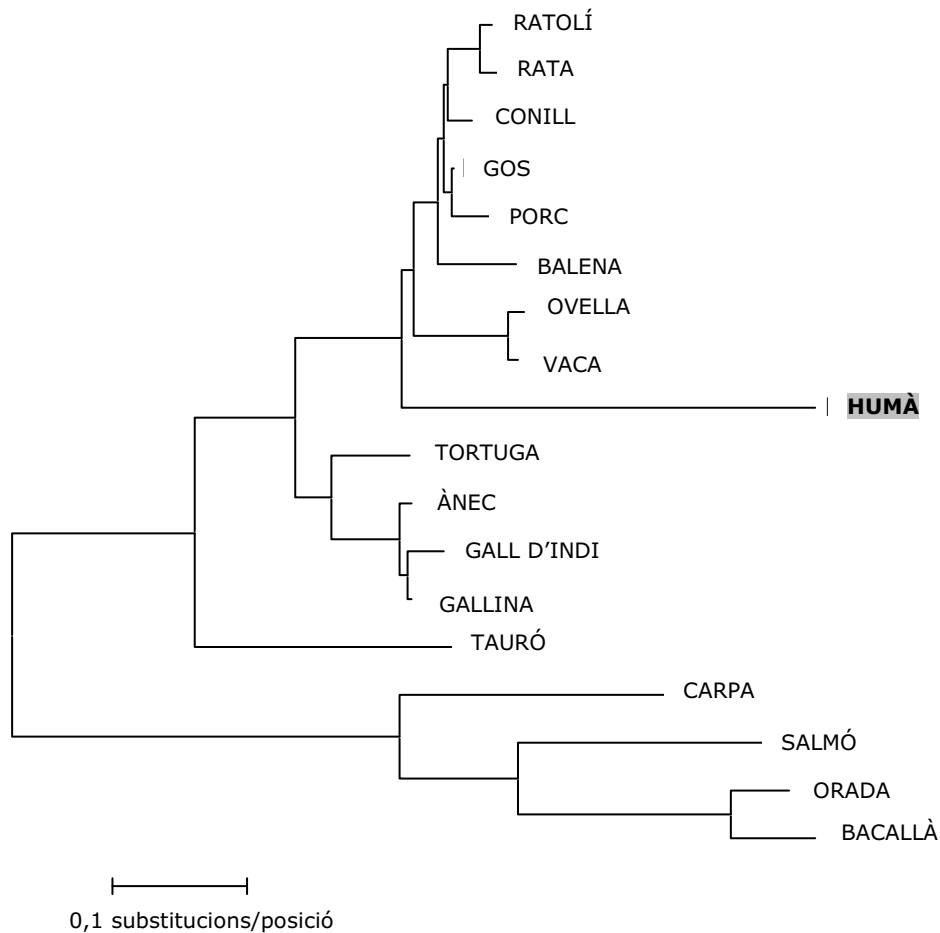


Figura 49. Figura on es mostra l'anàlisi filogenètic de l'Hormona de Creixement GH comparant l'hormona GH humana amb les hormones GH dels altres animals vertebrats estudiats.

L'arbre filogenètic (Figura 49) es va fer amb el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis versió 2.1 (MEGA 2.1)* (Kumar *et al.*, 2001), utilitzant l'algoritme *Neighbor-Joining*. La longitud dels braços reflecteix el nombre de substitucions aminoacídiques per posició entre les seqüències, exclouent aquelles posicions en les que almenys una de les seqüències presenta una deleció. L'algoritme assumeix que la freqüència d'aparició dels aminoàcids és la mateixa per tots ells. Les seqüències emprades són les que s'han indicat anteriorment. Com era d'esperar, la GH1 manté

més semblança amb els mamífers del grup que no pas amb els altres vertebrats estudiats.

Pels dos aminoàcids estudiats, a la posició 173, l'aminoàcid Valina també es troba en gallina, ànec, gall d'indi, tortuga, tauró blanc, orada, bacallà, salmó i carpa. En canvi, els animals mamífers presenten altres aminoàcids en aquesta posició. A la posició 25 gairebé tots els altres animals tenen una Alanina en aquesta posició, a excepció dels humans (on com ja s'ha comentat es troba una Fenilalanina), i l'orada, el bacallà i el salmó presenten una Glutamina.

Com es pot observar en l'anàlisi filogenètic (Figura 50), l'hormona GH1 presenta una similitud molt elevada amb l'hormona GH2 i superior a les que presenta amb cap altra hormona del clúster.

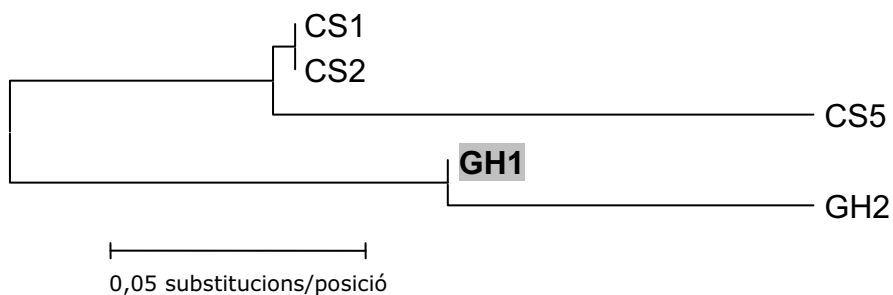


Figura 50. Anàlisi filogenètic de l'Hormona de Creixement comparant l'hormona amb les proteïnes dels gens del clúster.

L'homologia entre la proteïna GH i les altres proteïnes és d'un 93% amb l'hormona GH2 i del 85% amb les altres proteïnes del clúster.

4.1.3 Estudi teòric del canvi Phe25Tyr

La Phe 25 (hèlix 1) en humans és un aminoàcid aromàtic hidrofòbic, i en canvi és una alanina hidrofòbica en tots els vertebrats excepte en salmó, bacallà i orada, on hi ha una Gln que és un aminoàcid bàsic. La Tyr és un aminoàcid aromàtic que conté un grup hidroxil (Figura 51).

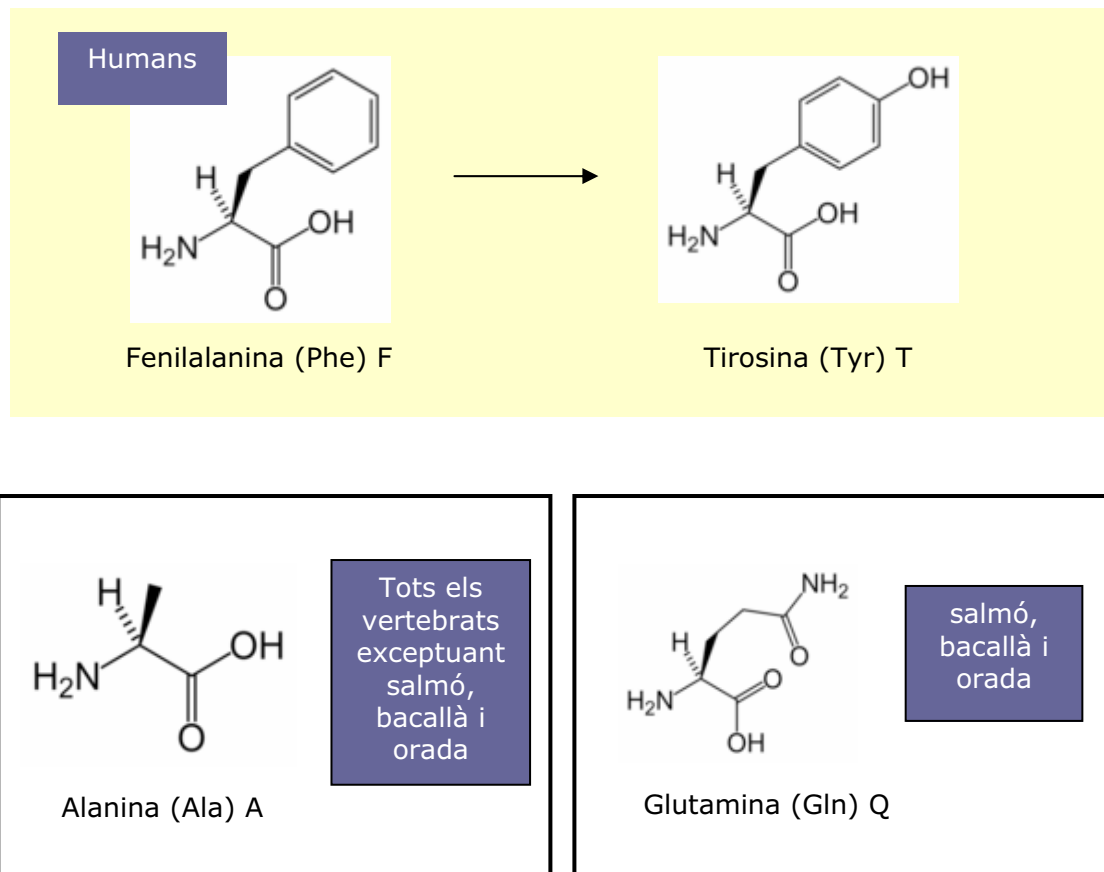


Figura 51. Representació dels aminoàcids en la posició 25 de GH pels diferents animals estudiats. També es mostra l'estructura de l'aminoàcid Tirosina, trobat en els pacients 1 a 3.

Aquest residu es troba situat parcialment en la cara hidrofòbica de l'hèlix, encarat a l'interior de la proteïna. Aquest fet pot repercutir en que aquests residus que són hidrofòbics es col·loquin a la part interior de l'hèlix i que fixin els residus que afecten més la unió amb el receptor i que seran els de la part exterior de l'hèlix. (de Vos *et al.*, 1992). Tot i amb això, aquest aminoàcid no està en la zona d'unió amb la primera molècula de GHR (Figura 52), sinó que podria tenir més afectació a la zona d'unió a la segona molècula de GHR.

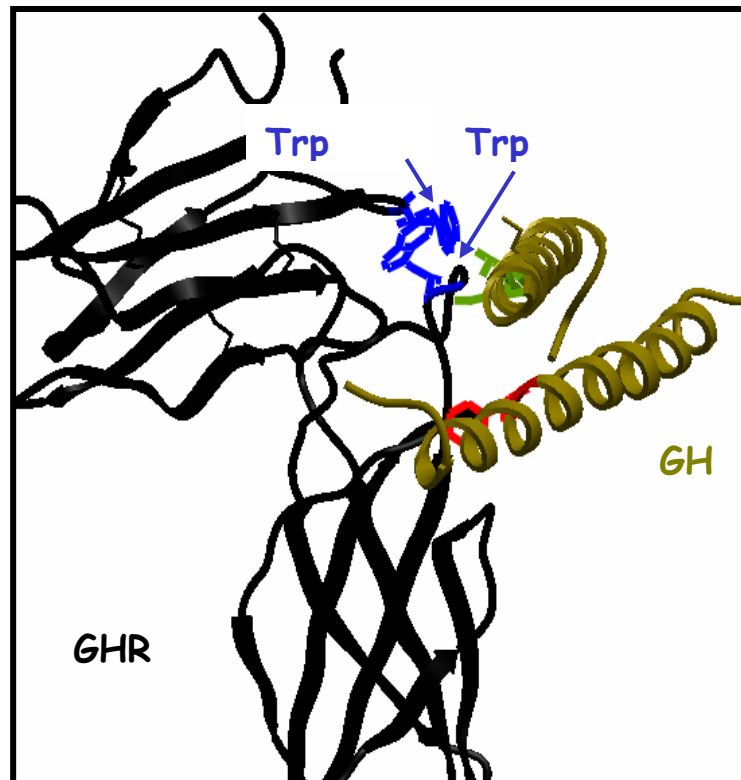


Figura 52. Figura realitzada amb el programa informàtic Molsoft (San Diego, CA) que mostra part de la zona d'unió de la hGH al receptor mitjançant els aminoàcids de colors blavosos, i l'aminoàcid F25 (de color vermell) analitzant la hGH amb número d'accés al PDB (Protein Data Bank) 3HHR.

El residu Phe25 interaccionaria amb els aminoàcids S219 i N218 de GHR (Figura 53).

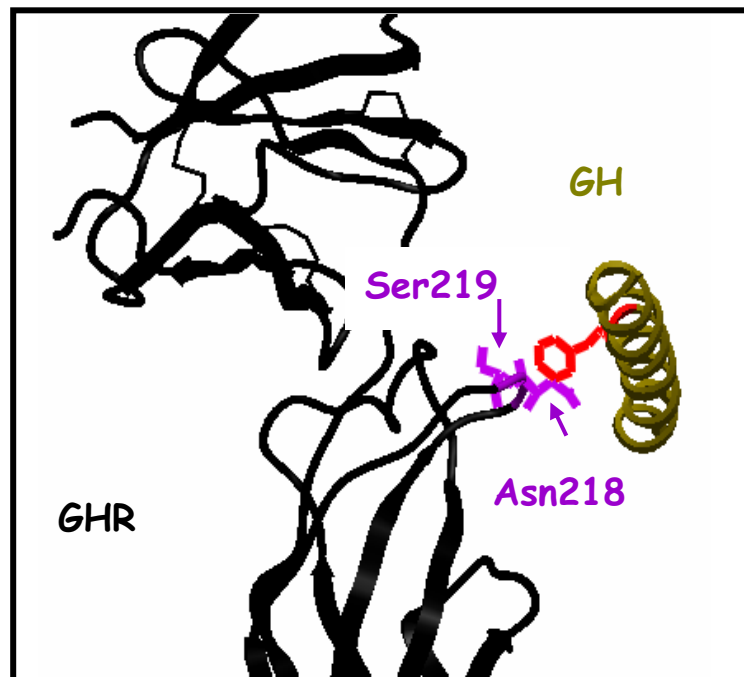


Figura 53. Es mostra de color verd la proteïna GH, amb l'aminoàcid F25 marcat en vermell, i els aminoàcids més importants per a la unió amb la segona molècula de GHR. En color lil·lós es mostren els aminoàcids de GHR que interaccionarien amb el residu F15.

A la Figura 54 es mostra la posició de l'aminoàcid F25 en el conjunt global de la proteïna GH i també la zona on s'uneix al receptor de GH.

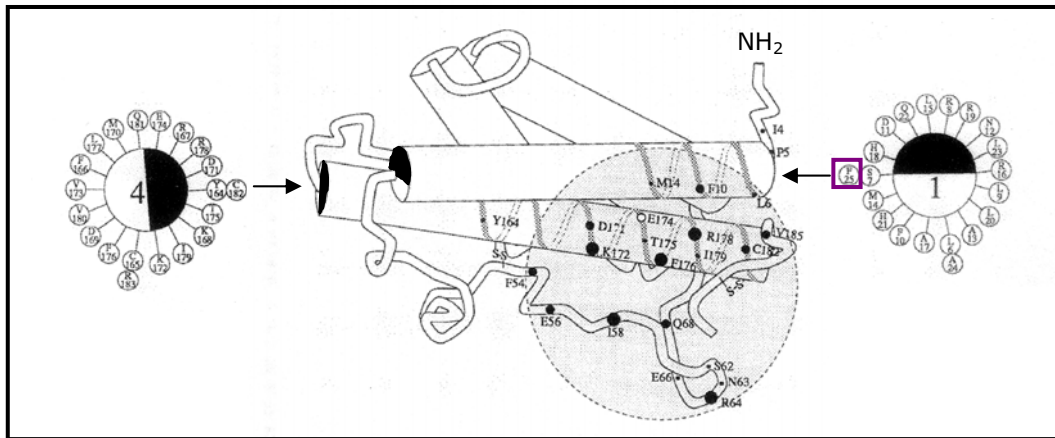


Figura 54. Figura realitzada per Cunningham *et al.*, 1991a en la que està ombrejada la part de la hGH que interacciona amb el receptor. En el quadrat lila hi ha remarcat el residu F25, que com es pot observar es troba entre la cara exterior i interior de l'hèlix 1 i no forma part del lloc d'unió a receptor.

4.1.4 Estudi teòric del canvi Val173Leu

La Val 173 (hèlix 4) en humans és un aminoàcid petit i hidrofòbic igual que als peixos i la gallina, ànec, gall d'indi i tortuga de mar. Contràriament, els mamífers estudiats presenten una Alanina, aminoàcid també hidrofòbic, i els que tenen una Tyr són l'ovella i la vaca. La Leu és un aminoàcid que pertany al mateix grup que la Val (Figura 55).

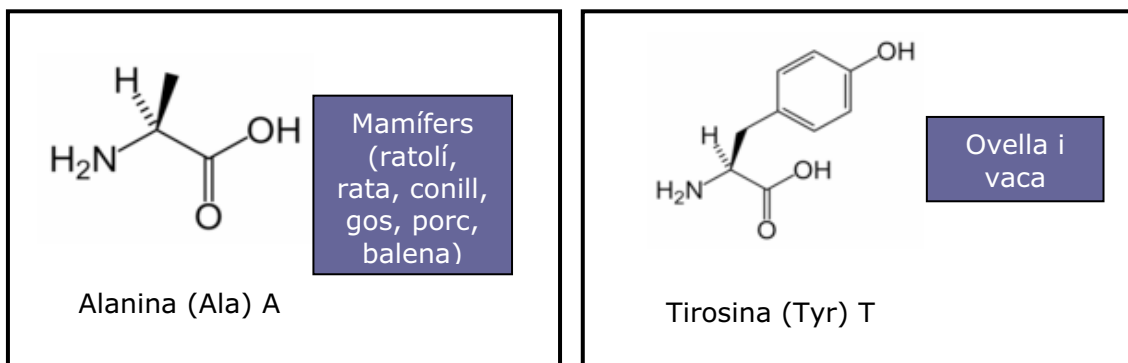
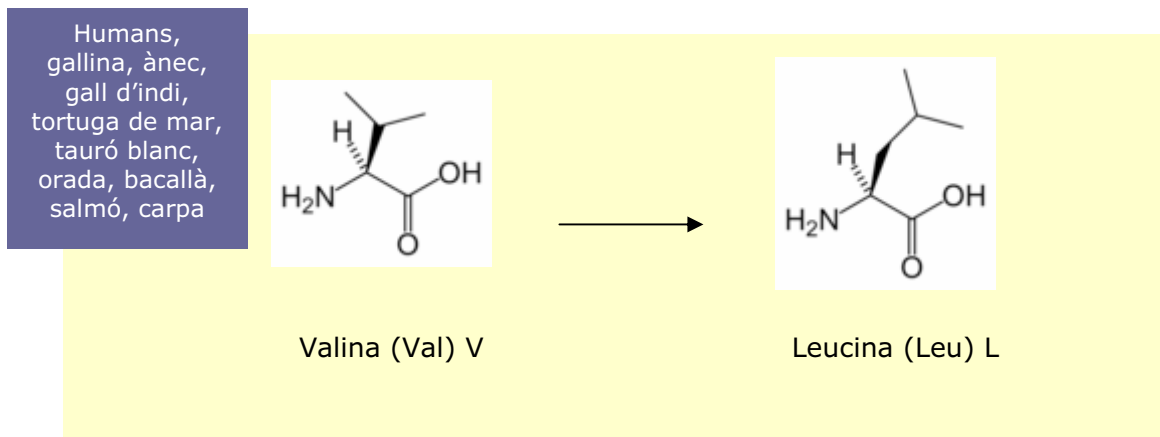


Figura 55. Representació dels aminoàcids en la posició 173 de GH pels diferents animals estudiats. També es mostra l'estructura de l'aminoàcid Leucina, trobat en la Pacient 4.

La Val173 es troba en una zona que està molt a prop de la zona d'unió al receptor de GH (Figura 56). De fet els residus T175, D171 o K172 són de gran importància per la unió amb el receptor. La Val173, en estar encarada cap a l'interior de l'hèlix, tampoc juga un paper important en la unió al receptor, tot i que s'ha demostrat que mutacions en posicions amagades poden ser desestabilitzants i comportar la proteòlisi *in vivo* de la proteïna (Alber *et al.*, 1987; Pakula *et al.*, 1986). Cunningham *et al.*, 1989, refereixen que la mutagènesi de la Val173Ala no es podia realitzar ja que hi havia molt poca expressió d'aquesta proteïna *in vitro*, i no es podia dur a terme la tècnica de la *Alanine-Scanning mutagenesis*. Aquest fenomen també té lloc amb altres residus situats a la cara hidrofòbica de l'hèlix com la

Met170, i Leu177. Cunningham *et al.*, l'any 1989 suposen que la mutació en aquests residus contribuiria a una inestabilitat de la proteïna. Tot i això, aquest no és un fet general, perquè altres residus que resten a la cara hidrofòbica de l'hèlix 1 com Leu6, Leu9 o Phe10 i de l'hèlix 4 com Phe176 i Val180 sí que són fàcilment mutables .

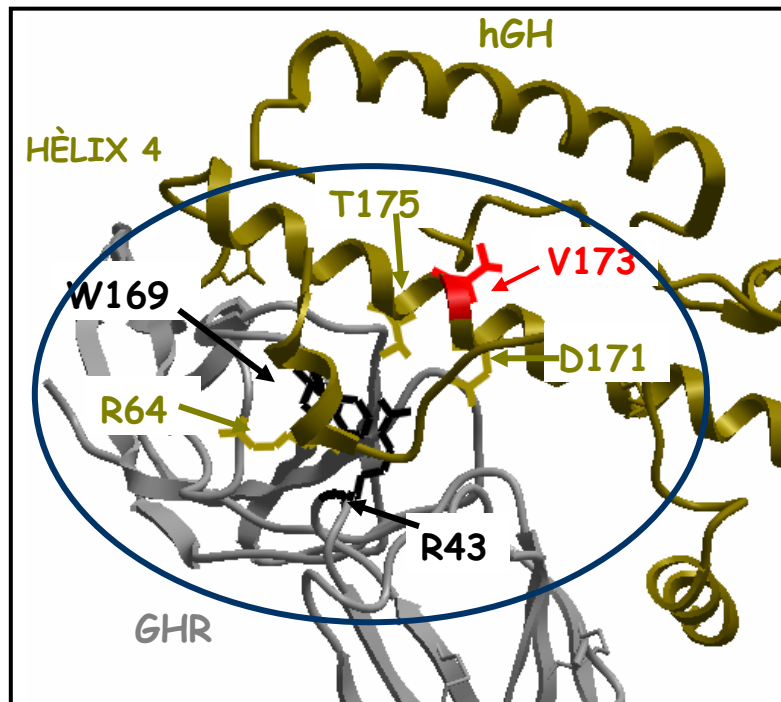


Figura 56. Figura realitzada amb el programa informàtic Molsoft (San Diego, CA): part de la zona d'unió de la hGH al receptor, analitzant la hGH amb número d'accés al PDB (Protein Data Bank) 3HHR. En vermell es mostra l'aminoàcid V173.

A la Figura 57 es mostra la posició de l'aminoàcid Val173 en la posició global de la proteïna:

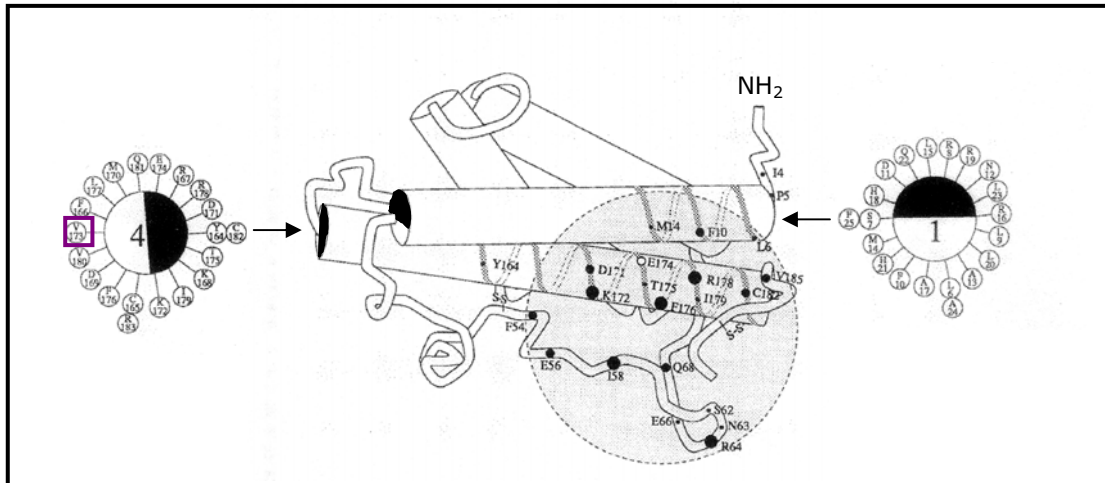


Figura 57. Figura realitzada per Cunningham *et al.*, 1991a, amb la part de la hGH que interacciona amb el receptor ombrejada. En el quadrat lila hi ha remarcat el residu V173, que com es pot observar es troba a la cara interior de l'hèlix 4 i no forma part del lloc d'unió a receptor.

5. ESTUDI DELS ELEMENTS DE RESPOSTA DE LES REGIONS PROMOTORES DE GENS REGULATS PER STAT5 I/O VITAMINA D

Es van buscar els elements de resposta en els promotors dels gens d'interès. S'utilitza una llibreria de seqüències patró per localitzar llocs d'unió de factors de transcripció en seqüències d'interès.

Es van buscar els llocs d'unió dels factors de transcripció STAT5 i VDR per STAT5B, GHR, IGF1R i IGF1.

Els resultats obtinguts van ser els següents:

5.1 IGF1

El resultat obtingut tant pel mètode manual com pel mètode automàtic va ser el mateix, perquè la seqüència reconeguda pel programa Gene2promoter va ser la mateixa que la introduïda manualment en el programa MatInspector (Figura 58).

Part del promotor d'IGF1 (GI: 6598666)

```

83161 cacactctgg cacacagact cctctgtca tacacacaca cacacacaca cacacacaca
83221 cacacacaca caggtttgag ttatatgaa aattcaaaca acaggaaaat tgtttcccc
83281 ccaggtacct ttctccaga gtggtGGGGt ggggagggga cagtgcagg cagcctagta
83341 gaagaataaa gaaaaatgtt ctatttcagt tgggttttac agctcggcat agtctttgcc
83401 tcatcgcagg agaaaaagta tgagacagtg cctaaagg accaatccaa tgctgectgc
83461 cctcca tag_gTTCTaggaa_atgagatcac acctctcact tggcaactgg gacaaggggt
83521 caccgcagtg ctgtcttcca atctacttta cccagtcac ttcagggtta aaattgtaga
83581 gtttgctgga gagggtctta tgcctcttc tttctttttt tgttttaaat aatgcatttg

```

Figura 58: Elements de resposta per VDR i STAT5 en el gen IGF1.

VDR RXR *Bipartite binding site of VDR/RXR heterodimers:* 3 spacer nucleotides between the two directly repeated motifs. Core sim: 0.904. Matrix sim: 0.804.

STAT5 *Signal transducer and activator of transcription 5.* Core sim: 1.000. Matrix sim: 0.963.

El programa reconeix un lloc d'unió de VDR i un altre per STAT5. Això significaria que l'expressió del gen IGF1 podria estar modulada per STAT5 i VDR.

5.2 IGF1R

Es va analitzar la seqüència de nucleòtids situada a uns 900 pb *upstream* del primer exó del gen i es van trobar dos llocs d'unió de VDR, però en aquest cas, el programa Gene2promoter situa la regió promotora a uns 500 pb del primer exó, i per tant, el primer element de resposta no entraria dins la regió promotora del gen (Figura 59).

Part del promotor de IGF1R (GI: 22726103)

```

151501 aggcgaactc gagagaggcg ggagagcgag agggacgccg ccagcgagcc tgcccacggc
151561 cggcgctcgc agaccctcgg ccccgctccc cggatccccc cgcgcCCTCc acgcccctcc
151621 ggcgcggggg cagctccaag gcgcgcctcg cctcggtgtg gaccttcagc gagccggagc
151681 ccccgcgagc agcaggcggc ggcgggcggg ggccgggccc gggccggcgc ggggcgggcg
151741 gcggcgcaga gccgggcccg gcggcgggag tgctgagcgc ggccgggccc gcccgccgct
151801 ttgtgtgtgt cctggatttg ggaaggagct cgcgcggcgc gcggcggcgc tgagggagga
151861 ggcggcggcg agcggagcca ggaggaggag gaggaggggg agccgctcat tcattttgac
151921 tccgcgtttc tgcacctcgc cggCCTCgccc tgtgacctcg acttcggggc gatcttgcca
151981 actgcgtcgc gccctcccgc ggcggaagct cgggctccg gccgcctccc gcgcggccag
152041 ggccgggctt gtttttctc gcttaggcag atttgggctt tgcccccttt ctttgagtt

```

Figura 59: Elements de resposta per VDR i STAT5 en el gen IGF1R.

VDR RXR *VDR/RXR Vitamin D receptor RXR heterodimer site*. Core sim: 1.000. Matrix sim: 0.851.

VDR RXR *Bipartite binding site of VDR/RXR heterodimers: 3 spacer nucleotides between the two directly repeated motifs*. Core sim: 0.952. Matrix sim: 0.828.

5.3 STAT5B

Per STAT5B es va fer el mateix procediment. Sobre una seqüència d'un clon es va localitzar el primer exó i es va estudiar la seqüència nucleotídica 800 pb en sentit 5'. En aquesta seqüència no es va trobar reconeixement a STAT5 o VDR. El programa Gene2promoter va realitzar la recerca d'un promotor en aquest clon i el va trobar a uns 4000 pb *upstream*. En aquesta seqüència tampoc hi ha reconeixement a STAT5 o VDR. Per tant es pot dir que STAT5 no respon a Vitamina D ni a STAT5.

5.4 GHR

En la seqüència analitzada d'uns 800 pb en sentit 5' del primer exó no es va trobar cap seqüència de reconeixement de VDR o STAT5. En el clon estudiat (GI: 21281492) el programa Gene2promoter no troba cap promotor. Es fa una altra recerca de promotors de GHR, i es troba una seqüència amb GI: 4160544 que sí que conté un promotor però no és acotat pel programa EIDorado de Genomatix. Així doncs, es decideix buscar els elements de resposta en aquesta regió que és la regió *5'-flanking region*. Aquesta regió es troba a 13038 pb del primer exó de GHR. En aquesta seqüència de nucleòtids es troben 4 regions de resposta a STAT5, 3 de les quals tenen un *core similarity* de 1.000 o gairebé 1 i un *matrix similarity* de més de 0.900. També es troben 10 regions que responen a VDR, tot i que només 2 tenen uns valors de *core similarity* i *matrix similarity* realment bons. Això ens indica que aquesta regió sembla respondre tant a VDR com a STAT5.

Aquests resultats es poden resumir a la Taula 55:

	Regió de resposta a STAT5	Regió de resposta a VDR
IGF1	Sí	Sí
IGF1R	No	Sí
STAT5	No	No
GHR	Sí	Sí

Taula 55. Taula resum dels resultats obtinguts amb el programa MatInspector.

No es pot oblidar que els resultats obtinguts amb aquests programes informàtics són teòrics, ja que es basen en algorismes matemàtics, però poden suggerir quins elements de resposta es poden trobar a la regió estudiada per nosaltres.

6. EXPRESSIÓ IN VITRO DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

6.1 Mutagènesi dirigida

S'utilitza la tècnica de mutagènesi dirigida per introduir els canvis detectats en els pacients en una seqüència patró d'ADNc ja clonat obtingut a partir d'ARNm de GH. El primer que s'ha de fer és introduir una Gln (Glutamina) abans de l'ínter. Aquest aminoàcid és necessari per a la posterior proteòlisi de la cua d'histidines que es situen davant de l'ínter. Aquest canvi es va fer en tots els plàsmids que vam voler estudiar.

Un cop es va comprovar que s'havien incorporat correctament aquests tres nucleòtids, es va procedir a la lligació amb el plàsmid pQE-30UA, com ja es va explicar a materials i mètodes.

El canvi que s'hauria de veure queda reflectit a la Figura 60:

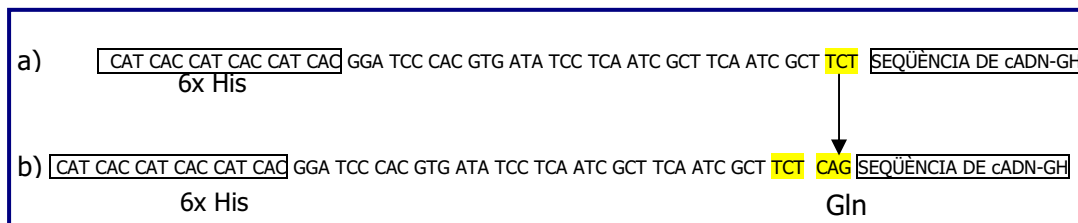


Figura 60. Seqüència del plàsmid on es va introduir el triplet que codifica per l'aminoàcid Glutamina.

Es comprovà mitjançant seqüenciació automàtica que el codó que codificava per a la Gln estava correctament introduït davant del producte de PCR i que la pauta de lectura de la proteïna era mantinguda (Figura 61).

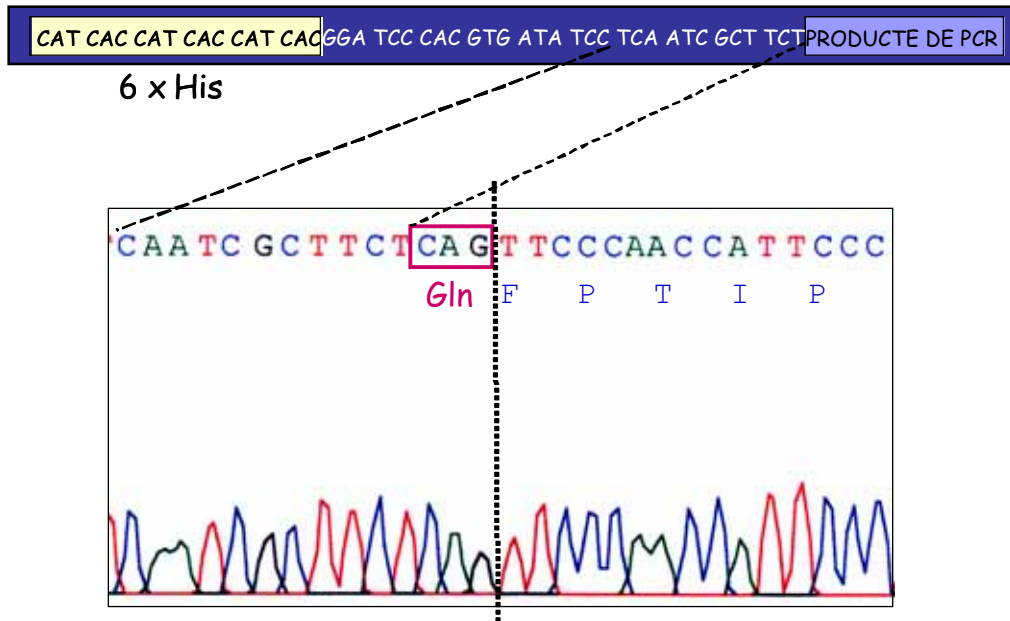
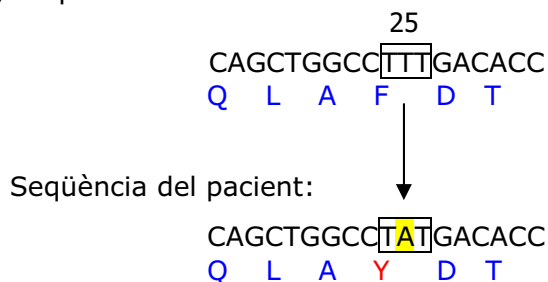


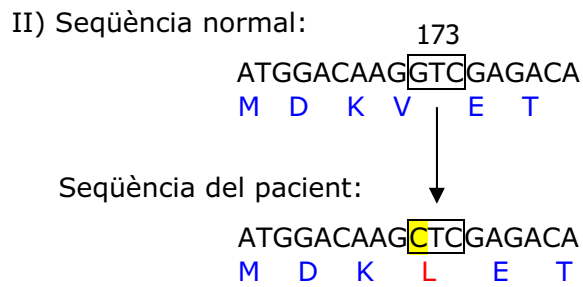
Figura 61. Electroferograma on es mostra la seqüència nucleotídica de la regió del plàsmid que empalma amb l'ínter. Els tres nucleòtids que codifiquen per Gln estan correctament inserits davant del trànscrip de GH.

Un cop es va aconseguir tenir un plàsmid on la seqüència de l'ínter fos correcta, es van reproduir els canvis trobats en els pacients d'ínterès. El primer dels canvis o mutacions que es va reproduir al laboratori ha estat el canvi que duen dues famílies en el codó nº 25. La posició exacta és al nucleòtid 5636 del gen GH1 (GI 183148) Gene Bank. Aquest canvi el duen en heterozigosi, i provoca la substitució d'una Fenilalanina (F) per una Tirosina (Y). L'altre canvi és al codó nº 173, la posició 6633 del gen GH1. Aquest canvi a la seqüència de l'ADN provoca el canvi d'aminoàcid Valina (V) per Leucina (L).

- Phe 25 Tyr. 5636 T>A
- Val 173 Leu. 6633 G>C

I) Seqüència normal:





A la Figura 62 es mostra el canvi produït en el codó 25:

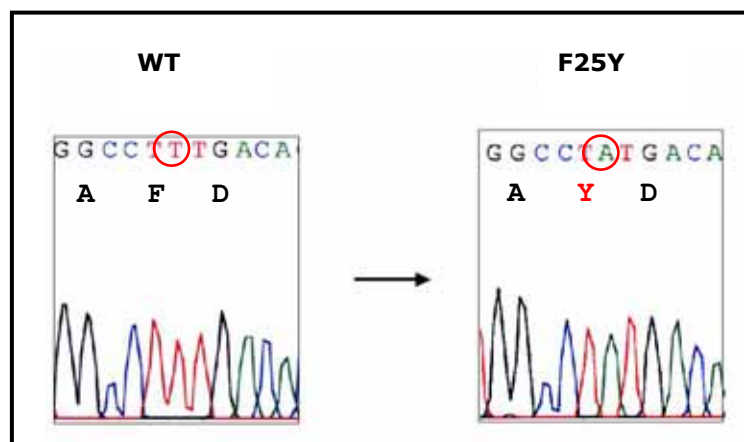


Figura 62. Electroferograma que mostra el canvi en el codó nº 25 de GH1. Es tracta de la seqüència de l'insert mutat dins el plàsmid d'expressió.

A la Figura 63 es mostra el canvi produït en el codó 173:

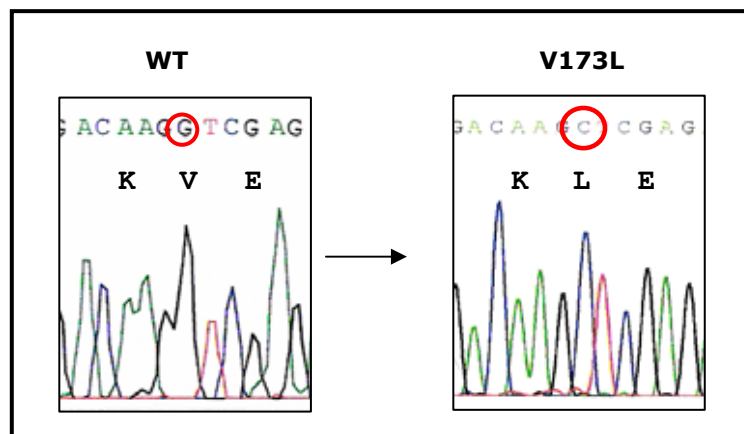


Figura 63. Electroferograma que mostra el canvi en el codó 173 de GH1 provocat mitjançant mutagènesi dirigida.

També s'ha introduït un canvi en una diana de restricció que es trobés al plàsmid i no a l'insert (GH). Com s'ha explicat abans, aquesta diana és Hind III i el canvi que s'ha dissenyat es pot veure a la Figura 64.

Aquest canvi serveix per seleccionar els plàsmids que han adquirit el canvi desitjat a l'insert d'aquells que no l'han agafat, ja que el plàsmid amb la mutació a la diana també el portarà a l'insert.

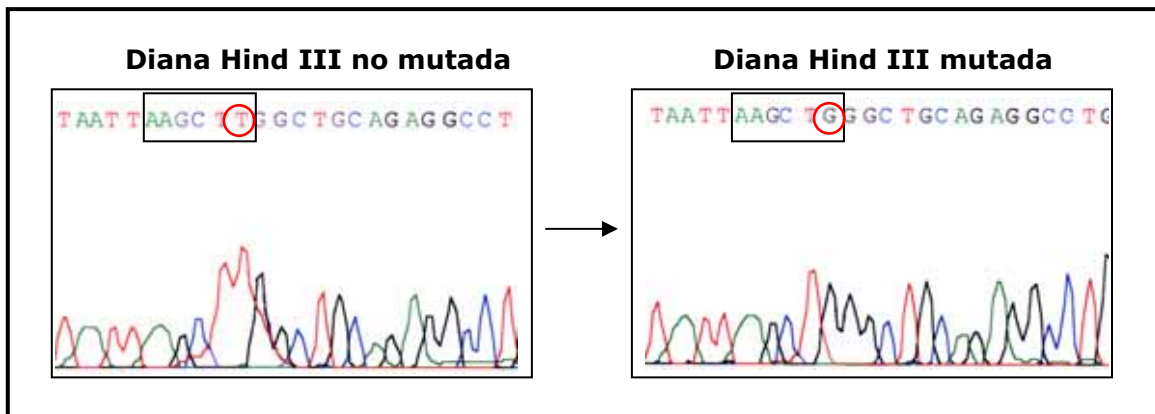


Figura 64. Electroferogrames que mostren el canvi introduït en la diana Hind III mitjançant mutagènesi dirigida.

Un cop es van tenir tots els canvis es procedí a l'expressió en cèl·lules M15, on es van expressar les proteïnes recombinants.

6.2 Expressió de GH

Per tal d'investigar si els canvis que porten alguns pacients en la seva seqüència d'ADN provoquen una activitat biològica disminuïda de la seva hormona de creixement, es va obtenir l'expressió de la proteïna recombinant normal o WT i de les mutants F25Y, i V173L per poder comparar l'efecte de les mutants amb la WT obtinguda al laboratori i una proteïna GH recombinant comercial.

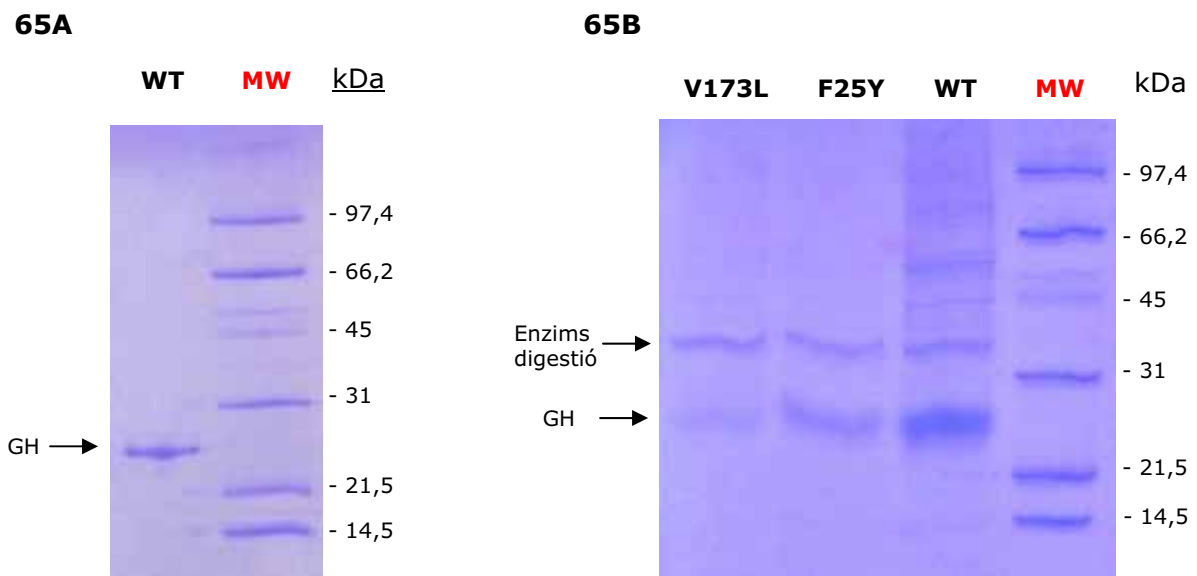


Figura 65. Electroforesi en gels de poliacrilamida de les proteïnes. La tinció es va realitzar amb blau de Coomassie. En la Figura 65A es mostra la proteïna GH-WT dialitzada. En la figura 65B es mostren les tres proteïnes un cop ja estan digerides amb els enzims TAGzyme. La proteïna recombinant V173L és menys abundant que la F25Y, i aquesta ho és menys que la WT.

Amb aquestes proteïnes ja purificades (Figura 65), es van realitzar els experiments *in vitro* amb tres models cel·lulars (les línies HepG2, C-28/I2 i els condrocits de cartílag de creixement).

6.2.1 Resultats del Western Blot

Es va comprovar mitjançant Western Blot la immunogenicitat de les proteïnes GH recombinants. El resultat va ser que la banda corresponent a la GH era detectada pel sistema d'anticossos utilitzat.

6.2.2 Quantificació de les proteïnes

Es van quantificar les proteïnes recombinants mitjançant dos mètodes:

1) Determinació de proteïna total mitjançant el *Micro BCA™ Protein Assay Reagent kit* (Pierce Rockford, IL). Els resultats obtinguts van ser els indicats a la Taula 56:

Proteïna	[Proteïna Total]
GH-WT	435 µg/ml
GH-F25Y	260 µg/ml
GH-V173L	168 µg/ml

Taula 56. Determinació de la concentració de proteïna per a cada una de les proteïnes recombinants.

2) Determinació de la concentració de GH immunoreactiva per quimioluminiscència (QLA) en un immunoanalitzador automatitzat Immulite de Diagnostics Products Corporation (Los Angeles, CA, USA). Els resultats van ser els indicats a la Taula 57:

Proteïna	[Proteïna Total]	GH immunoreactiva	% Immunoreactivitat
GH-WT	5 µg/ml	4 µg/ml	100 %
GH-F25Y	5 µg/ml	2,76 µg/ml	69 %
GH-V173L	5 µg/ml	0,6 µg/ml	15 %

Taula 57. Determinació de la concentració de proteïna GH per a cada una de les proteïnes recombinants.

A la Taula 58 es pot observar que la proteïna menys immunogènica és la V173L.

6.2.3 Test de proliferació cel·lular per incorporació de timidina-³H a l'ADN dels condrocits en cultiu

La incorporació de timidina tritiada a l'ADN s'ha utilitzat per analitzar si les proteïnes recombinants produïdes al nostre laboratori podien ser tòxiques pel cultiu cel·lular.

Els resultats obtinguts dels experiments realitzats d'incorporació de timidina-³H a l'ADN dels condrocits en cultiu ens demostren que la proliferació de les cèl·lules tractades en presència de les proteïnes recombinants és similar a la incorporació de timidina de les cèl·lules tractades en presència de GH comercial Genotonorm® (Taula 58, Figura 66).

	Exp 1		Exp 2		Exp 3		Exp 4		Mitja ± DS
	Cpm		Cpm		Cpm		Cpm		
Control	2096	100%	1582	100%	1591	100%	1136	100%	100% ± 0,00
Vit D 10⁻⁷ M			826	52,2%	1143	71,8%	664	58,4%	60,8% ± 10,02
GH (Genotonorm)			868	54,8%	1503	94,4%	1113	98%	82,4% ± 23,97
GH (WT)	1615	77%	960	60,6%	1780	111%	957	84%	83,15% ± 20,99
GH (F25Y)	1532	73%	1170	74%	1773	111%	1073	94,4%	88,1% ± 18,17
GH (V173L)	2060	98%	966	61%	1786	112%	901	79,3%	87,57% ± 22,21
Vit D 10⁻⁷ M + GH (Genotonorm)			547	34,6%	1043	65,5%	655	57%	52,3% ± 15,96
Vit D 10⁻⁷ M + GH (WT)	507	24%	468	29,6%	1021	64%	641	56,5%	43,5% ± 19,69
Vit D 10⁻⁷ M + GH (F25Y)	759	36%	432	27,3%	1265	79,5%	664	58,4%	50,3% ± 23,46
Vit D 10⁻⁷ M + GH (V173L)			674	42,6%	1409	88%	706	62%	64,2% ± 22,78

Taula 58. Incorporació de timidina-³H en condrocits humans. En vermell es ressaltava les condicions que provoquen una disminució en la incorporació de timidina.

La Vitamina D inhibeix la proliferació dels condrocits en cultiu ja sigui en presència o absència de GH, en canvi, la proteïna GH ja sigui la comercial o les recombinants, no inhibeix la proliferació dels condrocits (Figura 66). Així doncs, es pot afirmar que la preparació de proteïna recombinant no és tòxica per a la proliferació de les cèl·lules ni per si mateixa, ni per qualsevol component romanent de les solucions.

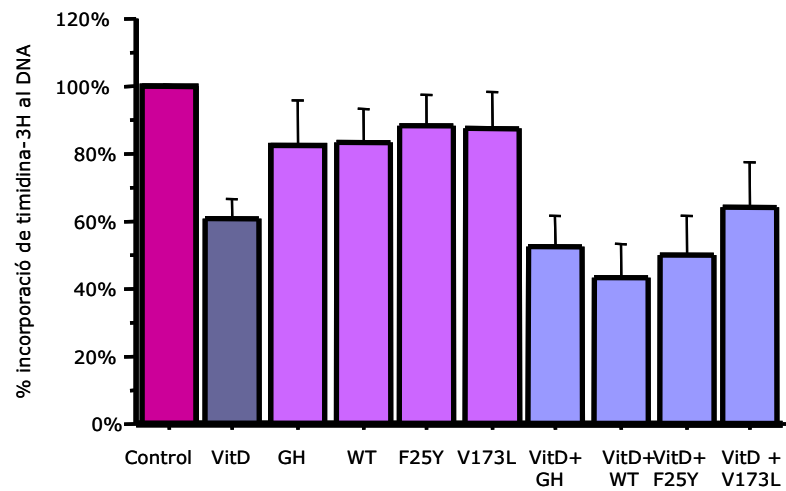


Figura 66. Representació gràfica dels resultats obtinguts en l'estudi de proliferació cel·lular per incorporació de timidina-³H l'ADN dels condrocits en cultiu. Anàlisi estadístic realitzat mitjançant un test-t de Wilcoxon.

6.2.4 Determinació de la bioactivitat de les GH recombinants per mètodes semi-quantitatius

A l'inici es va estudiar l'expressió de diferents gens en línies cel·lulars preestablertes induïts pel suplement del medi amb la proteïna GH, ja sigui les recombinants o la comercial. Es va buscar una línia cel·lular que fos útil com a model per testar *in vitro* els futurs canvis en proteïnes que es realitzessin al laboratori.

Es van utilitzar primer dos models: una línia de fetge, que és productor d'IGF1 per excel·lència, i una línia condrocítica, que és un productor autocrí-paracrí d'IGF1.

Els gens que es van determinar van ser els següents:

- IGF1
- STAT5B
- GHR
- IGF1R

Els resultats obtinguts mitjançant el mètode de quantificació relativa dels gens estudiats en els models cel·lulars HepG2 i C-28/I2 van ser els representats a les Figures 67 i 68.

HEPG-2

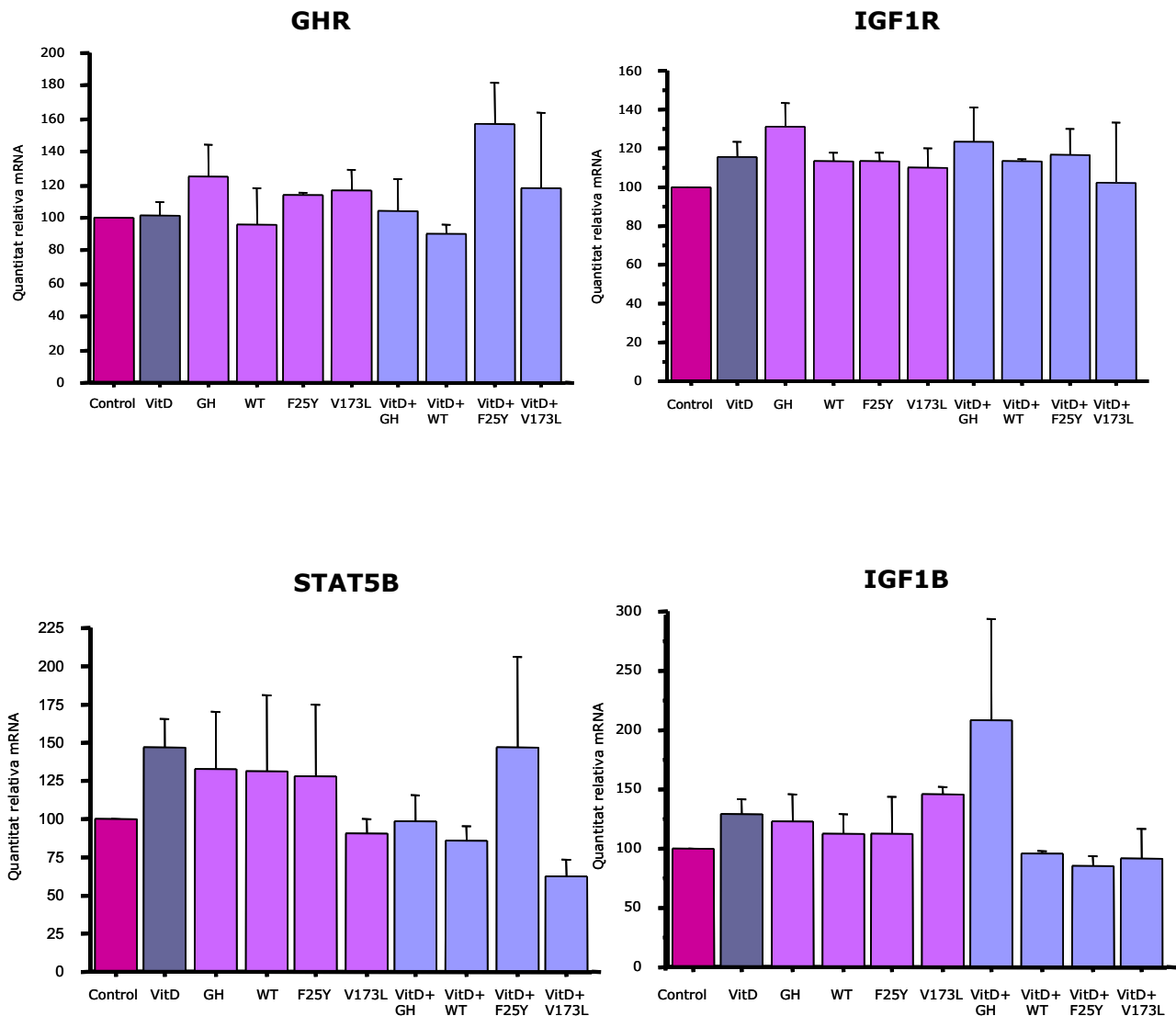


Figura 67. Gràfiques on es mostren els resultats obtinguts per la determinació semiquantitativa de l'expressió dels gens GHR, IGF1R, STAT5B i IGF1 en la línia cel·lular HepG2. Estadística realitzada mitjançant Test de Wilcoxon. Els resultats són expressats com a mitja ± error estàndard.(n=4).

Les diferències observades en l'expressió dels quatre gens no són significatives per a cap dels tractaments estudiats. Es veu un augment del doble en l'expressió del transcrit IGF1B quan es tracta el cultiu amb Vitamina D en combinació amb GH comercial en comparació amb el tractament control com a fet destacable. L'expressió dels altres gens gairebé no és modulada pels tractaments realitzats en el cultiu cel·lular.

En aquesta línia cel·lular no s'expressa el transcrit IGF1A.

C-28/I2

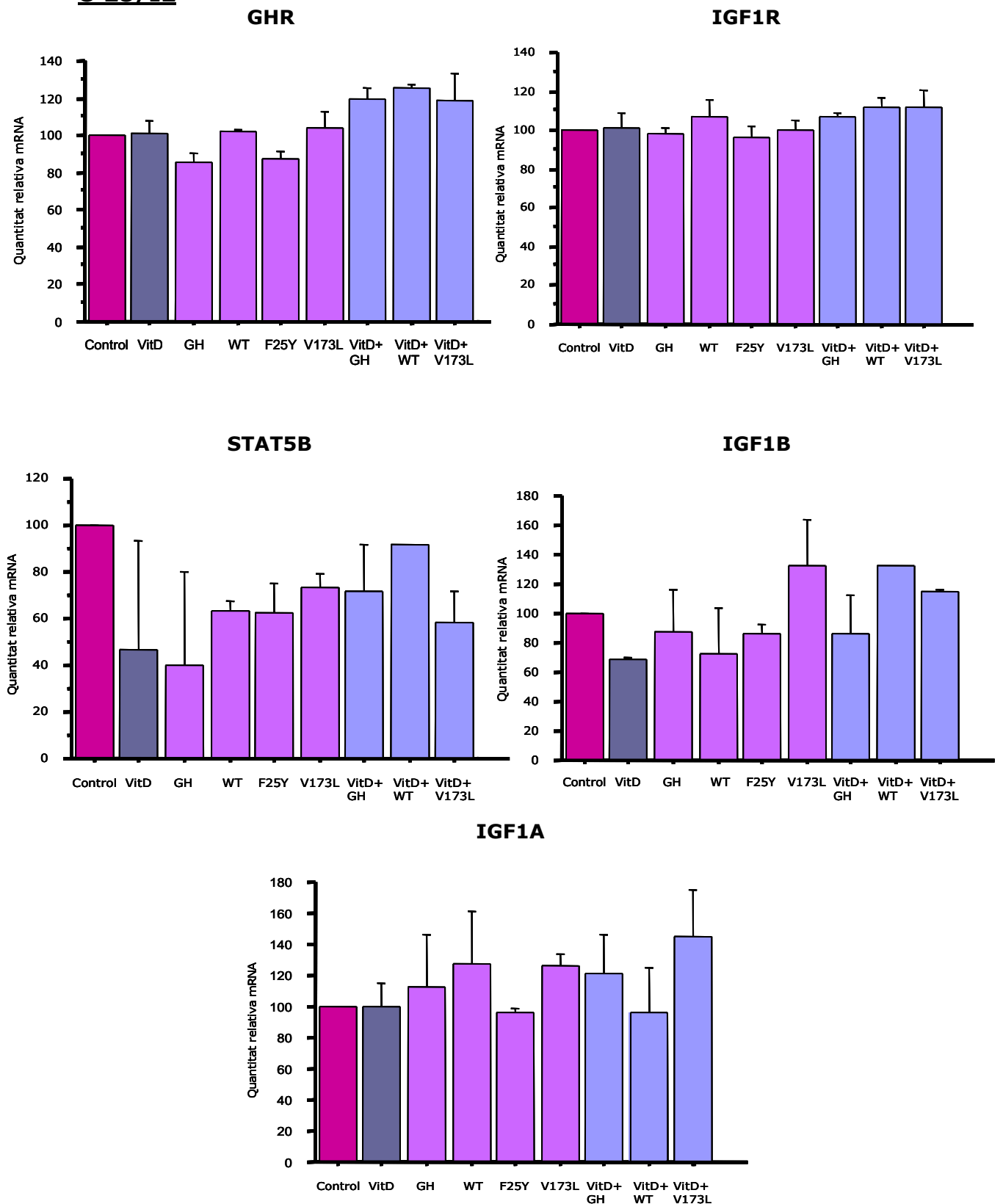


Figura 68. Gràfiques on es mostren els resultats obtinguts mitjançant la determinació semiquantitativa dels gens GHR, IGF1R, STAT5B i IGF1 en la línia cel·lular C-28/I2. Estadística realitzada mitjançant Test de Wilcoxon. Els resultats són expressats com a mitja ± error estàndard.(n=4).

Els colors lilosos corresponen als tractaments que no comporten addició de Vitamina D al medi de cultiu. Les barres de colors blavosos corresponen als tractaments on sí que s'afegeix Vitamina D al medi de cultiu.

En aquest altre model cel·lular sí que s'expressava l'IGF1A, i per tant es va poder fer l'estadística corresponent.

L'expressió dels gens no sembla estar modulada per la presència de GH en el medi de cultiu, possiblement per tractar-se de línies immortalitzades i adaptades al medi. Aquesta és la raó per la qual es va decidir provar els tractaments en un model cel·lular establert al laboratori i que sí que es regula mitjançant Vitamina D i GH, un cultiu primari de condrocits epifisaris fetals humans.

6.2.5 Determinació de la bioactivitat de les GH recombinants per PCR quantitativa a temps real

Es van fer cinc experiments amb 5 cultius diferents de condrocits humans. En aquests cinc experiments es van fer els tractaments combinant la Vitamina D $10^{-7}M$ amb les diferents hormones de creixement, és a dir, la GH comercial i les diferents GH recombinants produïdes al laboratori.

Condrocits Fetals Humans

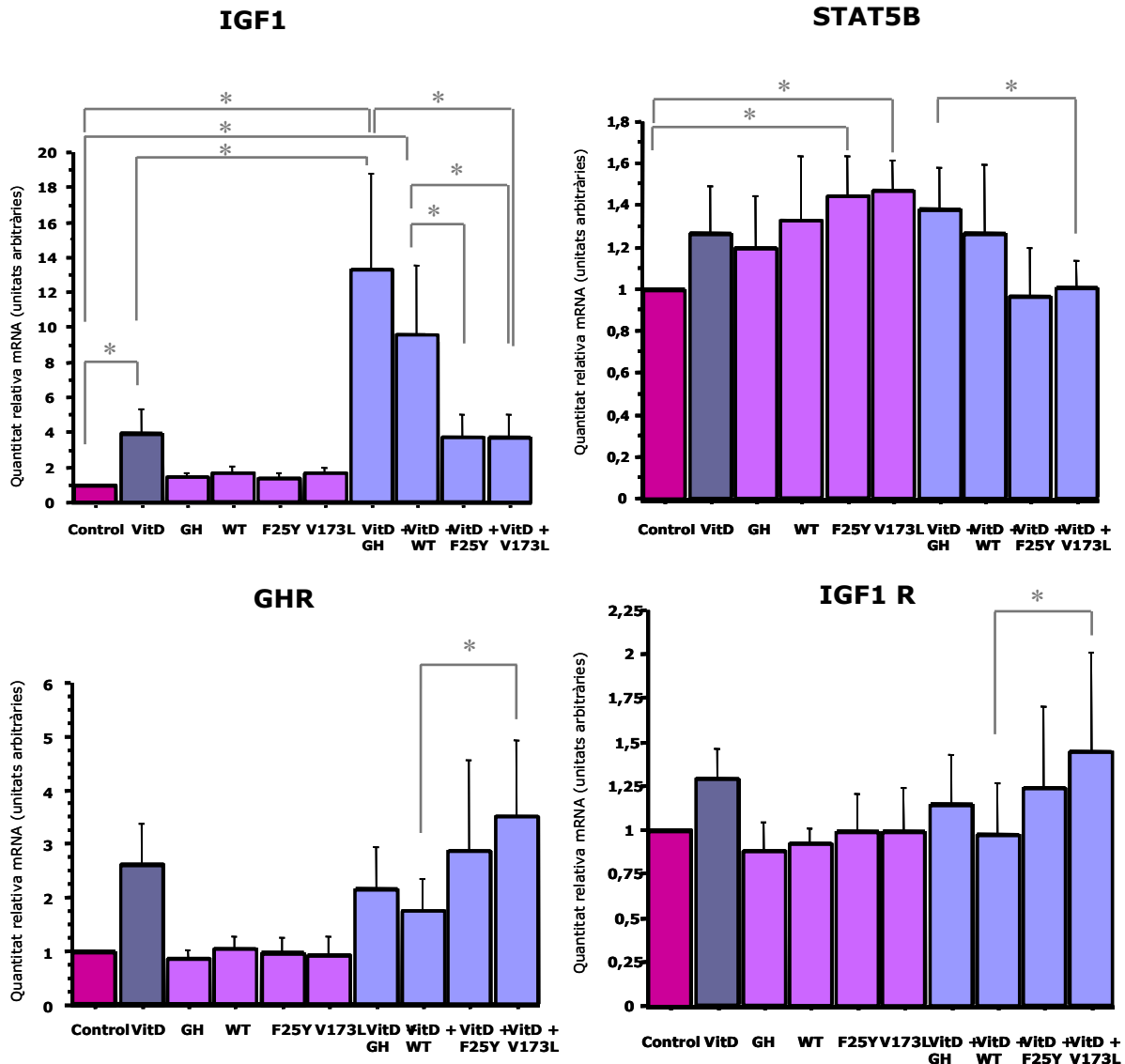


Figura 69. Determinació per PCR quantitativa a temps real de l'expressió dels gens IGF1, STAT5B, GHR i IGF1R en cinc experiments de cultius de condrocits fetals humans incubats amb Vitamina D i/o les diferents GHs (comercial i recombinants obtingudes al laboratori). Anàlisi estadístic realitzat mitjançant test de Wilcoxon * p<0,05. Els resultats són expressats com a mitja ± error estàndard.

Els resultats observats a la Figura 69 mostren que:

IGF1: En aquest gen és on es veu un efecte més important dels tractaments. L'IGF1 és induït quatre vegades el valor de la mostra control (sense tractament) quan s'afegeix Vitamina D al medi. En canvi, quan s'afegeix GH sola no es veu inducció de l'expressió de IGF1. L'efecte més important es dona quan es combina

Vitamina D amb l'hormona GH. Quan es combina amb l'hormona comercial, l'increment és de 13 vegades com a terme mitjà, tot i que hi ha experiments on augmenta la inducció fins a 33 vegades, o uns altres que només augmenta 3 vegades. El tractament combinat amb l'hormona recombinant WT, provoca el mateix efecte, però amb una inducció inferior. Els resultats van des de 22 en un experiment fins a 1,6 en un altre. I finalment, quan es tracta de les condicions on es combina la proteïna recombinant mutant F25Y o V173L en combinació amb Vitamina D, la inducció encara és inferior. Aplicant el test de Wilcoxon s'evidencien diferències significatives en molts tractaments. El fet més destacat és que hi ha diferència significativa entre tractar els condrocits amb la combinació de Vitamina D amb les proteïnes recombinants, ja sigui la F25Y o la V173L en comparació amb el tractament que combina la Vitamina D amb la proteïna WT. També s'observen diferències significatives entre els tractaments que combinen la Vitamina D amb la proteïna GH o la WT en comparació amb el tractament control.

STAT5B: S'observa que en combinació amb Vitamina D, les hormones recombinants produeixen una inducció menys elevada que la combinació de la Vitamina D amb l'hormona comercial GH. La combinació de GH comercial amb Vitamina D produeix una inducció d'aproximadament 1,4 mentre que la inducció amb de Vitamina D la WT indueix 1,3 vegades, amb F25Y produeix una inducció de 1, i amb V173L una inducció de 1,05. Aplicant el test de Wilcoxon hi ha diferència significativa entre el tractament amb F25Y i el tractament Control, així com entre el tractament amb V173L i el tractament Control. També hi ha diferència significativa entre el tractament combinat de Vitamina D amb la proteïna recombinant V173L i el tractament combinat de la Vitamina D amb la GH comercial.

GHR: Es veu un increment en l'expressió de GHR en presència de Vitamina D. L'hormona de creixement sola no estimula l'expressió, però en combinació amb la Vitamina D es veu una inducció que va des de 1,5 (WT) fins a 3,5 (V173L). Aplicant un test de Wilcoxon, hi ha diferència significativa entre el tractament combinat de la Vitamina D amb WT i el tractament combinat de Vitamina D i la proteïna recombinant V173L.

IGF1R: El patró d'expressió d'aquest gen és similar que el del gen GHR, però amb uns augments d'inducció menys pronunciats que en el gen anterior. En presència de Vitamina D, la recombinant F25Y indueix l'expressió 1,25 vegades, i la recombinant V173L indueix 1,5 vegades. Aplicant un test de Wilcoxon, hi ha

diferència significativa entre el tractament combinat de la Vitamina D amb WT i el tractament combinat de Vitamina D i la proteïna recombinant V173L.

Segons aquests resultats, en el gen IGF1, hi ha diferència significativa entre tractar el condrocits humans amb la proteïna recombinant WT o les proteïnes mutants F25Y o V173L. Això significa que els canvis en la proteïna provoquen una proteïna menys eficaç per induir l'expressió del gen IGF1.

7. ESTUDI DELS POLIMORFISMES DE GHR

Els resultats obtinguts de l'estudi del polimorfisme d3/fl-GHR en les cèl·lules condrocítiques epifisials dels 5 fetus humans han estat els següents:

- 1 fetus amb el genotip d3/d3-GHR
- 2 fetus amb el genotip fl/fl-GHR
- 2 fetus amb el genotip d3/fl-GHR

Com es pot observar, en només 5 fetus tenim els tres patrons de polimorfismes possibles.

A la Figura 70 hi ha l'electroforesi en gel d'agarosa del producte obtingut de l'amplificació per PCR de l'ADN de GHR.

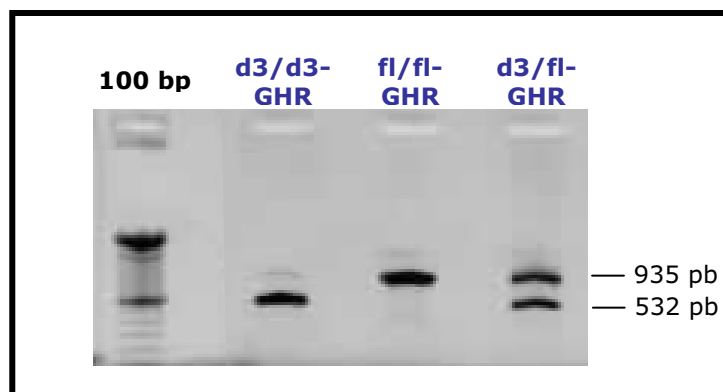


Figura 70. Electroforesi en gel d'agarosa dels productes obtinguts de l'amplificació per reacció de PCR del gen GHR. Hi ha representats els tres polimorfismes estudiats. Es mostren els patrons de bandes corresponents als tres polimorfismes trobats en les cèl·lules condrocítiques.

Es van confirmar els resultats amplificant l'ARN missatger de GHR a partir de les cèl·lules condrocítiques. Es va fer l'amplificació mitjançant PCR i posteriorment es

va fer l'electroforesi en gel de poliacrilamida. El revelat es va fer amb tinció amb nitrat de plata (Figura 71).

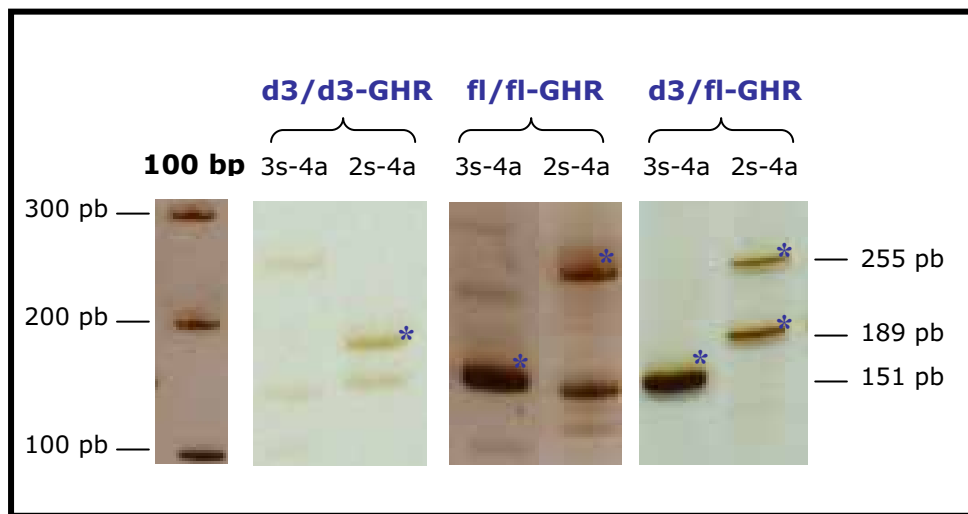


Figura 71. Tamanyes de les bandes dels productes de PCRs obtinguts a partir de l'amplificació de l'ARN missatger de GHR i posterior electroforesi en gel de poliacrilamida. * Bandes corresponents als transcrits dels tamanyes esperats.

A la Figura 71 es mostra el patró de bandes corresponent a l'amplificació de l'ARN missatger de GHR. Les bandes que no es troben marcades amb un asterisc van ser retallades i reamplificades i es va comprovar per seqüenciació que eren amplifícacions inespecífiques de la reacció de PCR. En canvi, les bandes marcades amb un asterisc (*) són les esperades per tamany. A més a més es van retallar, reamplificar i seqüenciar, comprovant que les bandes corresponien al transcrit esperat.

Expressió del gen IGF1 en funció del genotip de GHR

Els resultats d'expressió del gen IGF1 de cada experiment (és a dir, cada fetus) en funció del polimorfisme d3/fl-GHR es mostra a la Taula 59:

EXPERIMENT	GENOTIP GHR	TRACTAMENTS EN CONDRÒCITS FETALS HUMANS									
		Control	Vit D	GH	WT	F25Y	V173L	VitD+ GH	VitD + WT	VitD+ F25Y	VitD+ V173L
1	d3/d3	1	2,56	1,04	0,92	1,23	1,93	15,92	6,51	4,50	5,30
2	d3/fl	1	4,76	1,99	0,88	1,89	1,30	6,30	1,58	1,02	0,87
3		1	8,80	2,23	2,24	1,72	1,63	33,61	22,16	4,61	7,43
4	fl/fl	1	1,71	0,80	2,86	ND	2,57	7,52	15,01	7,72	4,30
5		1	2,06	1,04	1,37	0,70	0,88	3,20	2,64	0,80	0,65

Taula 59. Resultats de l'expressió d'IGF1 mitjançant la tècnica de PCR a temps real en funció del genotip del polimorfisme d3/fl de GHR. ND= no determinat.

Degut al nombre insuficient de casos amb cada un dels tres genotips no és possible analitzar si el polimorfisme d3/fl-GHR s'associa amb la resposta dels cultius a l'estimulació de l'expressió d'IGF-1 amb Vitamina D més GH.

DISCUSSIÓ

1. ESTRUCTURA DEL GEN GH1 EN POBLACIONS CONTROL I AMB RETARD DE CREIXEMENT

1.1 Polimorfismes del gen GH1 en la població control

Les primeres alteracions genètiques que es van descriure com a causa de dèficit aïllat idiopàtic de GH varen ser grans delecions en el cromosoma 17 que comprenien tot el gen GH1. Aquestes delecions van ser descobertes mitjançant Southern blot, i eren unes delecions de 6.7, 7.0, o 7.6 kb, presentant la majoria de pacients la delecio de 6.7 kb (Phillips *et al.*, 1981).

No va ser fins el 1989 que Chen *et al.*, van seqüenciar el clúster del gen GH1 sencer (66500 pb). Giordano *et al.*, l'any 1997 van seqüenciar el gen GH1 en pacients amb IGHD a la recerca de mutacions puntuals que poguessin explicar la talla baixa, i es van trobar amb una regió amb un elevat grau de variabilitat nucleotídica al promotor, tant en pacients com en un grup control. Aquestes variacions puntuals en la seqüència del gen, encara que algunes impliquin un canvi d'aminoàcid, no es corresponen necessàriament amb un fenotip patològic. Els polimorfismes són variacions en la seqüència de l'ADN que impliquen un o varis nucleòtids (parlem de SNP *single nucleotid polymorphism* quan es tracta d'un sol nucleòtid) dins una mateixa espècie, o entre un parell de cromosomes en un individu. Els primers autors que van descriure els polimorfismes del gen GH1 van ser Giordano *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 2000 i Horan *et al.*, 2003. Donada, per tant, la densitat de polimorfismes que s'estaven descrivint, es va fer necessari establir el patró de canvis que pot considerar-se de la nostra població i investigar quins patrons acompanyen a una talla normal i quins no.

El treball realitzat al nostre laboratori (Esteban *et al.*, 2006) ha estudiat el patró de polimorfismes del gen sencer, ja que hi ha hagut altres autors que han estudiat una part del gen, com Giordano *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 2000 i Horan *et al.*, 2003, que han estudiat la variació gènica dins el promotor, la regió 5'UTR o l'intró 4.

Horan *et al.*, l'any 2003 van estudiar l'activitat transcripcional dels al·lels més freqüents de la regió promotora en controls adults de la població normal, i van associar alguns haplotips individuals amb l'alçada.

Les poblacions que s'han descrit anteriorment tenien pocs controls de talla normal (Giordano *et al.*, 1997), un interval molt estret d'alçades en controls masculins

(Horan *et al.*, 2003) o pacients amb IGHD que encara no havien arribat a la talla final o alçada adulta (Giordano *et al.*, 1997; Horan *et al.*, 2003 i Hasegawa *et al.*, 2000). El nostre estudi va ser dissenyat per caracteritzar les variacions en la seqüència del gen GH1 en individus comprnent el rang de talles adultes normals (entre -2 i +2 SDS), d'acord amb els estàndards de la nostra població (Carrascosa *et al.*, 2004). L'alçada de la població en global seguia una distribució normal, i els dos sexes van ser igualment representats. La seqüència homozigòtica GI:183148 (Chen *et al.*, 1989) es va determinar com a referència.

Els nostres resultats (Esteban *et al.*, 2006) estableixen un mapa de 25 SNPs (P1-P25) presents en més d'un 1% dels individus. Més del 50 % dels SNPs (14) es troben localitzats al promotor i la regió 5'UTR del gen. La resta dels SNPs (11) es troben localitzats en els introns 1, 2 i 4 mentre que en les regions codificants només es van trobar 3 SNPs (exó 1 i exó 4). Dos d'aquests canvis predeien un canvi d'aminoàcid (Thr3Ala/Pro, Val110Ile). El canvi V110I (P21) havia estat descrit per Millar *et al.*, l'any 2003 com un canvi trobat tant en pacients amb estatura baixa com en controls. La Val110 es troba a l'hèlix 3 en el *core* hidrofòbic de l'hèlix. La substitució per Ile és conservativa, tot i que la Ile té un residu més gran que podria provocar un impediment estèric més gran que la Val. El canvi Thr3Ala/Pro ja va ser descrit per Miyata *et al.*, 1997 i també per Millar *et al.*, 2003. Els nostres resultats confirmen 13 SNPs dels 15 publicats per Horan *et al.*, en el seu treball. Els punts P4, P7 i P24 van ser descrits per Hasegawa *et al.*, l'any 2000. El nostre treball descriu quatre SNPs nous (P8 a la zona de resposta a VDR, P19 i P20 a l'intró 2 i P25 a l'intró 4).

Els nostres resultats han demostrat que els quatre SNPs amb la variació al·lèlica més gran (P4, P7, P10 i P24) no contribueixen a la determinació de la talla. Només alguns polimorfismes presents en baixa freqüència s'associen amb la talla adulta: P6, P12, P17 i P25 contribueixen al 6,2% de variació de la talla ($p=0,0007$) amb els genotips A/G a P6, G/G a P6 i A/G a P12 disminuint la SDS de talla ($-0,063 \pm 0,031$; $-0,693 \pm 0,650$ i $-0,489 \pm 0,265$; M \pm EE, respectivament) i els genotips A/T a P17 i T/G a P25 augmentant la SDS de talla ($+1,094 \pm 0,456$ i $+1,184 \pm 0,432$ respectivament) (Esteban *et al.*, 2006).

El SNP P6 es troba a la seqüència de resposta a Pit1 en el promotor del gen GH1 i va ser descrit per primer cop per Wagner *et al.*, 1997 i Giordano *et al.* el 1997 i després per Horan *et al.*, el 2003. Un estudi recent de Giordano *et al.*, 2006 ha demostrat *in vitro* que l'haplotip del promotor portador del nucleòtid alternatiu G a

P6 presenta una activitat transcripcional disminuïda a la meitat de la present pel portador d'A a P6. També els genotips a P6 han estat associats a una disminució del risc de patir càncer de mama mitjançant nivells de secreció disminuïts de GH i d'IGF1 (Wagner *et al.*, 2005; Mulhall *et al.*, 2005).

1.2 Estudi dels canvis d'aminoàcid en poblacions amb retard de creixement

L'obtenció del mapa polimòrfic del gen GH1 en la població control ens ha permès estudiar les poblacions de pacients per tal de detectar canvis en la seqüència diferents dels SNPs. En dues poblacions de pacients estudiades (475 nens de l'Hospital Vall d'Hebron amb retard de creixement crònic, deficiència de secreció de GH i/o bona resposta al tractament amb GH i 253 nens RIUC, talla baixa i secreció normal de GH procedents d'un assaig clínic multicèntric espanyol), s'han detectat canvis en la seqüència de gen GH1 diferents dels SNPs de la població control en el 9,5% i 12,6%, respectivament. Creiem que es tracta d'una població prou extensa com per poder concloure que representa el que es pot trobar en poblacions amb aquestes característiques fenotípiques. No hi ha de moment a la literatura cap estudi del gen GH1 complet en poblacions patològiques tan extenses.

La més alta densitat de canvis en la seqüència de GH1 es troba, de forma similar als SNPs, a les regions promotora, 5'UTR i introns. Els canvis en les regions codificants i que prediuen un canvi d'aminoàcid són les menys freqüents i sumen en terme mitjà en les dues poblacions l'11,3% dels canvis i per tant se'n dedueix que només l'1% és portador d'una mutació que impliqui un canvi d'aminoàcid.

Entre els canvis en la seqüència del gen que comportaven un canvi en la seqüència de la proteïna GH1 (canvi d'aminoàcid), les dues mutacions estudiades en el treball actual (F25Y i V173L) no han estat descrites a la literatura fins el moment.

La mutació Phe25Tyr la provoca un canvi en heterozigosi a l'exó 2 de la GH [5636(T>A)]. Aquesta mutació va acompanyada de dos canvis més en la seqüència del gen (sempre en heterozigosi): també a l'exó 2, la posició 5634(C>A) i a l'intró 4 la posició 6409 (A>del). Aquestes altres dues mutacions no provoquen canvi d'aminoàcid i s'ha donat el cas que en les dues famílies estudiades, la mutació que comporta el canvi d'aminoàcid sempre va acompanyada d'aquests altres dos canvis. A més a més, com s'ha comentat anteriorment, aquests tres canvis es troben al mateix al·lel, i la seqüència nucleotídica de tot l'al·lel [inclosos els 25 SNPs descrits pel nostre laboratori (Esteban *et al.*, 2006)] és exactament la mateixa en les dues famílies, el que fa pensar que, tot i que aparentment no hi hagi cap relació entre les

dues famílies, han de tenir un origen comú ja que és molt difícil que els tres canvis apareguts en un al·lel es donin espontàniament en dues famílies diferents i, a més a més, que coincideixin els 25 punts polimòrfics del gen GH1.

Pel que fa al canvi Val173Leu, el provoca una substitució nucleotídica en heterozigosi a l'exó 5 [6633 G>C] d'un dels dos al·lells del gen GH1. Per tots els altres punts polimòrfics del gen, els dos al·lells són idèntics.

Es va decidir estudiar els canvis que provoquen canvi d'aminoàcid mitjançant diverses aproximacions:

- 1) En el cas de la mutació Phe25Tyr, com que s'acompanyava d'un canvi en l'intró 4, estudiant l'*splicing* en leucòcits de sang perifèrica.
- 2) Estudiant els dos canvis d'aminoàcid en quant a la filogènia i homologies amb les hormones GH d'altres espècies i del clúster humà dels gens GH i la predicció estructural.
- 3) Mitjançant la producció de les proteïnes *in vitro*, comparant l'efecte produït per les mutants amb la GH-WT tant per la seva immunoactivitat com per la seva bioactivitat.

L'estudi de mutacions que provoquen canvi d'aminoàcid en el gen GH1 ha estat realitzat per varis autors. Tot i amb això, només s'havien descrit 21 canvis d'aminoàcid en tot el gen.

La primera mutació descrita a la literatura va ser la que van descriure Cogan *et al.*, l'any 1993. Es tractava d'una família turca amb consanguinitat. En aquesta família hi havia 2 cosins amb una mutació en homozigosi que els provocava un codó d'*stop* després del residu 19 del pèptid senyal. Conseqüentment aquests pacients tenien dèficit greu de GH. A més a més, l'administració exògena de GH els provocava l'aparició d'anticossos anti-GH.

Takahashi *et al.*, l'any 1996 van estudiar el cas d'un nen amb un retard de creixement important però que no tenia dèficit de GH en les proves d'estimulació de secreció. Aquest pacient tenia un canvi d'aminoàcid en heterozigosi Arg77Cys. Aquests autors emeteren la hipòtesi que la Cys lliure podria formar un nou pont disulfur que podria canviar la càrrega o la conformació de la proteïna i reduir-ne la bioactivitat. En aquest treball es van fer estudis de fosforilació de les tirosines en cèl·lules IM-9 (línia limfoblàstica humana que expressa GHR). Els resultats van ser que la proteïna mutant tenia una gran afinitat per la GHBP (aquests estudis es van

fer amb la unió directa de la GH-WT o la mutant a GHBP recombinant i determinat per immunoprecipitació), que era menys activa que la GH-WT en quant a la fosforilació de les molècules transductores del senyal així com que inhibia la fosforilació de les tirosines per la GH-WT, tenint un efecte dominant negatiu. Aquests mateixos autors, un any més tard (Takahashi *et al.*, 1997), van estudiar un pacient amb la mutació Asp112Gly en heterozigosi. Aquesta mutació es troba al lloc 2 d'unió a GHR, la qual cosa indica que aquesta GH es podria unir a la primera molècula de GHR però no a la segona. En aquest treball determinaren la capacitat de fosforilació de les proteïnes GH-WT i mutant en GHR, JAK2 i STAT5 a la línia IM-9, demostrant que la proteïna mutant era un estimulador menys potent que la proteïna GH-WT.

Miyata *et al.*, l'any 1997 van descriure dues mutacions més que provocaven canvi d'aminoàcid: Thr → Ala, al tercer codó del pèptid senyal i Arg183His. Aquestes mutacions van ser trobades en 3 pacients japonesos amb IGHD.

Wagner *et al.*, l'any 1998 van descriure una mutació en un pacient amb IGHD que provocava un codó d'*stop* després del 22è codó del pèptid senyal.

L'any 2001 Koike *et al.*, van estudiar el gen GH1 en pacients amb diabetis mellitus tipus 2 que tenien anticossos anti-pituitaris, i van detectar la mutació Pro2Gln en un dels pacients estudiats.

Binder *et al.*, l'any 2001 van descriure la mutació Val110Phe en una família amb varis germans amb dèficit de GH. La Val110 es troba situada a prop de l'extrem N-terminal de la tercera hèlix de la proteïna GH, i està posicionada al *core* hidrofòbic de la proteïna. Aquests autors estudiaren la filogènia de la proteïna en aquesta posició, i en resultà que aquest aminoàcid es troba conservat en mamífers, alguns amfibis i ocells. El canvi per l'aminoàcid Phe, que és més voluminós, podria introduir impediment estèric a la proteïna. Però ja hem comentat que un canvi d'aminoàcid diferent (Ile) en aquest mateix punt ha estat detectat per Horan *et al.*, 2003 i per nosaltres (Esteban *et al.*, 2006) en subjectes amb talla normal.

Millar *et al.*, l'any 2003 van fer un estudi en població control (154 homes de talla mitja $1,76 \pm 0,07$ m), 41 nens amb talla baixa i 11 nens amb talla baixa i IGHD. Van trobar els següents canvis d'aminoàcid: Leu-11Pro, Arg16Cys, Thr27Ile, Lys41Arg, Asn47Asp, Ser71Phe, Glu74Lys, Gln91Leu, Ser108Arg, Ser108Cys i Thr175Ala. Tal i com es comenta posteriorment, els canvis Thr27Ile, Lys41Arg, Asn47Asp,

Ser71Phe, Ser108Arg i Thr175Ala redueixen la capacitat d'activació de la via JAK/STAT a través de GHR. Lys41Arg i Thr175Ala són claus per la unió de GH a GHR pel lloc 1. Pels quatre canvis restants no es troba una explicació en l'estructura que clarament justifiqui l'activació disminuïda de la via JAK/STAT.

Lewis *et al.*, l'any 2004 descriuen la mutació Ile179Met en un pacient amb talla baixa però amb un test de secreció de GH normal. Aquest és un clar exemple de GH bioinactiva, ja que tot i detectar-se l'hormona GH en sang d'una manera normal, l'activació de la via ERK no es realitza de forma correcta, afectant això la talla del pacient. Aquesta variant també és descrita posteriorment a l'apartat 4.4.3.

I finalment, Besson *et al.*, l'any 2005 van descriure la mutació Cys53Ser en un pacient que tenia una GH bioinactiva. Aquest pacient tenia les característiques clíniques d'un pacient amb deficiència de GH, però en canvi en els tests de secreció els valors de GH eren normals o fins i tot una mica elevats. Aquesta mutació aboleix el pont disulfur entre la Cys53 i la Cys165. Tot i que el trencament d'aquest pont disulfur podria no induir cap canvi en l'estructura del *four-helical bundle* de la GH, la mutació provoca que el *loop* que uneix l'hèlix 1 amb la 2 quedi lliure degut al trencament del pont disulfur que el mantenia unit a l'hèlix 4 i això provoca una afinitat més baixa amb el receptor.

2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GH EN LEUCÒCITS DE SANG PERIFÈRICA

L'estudi de l'expressió d'ARN de GH ha estat realitzat en leucòcits de sang perifèrica, basant-nos en les publicacions de Weigent *et al.*, 1988; Hattori *et al.*, 1994; Palmeshofer *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996 que afirmaren que els leucòcits de sang perifèrica expressen ARN de GH. Weigent *et al.*, l'any 1988, demostraren que els leucòcits podien expressar i secretar GH immunoreactiva. Mitjançant *Northern Blot* demostraren que els leucòcits contenien ARN missatger que hibridava amb cDNA que codifica pel pèptid GH.

Els nostres resultats demostren que sí que es pot amplificar ARN missatger de GH1 en leucòcits de sang perifèrica tot i que els resultats són molt variables.

La regulació de la producció de GH per leucòcits de sang perifèrica difereix de la producció de GH per la glàndula pituïtària. Ni la GHRH ni la somatostatina influeixen

en la producció de GH per les cèl·lules mononuclears (Hattori *et al.*, 1994). Aquests autors estudiaren la funció de la GH en leucòcits de sang perifèrica, descartaren la funció paracrina de la GH i, en canvi, recolzaren la hipòtesi que la GH tindria una funció autocrina/paracrina quan els leucòcits entressin en els teixits on actua la GH produïda per la hipòfisi (fetge, ronyó, o ossos). També emeteren la hipòtesi que la GH podria tenir una funció en el desenvolupament i la funció del sistema immune. S'ha provat que el tractament amb GH exògena provoca un augment de l'activitat de les cèl·lules "natural killer", entre altres efectes. Aquests resultats s'obtenen mitjançant concentracions relativament elevades de GH exògena, i no se sap com afecten les baixes concentracions de GH produïdes pel sistema immune i si tenen un significat biològic. Aquests autors afirmaren que, en tot cas, si tingués algun significat biològic, la GH derivada dels leucòcits actuaria d'una forma autocrina/paracrina. Així doncs, dos sistemes que es pensava que no estaven relacionats (el sistema endocrí de la GH i el sistema immune) estan prou relacionats com per a que unes hormones que abans es creia que només eren produïdes pel sistema endocrí, també s'expressin en el sistema immune, la qual cosa indicaria que el dos sistemes estarien evolutivament relacionats.

Els resultats obtinguts al nostre laboratori demostren que, tot i que en determinades condicions es pot amplificar l'ARN missatger de GH1, aquest sistema no es pot establir com a mètode d'estudi de l'expressió d'aquest gen, ja que l'expressió de GH1 és tan baixa que no es pot estudiar en totes les mostres, ja que diversos factors externs, com ara la conservació de la mostra, poden afectar als resultats obtinguts. També hem demostrat que, tot i expressar-se les cinc variants reconegudes d'ARN missatger de GH, aquestes no sempre s'amplifiquen en els controls estudiats, probablement perquè l'expressió d'aquest gen no és constitutiva i és molt variable. En els casos en que s'ha amplificat l'ARN missatger de GH1, quan s'ha amplificat la variant 1, sempre ho ha fet un transcrit que pateix un processament no descrit anteriorment, consistent en la retenció de l'intró 1 a la seva seqüència i, en canvi, els processaments dels altres introns estan correctament realitzats. Aquest resultat obre la possibilitat a que en leucòcits de sang perifèrica s'expressi una variant mai descrita, tot i que altres autors com Hattori *et al.*, 1999 o Hattori *et al.*, 2001 troben altres transcrits que s'expressen en leucòcits de sang perifèrica i que són diferents als descrits a la hipòfisi.

Tot i que hi ha varis articles publicats on es treballa sobre l'ARN missatger de GH en leucòcits de sang perifèrica, sempre s'ha dissenyat un tipus de treball que no amplifica des del primer exó de l'ARN missatger (Binder i Ranke, 1995; Hattori *et*

al., 1999). Tots aquests treballs han consistit en l'amplificació de l'ARN mitjançant uns encebadors que anellen sobre el segon exó, i per tant mai han pogut amplificar aquest intró que nosaltres hem amplificat en tots els casos estudiats.

Mitjançant l'anàlisi amb el programa ORFfinder es poden predir les proteïnes o pèptids que es deriven d'una determinada seqüència nucleotídica. En el nostre cas, es va introduir la seqüència de nucleòtids que correspon a l'ARN aïllat a partir de leucòcits de sang perifèrica i que, un cop seqüenciat, es comprovava que contenia el primer intró dins la seqüència d'ARN. El pèptid amb un número d'aminoàcids més gran que aquest programa informàtic va predir, és un pèptid de 63 aminoàcids amb origen a la meitat del primer intró i amb final a l'exó 2. Aquest pèptid no s'ha referenciat mai a la literatura de manera que desconeixem si realment es produeix i quina podria ser la seva funció. Si es té en compte el pèptid que s'origina a partir del primer codó (Metionina) que origina l'ARN missatger de GH1, dona lloc a un pèptid de només 7 aminoàcids, ja que es troba un codó d'stop dins l'intró 1. Com ja s'ha comentat, aquest fet no es troba referenciat a la literatura, així que no es pot concloure si realment aquests pèptids existeixen en l'home o no.

La maquinària transcripcional que regula la transcripció del gen GH1 en teixits diferents a les cèl·lules de la glàndula pituitària no ha estat descrita i, per tant, l'estudi de l'ARNm provinent de leucòcits extrets a partir de sang fresca no és útil si es vol fer un *screening* mutacional del gen GH1 perquè ja ha quedat prou demostrat en els últims temps que el model cel·lular triat és crucial per a obtenir uns resultats comparables amb el que succeeix *in vivo*.

En canvi, l'estudi de l'expressió de GH en leucòcits de sang perifèrica ha estat útil durant anys per estudiar com afecten les mutacions que provoquen la pèrdua de l'exó 3 en l'ARN missatger de GH1.

Ryther *et al.*, l'any 2004 van localitzar i definir els elements *cis* que regulen la inclusió de l'exó 3 en el procés d'*splicing* de l'ARN missatger de GH1. Van determinar que hi ha un nou *enhancer splicing* anomenat ESE2 que es troba a l'exó 2, que el tamany de l'intró 3 és crucial per a la inclusió de l'exó 3 i que el lloc ja descrit ESE1 inclou els primers set nucleòtids de l'exó 3.

Les mutacions que es troben situades en el lloc d'*splicing* de l'exó 3 provoquen que el trànscrip que en resulta codifiqui per una proteïna de 17,5 kDa on s'han perdut els aminoàcids 32-71. A aquesta proteïna li manca el *loop* que connecta la primera i

la segona hèlix- α de la proteïna, el que fa que la proteïna es plegui incorrectament (Cogan *et al.*, 1994; Cogan *et al.*, 1995). Aquesta proteïna gairebé no és capaç d'activar el receptor de GH, i a més a més fa que la proteïna normal de 22 kDa que es podria produir a partir de l'altre al·lel no es produeixi ni s'emmagatzemi (McGuinness *et al.*, 2003; Salemi *et al.*, 2006). La pèrdua de l'exó 3 fa que un residu de cisteïna quedi desaparellat, la qual cosa suposadament fa que el grup sulfhidril lliure formi enllaços disulfid intermoleculars que són aberrants, i això fa que s'interrompi l'emmagatzemament i la secreció de la proteïna de 22 kDa (Binder *et al.*, 1996).

Tot i que aquesta ha estat una explicació acceptada, s'ha demostrat que un pacient que portava una mutació que li provocava un canvi d'aminoàcid en heterozigosi (Arg77Cys), no patia una inhibició de la secreció de la GH-WT (Takahashy *et al.*, 1996), amb la qual cosa, la teoria que la cisteïna desaparellada produïa un efecte dominant no es confirma. A més a més, el treball realitzat per Iliev *et al.*, l'any 2005 confirma el fet que el trencament d'un pont disulfur no és suficient per explicar l'efecte dominant negatiu observat, perquè aquest grup cotransfecta cèl·lules GH₄C₁ (cèl·lules neuroendocrines de rata) amb plàsmids que expressen GH-WT i GH amb mutacions puntuals als aminoàcids Cys53Ala i Cys165Ala (aminoàcids que formen el pont disulfur que té a veure amb la deleció de l'exó 3) i els resultats que observen són que l'expressió de les dues proteïnes està molt poc reduïda. A més a més, les proteïnes amb una sola Cys mutada (Cys53Ala o Cys165Ala) tenen un comportament molt similar a com ho fa la proteïna amb els dos canvis alhora. Aquests autors no troben un efecte tòxic de la proteïna GHdel32-71, així com sí que ho feien McGuinness *et al.*, i això ho expliquen perquè McGuinness *et al.*, feien servir cèl·lules de rata GC, i en canvi Iliev *et al.*, fan servir cèl·lules GH₄C₁. Així doncs, l'efecte dominant negatiu exercit per la proteïna amb la deleció de 40 aminoàcids l'atribueixen a que possiblement aquesta deleció destorbi varies funcions biològiques de les cèl·lules sense afectar la seva viabilitat i el grau de proliferació. El que sí que provoca és un estrès a les cèl·lules que resulta en la degradació de proteïnes degut a l'activació de la resposta a les proteïnes no plegades (Cunningham *et al.*, 1991b). Així doncs, donen més importància al fet d'haver una deleció que al fet que es trenqui el pont disulfur entre la Cys53 i la Cys165.

També s'ha trobat que, en ratolins transgènics, la sobreexpressió de la variant de 17,5 kDa a la glàndula pituïtària destrueix les cèl·lules somatotropes i causa hipoplàsia de la glàndula pituïtària (McGuinness *et al.*, 2003). Aquest efecte, però,

no s'ha comprovat en humans (com ho demostra la mare del Pacient 5 afecta de la mutació en el lloc d'*splicing* a l'intró 3). També cal remarcar que l'efecte dominant que exerceix la variant de 17,5 kDa sobre la variant normal només s'ha trobat en cèl·lules secretores i no en altres tipus de cèl·lules, ja que en limfoblasts de pacients transformats amb el virus d'Epstein-Barr que porten mutacions en heterozigosi en el lloc d'*splicing* de l'intró 3 s'ha trobat que expressen els dos al·lels en quantitats similars (Binder *et al.*, 1996).

Binder *et al.*, l'any 1996 suggereixen que l'efecte dominant en la secreció de GH produïda per la proteïna mutant del32-71 té lloc en la glàndula pituïtària però no en limfoblasts, i ho expliquen de la següent manera: el catió Zn^{2+} és present en baixes concentracions als leucòcits (Iyengar *et al.*, 1978), però en canvi es trobaven altes concentracions en els grànuls secretors de la glàndula pituïtària (Thorlacius-Ussing, 1987). Com que el Zn indueix la dimerització de hGH *in vitro* (Cunningham *et al.*, 1991b), i se suposa que el dímer de hGH és la forma d'emmagatzematge de la hGH, sembla ser que la combinació d'elevades concentracions de GH i la presència de zinc bloqueja la secreció de GH en pacients amb IGHDII. Això també recolza la teoria que no és útil el model de leucòcits humans per l'estudi de l'expressió d'ARN missatger de GH ja que en no haver la mateixa concentració de zinc en els leucòcits, no es pot estudiar els efectes d'aquestes mutacions en aquestes cèl·lules. Iliev *et al.*, també recolzen la teoria que el Zn^{2+} influeix en el fet que la deleció dels aminoàcids 32-71 tingui un efecte dominant negatiu, i ho atribueix a que en canviar l'estructura terciària de la proteïna, l'enllaç amb el Zn^{2+} es veu afectat, i com a conseqüència s'agreguen les proteïnes GH.

En el nostre cas, l'estudi de l'expressió de GH en leucòcits de sang perifèrica ens ha servit per comprovar que en un pacient amb la mutació a l'intró 3 predictora d'afectació de l'*splicing* en el transcrit d'ARN corresponent presenta la deleció de l'exó 3. També hem comprovat que en el cas del Pacient 1 de la Família 1 amb la mutació que provoca el canvi d'aminoàcid Phe25Tyr i que també porta un canvi a nivell de l'intró 4 del mateix al·lel, aquest no afecta l'*splicing* i, per tant, aquest canvi no contribueix en el fenotip dels pacients.

En resum, l'estudi de l'expressió de GH en leucòcits de sang perifèrica ens ha demostrat que el patró d'expressió és variable en els controls, tant en quant a detecció com en quant a variants transcripcionals detectades i que, a més, el transcrit predominant presenta un processament diferent al pituïtari. A pesar de concloure's que no és un model útil per a la recerca d'anomalies en poblacions

patològiques, ens ha permès confirmar o al revés, descartar, l'efecte de canvis en les regions d'*splicing* del gen.

3. ESTUDI TEÒRIC DELS CANVIS D'AMINOÀCID

Els canvis d'aminoàcids trobats a la població de pacients han estat estudiats teòricament mitjançant programes informàtics i basant-nos en els resultats obtinguts pels treballs realitzats per diferents autors (Wells 1996; Cunningham i Wells 1989; de Vos *et al.*, 1992). Aquests autors expressaren *in vitro* la proteïna GH així com el seu receptor. Un cop és cristal·litzat el complex, es determina l'estructura mitjançant un mapa de densitat electrònica. Mitjançant aquesta tècnica no s'aconsegueix resoldre el receptor de GH completament i hi ha algunes regions que no són visibles (de Vos *et al.*, 1992). Aquestes regions inclouen els aminoàcids que corresponen a l'exó 3 de la seqüència de nucleòtids. Així doncs, totes les estructures fins avui resoltes no inclouen la porció extracel·lular que correspon a la traducció de l'exó 3 a aminoàcids i, per tant, no distingeixen la forma *full length* de la *del 3* de GHR. D'aquesta manera no es pot estudiar teòricament l'efecte que podria donar-se del fet que el receptor de GH mantingués els 22 aminoàcids que provenen de la traducció de l'exó 3, o al revés, l'efecte provinent de la deleció d'aquests 22 aminoàcids que es troben a la porció extracel·lular de la proteïna, però que no afecten directament a la unió de la proteïna GH amb el receptor.

Estudi del canvi GH-Phe25Tyr

El canvi introduït en aquesta proteïna introdueix una Tirosina en lloc d'una Fenilalanina. La diferència entre aquests dos aminoàcids és que a la Tirosina hi ha un grup hidroxil en posició *para* del grup fenil i, en canvi, a la Fenilalanina només s'hi troba el grup fenil.

La introducció d'aquest grup hidroxil en posició *para* no introdueix més impediment estèric a la proteïna. Sí que introdueix un element polar, i provoca que es canviï d'un aminoàcid aromàtic hidrofòbic (neutre, no polar) a un aminoàcid aromàtic (neutre, polar).

Aquest aminoàcid no es troba implicat en la unió al receptor de GH pel lloc 1 ni pel lloc 2. Això no significa que la substitució de l'aminoàcid Phe per Tyr no comporti un canvi en l'estructura de la proteïna que faci que aquesta tingui una afinitat diferent pel seu receptor. El model estructural definit per Cunningham *et al.*, 1991a demostra que el residu Fenilalanina es troba molt a prop espacialment amb els residus Ser219 i Arg218. Quan en lloc d'haver una Phe hi ha una Tyr, en afegir el grup hidroxil en posició *para* del grup fenil, s'introdueix un element polar que podria

formar pont d'hidrogen amb el nitrogen del grup amida de l'aminoàcid Arg218 de GHR, i desestructurar una interacció que es produeix entre la Gly174 amb GHR, que podria desaparèixer en haver la interacció entre la Tyr en la posició 25 de GH amb l'Asn218.

Aquesta podria ser la hipòtesi que explicaria una disminució tant en la immunoreactivitat com en la bioactivitat de la proteïna Phe25Tyr demostrada per l'immunoassaig i per la disminució en l'expressió d'IGF1 respecte al tractament amb GH WT. Possiblement aquest canvi faci que la molècula de GH no es pugui unir a la segona molècula de GHR correctament i això no permet que la transmissió del senyal es dugui a terme de forma correcta.

El canvi Phe → Tyr ha estat estudiat per Correia *et al.*, l'any 2004. La substitució Phe88Tyr en el citocrom c_3 de *Desulfomicrobium Sp.*, fa que la reducció del citocrom resulti més difícil degut a que la Tyr estabilitza millor la càrrega pel grup hidroxil del grup hemo.

Estudi del canvi Val 173 Leu

Aquest canvi proporciona un canvi de l'aminoàcid Valina per l'aminoàcid Leucina. Els dos aminoàcids són hidrofòbics i, per tant, neutres, no polars. L'aminoàcid Leucina, en tenir un carboni més en la seva estructura, el que podria fer és introduir més impediment estèric a l'estructura.

De fet aquesta posició ha estat estudiada per Cunningham *et al.*, l'any 1989, ja que aquest treball estudià la proteïna GH mitjançant la tècnica d'*Alanine-Scanning mutagenesis*. Provaren de mutar la posició Val173 a Ala173 per veure com afectava aquest canvi. El problema va ésser que la proteïna mutant no es secretava a una concentració suficient per ser aïllada i analitzada. Aquest fet concorda amb el que nosaltres hem experimentat al nostre laboratori, ja que l'expressió d'aquesta proteïna recombinant sempre ha estat inferior a l'expressió de la proteïna WT i la proteïna mutant F25Y. Aquests autors emeteren la següent hipòtesi: en ser aquest aminoàcid important per estabilitzar el *core* de la proteïna, mutacions en aquests aminoàcids desestabilitzen la proteïna. Exemples d'altres aminoàcids que també mostren el mateix efecte van ser la Met170, i la Leu177. En canvi, altres aminoàcids que també formen el *core* de la proteïna i es troben a la cara hidrofòbica de les hèlixs com Leu6, Leu9, Phe10 (hèlix 1) o Phe176 i Val180 (hèlix 4) no mostren el mateix problema quan es muten a Alanina. Per tant aquest no és un fenomen que es pugui generalitzar, tot i que en el cas estudiat per nosaltres sí que concordi amb el fet que la variant V173L presenta una disminució de la

immunoactivitat, així com de la bioactivitat demostrada per una estimulació disminuïda de l'expressió del gen IGF1.

A més a més, aquest aminoàcid es troba a prop del lloc 1 d'unió al receptor de GH i, com s'ha comentat anteriorment, aminoàcids com la Lys172 o Thr175, que es troben molt a prop de Val173, són crucials per a la unió amb el receptor.

Tokumitsu *et al.*, l'any 2003 varen fer un estudi sobre la proteïna CaM-KK β (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase) i demostraren que la variant Val269Leu de l'enzim tenia una menor sensibilitat en front de l'inhibidor STO-609. Demostraren que la substitució de l'aminoàcid Val per aminoàcids hidrofòbics i més voluminosos com Leu, Met, His i Phe disminuïen la sensibilitat a l'inhibidor STO-609. Aquest fet mostra que el canvi de Val \rightarrow Leu provoca un canvi en l'activitat d'una proteïna i concorda amb els nostres estudis, on la variant V173L té una bioactivitat inferior a la proteïna GH-WT.

4. ESTUDIS IN VITRO AMB GHs RECOMBINANTS

4.1 Obtenció de GH recombinant

Per tal de realitzar els experiments amb les proteïnes recombinants es va haver de posar a punt la tecnologia d'expressió *in vitro* de proteïnes. Aquest procediment es va dur a terme mitjançant la utilització d'un plàsmid anomenat pQE-30UA adaptat per a poder insertar productes de PCR, ja que nosaltres havíem de clonar el resultat d'un producte de PCR específic que resultava de l'amplificació de la porció de l'ADNc de GH1 que es traduïa a proteïna madura. Altres autors han fet servir aquest sistema per clonar l'hormona de creixement, com Venugopal *et al.*, 2002. Un cop es va tenir l'insert dins el plàsmid, i prèvia mutagènesi necessària per introduir els canvis desitjats en la seqüència de l'ADNc, es va dur a terme l'expressió de la proteïna en les cèl·lules d'*E.coli* M15 [prep 4]. Es va purificar la proteïna i es va quantificar tant la concentració de proteïna total, com la immunogenicitat de la proteïna. Com ja s'ha comentat anteriorment les proteïnes recombinants mutants s'expressaven en menor quantitat que la GH-WT mantenint les mateixes condicions d'expressió. El fet que la variant V173L s'expressi en menor quantitat concorda amb els experiments de Cunningham *et al.* 1989, on posaren a punt la tècnica d'*Alanine-Scanning mutagenesis* tal com ja s'ha comentat. En mutar la Valina173 per Alanina trobaren que no obtingueren quantitat suficient de proteïna com per poder realitzar els seus experiments. Aquest fet el relacionaren amb que la Valina173 es troba al *core* de la proteïna, i el canvi a Alanina desestabilitzaria la

GH. Així doncs podem afirmar que el fet de mutar a Leucina provoca un efecte similar en la proteïna.

4.2 Immunoreactivitat de les GHs recombinants

El mètode de quantificació utilitzat va ser un mètode immunològic enzimològic no competitiu de doble anticòs. Com ja s'ha comentat a Resultats, les proteïnes recombinants mutants sempre van ser menys immunogèniques que la WT, fet que podria ser degut a la mutació que duen a la seva seqüència d'aminoàcids. En concret la F25Y era un 31% menys immunogènica i la V173L era un 85% menys immunogènica.

4.3 Efectes sobre la proliferació cel·lular

Per descartar que les proteïnes recombinants produïdes al laboratori tinguessin algun efecte tòxic sobre les cèl·lules a estudiar, es varen fer experiments d'incorporació de timidina-³H a l'ADN dels condrocits en cultiu. Els resultats demostren que les preparacions no són tòxiques, ja que els resultats obtinguts mostren valors similars als obtinguts amb proteïna GH comercial. El resultat que es desprèn dels experiments realitzats és que la Vitamina D produeix una inhibició de la proliferació tant sola com en combinació amb la GH. Aquests resultats concorden amb el treball descrit per Boyan *et al.*, 2002, on descriuen l'acció del metabòlit actiu de la Vitamina D (1,25-(OH)₂D₃) com un agent que causa una disminució de la proliferació de la zona de reserva i de la zona de creixement de les cèl·lules del cartílag de creixement.

En el sistema de condrocits epifiseals fetals emprats per nosaltres, les diferents GH biosintètiques soles no produeixen cap efecte significatiu sobre la proliferació cel·lular.

4.4 Bioassajos en models cel·lulars

4.4.1 Bioassajos en la línia cel·lular preestablerta HEPG2

Una part d'aquest treball ha estat l'estudi de l'expressió d'IGF1 en resposta a GH en cèl·lules HepG2 (línia preestablerta de carcinoma hepatocel·lular humà). Bichell *et al.*, l'any 1992 ja van determinar que el fetge humà produïa IGF1 en resposta a GH, causant una acumulació d'ARN missatger i de proteïna IGF1. Es va triar una línia preestablerta (HepG2) per fer aquest estudi, ja que també s'havia utilitzat en un treball recent (Wang *et al.*, 2005), on es transfectaven aquestes cèl·lules amb un plàsmid que expressava STAT5B i es mesurava l'expressió d'ARN missatger d'IGF1 mitjançant PCR a temps real.

Els nostres resultats mostren que l'expressió d'IGF1 no és regulable per GH en el cultiu d'aquesta línia cel·lular en el nostre laboratori. Aquest fet pot ser degut a que les cèl·lules d'aquesta línia ja estiguin adaptades al medi i que no responguin en front el senyal de GH.

4.4.2 Bioassajos en la línia cel·lular preestablerta C-28/I2

La GH i l'IGF1 regulen el creixement longitudinal de l'esquelet, i la GH regula la producció d'IGF1 tant en fetge com en les cèl·lules de nombrosos teixits. Els estudis realitzats per Le Roith *et al.*, indiquen que la GH regula la producció local d'IGF1 en determinades cèl·lules implicades en el creixement ossi. Tot i que molts efectes sobre el creixement ossi són mediat per IGF1, dades experimentals indiquen que la GH pot influir directament sobre la funció cel·lular del cartílag de creixement (Ohlsson *et al.*, 1998).

Aquest fet ens va portar a utilitzar una línia condrocítica humana per estudiar la regulació de l'IGF1 a través de la GH (i amb això estudiar les proteïnes recombinants del nostre laboratori). Els condrocits articulars primaris d'humans adults són difícils d'obtenir, tant per motius ètics i pràctics com perquè moltes vegades no s'aïlla suficient número de cèl·lules per fer els experiments, i a més a més, aquest tipus de cèl·lules varien segons les condicions d'edat dels pacients i, per tant, els experiments poden ser molt variables segons els condrocits que s'utilitzin (Finger *et al.*, 2003). Així doncs, la línia cel·lular C-28/I2 es va immortalitzar a partir de la transfecció del retrovirus SV40 en condrocits primaris aïllats del cartílag costal d'una jove de 15 anys (Goldring *et al.*, 1994). Aquesta línia cel·lular retenia la morfologia de les cèl·lules condrocítiques i mantenia una proliferació contínua en cultiu en monocapa.

Vam mesurar l'expressió dels gens del sistema GH-IGF mitjançant PCR semiquantitativa, i si bé vam detectar sense dificultat els transcrits corresponents als gens GHR, IGF1R, STAT5B, IGF1A i IGF1B, l'expressió de IGF1 no va ser regulable mitjançant la GH en les condicions estudiades al nostre laboratori.

4.4.3 Bioassajos en condrocits del cartílag epifisari de fetus humans i altres models cel·lulars descrits a la literatura

El cartílag de creixement epifisial fetal humà és un model d'estudi *in vitro* establert al nostre laboratori per Carrascosa *et al.*, 1985; Carrascosa *et al.*, 1986 i utilitzat pel nostre grup de treball per la descripció de la regulació de la proliferació i de l'expressió gènica per hormones i factors de creixement (Audí *et al.*, 1984; Carrascosa *et al.*, 1990; Carrascosa *et al.*, 1992; Ferrández *et al.*, 1992;

Carrascosa *et al.*, 1993; García-Ramírez *et al.*, 1998; García-Ramírez *et al.*, 2000a; García-Ramírez *et al.*, 1999; García-Ramírez *et al.*, 2000b).

Altres autors han estudiat la bioactivitat de proteïnes mutants de GH amb altres models cel·lulars. Per exemple, Lewis *et al.*, l'any 2004, van estudiar la bioactivitat de la proteïna mutant Ile179Met mitjançant estudis de secreció de la proteïna, transfectant cèl·lules pituïtàries de rata (GC) amb un plàsmid que contenia el gen GH1-WT o el gen que contenia la mutació abans comentada. Utilitzaren la tecnologia descrita per Millar *et al.*, 2003. Les dues proteïnes es secretaven d'una manera semblant, sense haver diferències entre la proteïna mutant i la WT. També van fer un estudi de l'expressió de STAT5 en cèl·lules HK293 (cèl·lules embrionàries de ronyó). Van transfectar aquestes cèl·lules amb el constructe que conté el gen d'expressió per a la luciferasa, l'expressió del qual està regulada per STAT5, ja que conté una zona d'unió a STAT5 (Ross *et al.*, 1997). Van tractar amb la GH-WT i la GH mutant durant 6 hores i els resultats van ser que la GH mutant Ile179Met activava de la mateixa manera la via JAK/STAT que la GH-WT. En canvi, la via ERK era activada d'una manera molt inferior a com ho feia la GH-WT. Per estudiar aquesta via es van fer servir cèl·lules estimulades preadipocítiques murines 373-F442A. Es van tractar amb GH i es va detectar la presència de ERK1 i 2 mitjançant Western-Blot. Els nivells d'expressió d'ERK sí que es van veure disminuïts a la meitat respecte a l'activació produïda per la GH-WT.

Uns altres autors que han fet estudis de bioactivitat de proteïnes mutants de GH són Millar *et al.*, 2003, que van fer un estudi molt ampli on van utilitzar la mateixa metodologia per estudiar l'activació de la via STAT5 per diferents canvis en 13 variants de la proteïna GH-WT: T27I, K41R, N47D, S71F, S108R i T175A que reduïen significativament la possibilitat d'activar la via JAK/STAT, mentre que T24A, D11N, R16C, E74K, Q91L, S108C i V110I tenien una activitat funcional molt semblant a la GH-WT. Aquests autors explicaren que possiblement aquestes últimes proteïnes tinguin una activitat sobre altres vies de l'eix de la GH, o bé siguin unes variants neutres, o bé que aquest sistema no sigui l'adequat per estudiar-les degut a que és un sistema *in vitro* estàtic. Aquests autors també varen estudiar la secreció de la proteïna GH en cèl·lules de glàndula pituïtària de rata (GC): utilitzant el promotor de l'haplotip 1 (haplotip més comú descrit en la població per Horan *et al.*) i per descriure la secreció normal, compararen aquesta secreció amb la de les proteïnes mutants que es combinen amb el promotor que tenia l'individu portador d'aquesta variant de GH. Així doncs, la secreció disminuïda de la proteïna podia ser degut al canvi en la seqüència de la proteïna o bé degut al promotor que contenia,

ja que com s'ha explicat anteriorment, Horan *et al.*, estudiaren els promotors d'una població control i demostraren que no tots els promotors expressen la proteïna GH de la mateixa manera.

Com es pot veure, els models cel·lulars utilitzats per estudiar la bioactivitat de les proteïnes amb canvi d'aminoàcid de diferents autors han estat variats. Nosaltres hem intentat buscar un model cel·lular que fos el més semblant possible al que succeeix *in vivo* i així vàrem finalment escollir els condrocits de cartílag epifisial.

Vitamina D

En planificar els experiments per estudiar com afectaven els canvis d'aminoàcid en l'expressió dels gens GHR, IGF1R, STAT5B i IGF1, es va decidir estudiar l'efecte de les proteïnes GH mutants, de la GH WT recombinant i de la GH comercial de manera individual. També es va decidir estudiar l'efecte de les proteïnes abans comentades en combinació amb Vitamina D 10^{-7} M perquè al nostre laboratori hi havia l'experiència de diversos treballs anteriors on es veia que la GH en combinació amb la Vitamina D amplificava els efectes de la GH aplicada de manera individual.

El metabòlit $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamina D₃ ($1,25$ -(OH)₂D₃) és el producte més actiu que es deriva de la Vitamina D₃. Els efectes de $1,25$ -(OH)₂D₃ depenen de la interacció d'aquest amb el seu receptor citosòlic/nuclear, el receptor de Vitamina D (VDR). Seguidament, el receptor ha d'interaccionar amb regions selectives dels promotors dels gens que seran activats o inhibits (Zhang *et al.*, 1997).

Morales *et al.*, l'any 2002 estudiaren en una línia d'osteosarcoma anomenada UMR 106 com influenciava la $1,25$ -(OH)₂D₃ en l'acció de la GH sobre la via JAK/STAT. El resultat que obtingueren és que el pretractament de les cèl·lules amb $1,25$ -(OH)₂D₃ era necessari per a detectar la inducció produïda per GH en el gen STAT5. A més a més, el pretractament amb $1,25$ -(OH)₂D₃ facilitava a les cèl·lules la resposta a la estimulació repetitiva amb GH. Aquests resultats concorden amb els nostres, ja que es veu un augment de l'expressió d'IGF1 quan es combina la Vitamina D amb la GH.

Estudi dels elements de resposta de les regions promotores

Es van estudiar les regions promotores dels gens STAT5B, IGF1, IGF1R i GHR amb el programa informàtic *MatInspector Release professional 7.4.1 Dec 2005 de Genomatix*. Aquesta eina informàtica ens ha ajudat a estudiar una mica més la via d'acció de la GH.

Com era d'esperar pels treballs publicats a la literatura, el promotor del gen IGF1 té elements de resposta a STAT5. Aquest fet ja ha estat provat experimentalment per Chia *et al*, que troben el lloc d'unió de STAT5B al gen IGF1. Segons el programa informàtic, l'IGF1 també té un lloc d'unió al receptor de Vitamina D, fet que no ha estat provat experimentalment, però que concorda amb els nostres resultats, ja que hem vist una regulació del gen IGF1 per Vitamina D. La GH amplifica els efectes produïts pel tractament amb Vitamina D de forma individual.

Segons els resultats obtinguts amb aquest programa informàtic, el promotor del gen IGF1R també conté un lloc d'unió a VDR, la qual cosa també concorda amb els resultats obtinguts per nosaltres, perquè hi ha una resposta del gen IGF1R en front el tractament amb Vitamina D sense GH de 1,3 vegades més gran el tractament control.

El gen STAT5 no té elements de resposta a STAT5 ni VDR, la qual cosa podria concordar amb els nostres resultats, ja que la resposta de STAT5 a Vitamina D sí que és una mica superior al tractament control, però en cap cas és significatiu. Finalment, el programa informàtic troba elements d'unió a STAT5 i VDR en el gen GHR. Un altre cop els resultats en quant a VDR concorden amb els nostres resultats, ja que el tractament amb Vitamina D de manera individual augmenta l'expressió del gen GHR. Segons aquest programa informàtic, l'expressió del gen GHR estaria modulada per STAT5, per tant, la GH o la Vitamina D afegida als tractaments, a través de l'augment de l'STAT5 que s'aniria expressant, regularia l'expressió de GHR.

Aquest programa informàtic ens ha ajudat a entendre millor els resultats obtinguts experimentalment encara que es tracta d'una eina informàtica que es basa en uns càlculs teòrics.

Anàlisi semiquantitatiu vs PCR a temps real

La PCR a temps real té molts avantatges en front la PCR convencional i la posterior quantificació per tècniques d'imatge. La PCR a temps real mesura la quantitat d'ADNc a la fase exponencial de la reacció de PCR, mentre que la PCR tradicional mesura la quantitat d'ADNc al final de la reacció (*plateau*). A més a més, un increment en la fluorescència del reporter significa un increment proporcional del nombre d'amplicons generats. També necessita 1000 vegades menys quantitat d'ARN que la PCR convencional i no necessita un processament post-PCR (electroforesi i anàlisi d'imatge).

Tot i que en la tècnica de quantificació mitjançant la reacció de PCR i posterior anàlisi de les bandes per densitometria vam tenir resultats (expressió dels diferents gens en cada una de les condicions estudiades), es va comprovar que la tècnica era

menys sensible que la PCR a temps real. Es va posar a punt la tècnica però les diferències d'expressió entre un tractament i un altre no s'apreciaven en un grau suficient degut a que la sensibilitat no era prou elevada.

Amb les PCR a temps real no vàrem detectar estimulació en l'expressió del gen IGF1 pels models cel·lulars HepG2 i C-28/I2. Es va optar per utilitzar cartílag de fetus humans, en els que el nostre laboratori havia demostrat que sí que s'expressava el gen d'interès. En utilitzar la PCR a temps real en el model de condrocits epifiseals humans, sí que es van veure els canvis en l'expressió gènica segons el tractament.

Acció produïda per la proteïna GH-Phe25Tyr

Els resultats obtinguts mitjançant la PCR a temps real mostren que la proteïna que conté el canvi F25Y, en combinació amb l'addició al medi de Vitamina D a una concentració de 10^{-7} M, provoca:

- 1) Una estimulació significativament inferior en l'expressió d'IGF1 respecte a la GH-WT i de fet idèntica a l'observada amb Vitamina D sola i, per tant, es pot considerar nula.
- 2) Una expressió del gen STA5B variable.
- 3) Alhora, s'observa un augment de l'expressió dels gens GHR i IGF1R (tot i que els resultats no són significatius respecte a l'efecte de la GH-WT).

Aquests resultats es podrien explicar de la següent manera: la proteïna GH amb el canvi F25Y provoca un augment superior en l'expressió dels receptors de GH i d'IGF1, com a resposta a la baixa estimulació de l'expressió d'IGF1. En STAT5B no es veu una resposta clara a GH, i es podria explicar perquè tot i que se sap que és un transductor del senyal, també és modulats per altres proteïnes, i podria ser aquesta la causa de la poca resposta al tractament amb GH. Per altra banda, en el nostre protocol d'incubació només hem utilitzat un sol temps d'incubació (48 hores) i podria ser que la regulació de l'expressió de STAT5B fos millor detectada a temps inferiors (Woelfle *et al.*, 2003).

Acció produïda per la proteïna GH-Val173Leu

El tractament amb aquesta proteïna mutant produeix els mateixos efectes que la F25Y, però d'una manera més accentuada.

En combinació amb Vitamina D, l'expressió de GHR està més augmentada que el tractament de Vitamina D + F25Y, el mateix passa en l'expressió d'IGF1R i, en canvi, l'expressió d'IGF1 és semblant a l'expressió amb el tractament amb F25Y, és a dir, disminuïda respecte a l'efecte de la GH-WT i similar a la de Vitamina D sola i, per tant, nula.

Influència del polimorfisme d3/fl-GHR

Existeixen dues isoformes de GHR que difereixen en la presència o absència d'una seqüència que codifica per l'exó 3. Aquestes s'expressen a la placenta i en un principi semblava que era degut a un processament alternatiu del gen. Més concretament, s'expressaven tres patrons d'expressió: un que contenia la isoforma *full length* fl-GHR, l'altre la que només expressava la forma *d3 deleted* d3-GHR (amb pèrdua de l'exó 3), i l'altre que combinava en proporció 1:1 les dues isoformes.

Stallings-Mann *et al.*, l'any 1996 van suggerir que les isoformes de GHR representen diferents al·lels del mateix gen.

Aquest polimorfisme, que consisteix en la deleció/inclusió de l'exó 3 del gen GHR, ha estat descrit per Pantel *et al.*, 2000 com a un polimorfisme a nivell de l'ADN, com ja s'ha comentat a l'introducció, i no s'ha format per un processament alternatiu com es podria pensar.

L'estudi de la bioactivitat de les proteïnes recombinants mutants s'ha realitzat utilitzant 5 fetus diferents, la qual cosa pot introduir variabilitat en els resultats, sobretot si es té en compte alguns estudis que demostren que el polimorfisme en el gen GHR anomenat d3-GHR respon millor a l'acció de la GH que el polimorfisme fl-GHR (Dos Santos *et al.* 2004; Jorge AA *et al.*, 2006, Binder *et al.*, 2006), ja que els 5 fetus estudiats tenen diferents patrons d'aquest polimorfisme, i aleshores podria ser que uns responguessin millor a l'acció de la GH que altres.

L'únic treball *in vitro* publicat ha estat el de Dos Santos *et al.*, que van estudiar la línia cel·lular de fibroblastes HEK293, on van trobar que d3-GHR responia millor davant GH en el rang de concentracions de 0 a 50 ng/ml. Fins el moment no hi ha més estudis amb models cel·lulars on es mostrin resultats d'aquest tipus.

Últimament l'estudi d'aquest polimorfisme del gen GHR ha estat d'interès per varis autors, ja que s'ha estudiat en relació al diferent grau de resposta dels pacients amb diverses formes de retard de creixement davant l'administració exògena de GH. Així com Dos Santos *et al.*, 2004 i Binder *et al.*, l'any 2006 varen trobar diferències en nens SGA tractats amb GH a dosis de 33 µg/kg/dia, al nostre grup de treball s'ha fet un estudi amb nens SGA tractats amb GH a 66 µg/kg/dia (Carrascosa *et al.*, 2006), i no s'han trobat diferències significatives entre els diferents genotips del polimorfisme de GHR.

Recentment, Blum *et al.*, l'any 2006 també han fet un estudi amb nens amb IGHD amb dosis de reemplaçament (28,6 µg/kg/dia), i determinen que l'al·lel d3-GHR no afecta a la resposta del tractament amb GH. Aquests autors emeten la hipòtesi que el polimorfisme d3-GHR només influiria en la resposta a GH en dosis

suprafisiològiques [el contrari de l'hipòtesi emesa per nosaltres (Carrascosa *et al.*, 2006)].

En un altre treball realitzat pel nostre grup (Audí *et al.*, 2006) s'han trobat diferències significatives entre la població adulta normal i la població de nens SGA, essent el polimorfisme fl/fl-GHR el doble de freqüent en la població de nens SGA que en la població control. Aquest resultat suggereix que el polimorfisme d3/fl-GHR s'hauria de considerar com un dels factors que contribueix a l'expressió fenotípica del creixement.

En el nostre cas, les cèl·lules són condrocítiques i fins ara no s'havia estudiat com variava la resposta a GH en aquest tipus cel·lular en funció dels genotips de GHR. La dosi que hem utilitzat és de 500 ng/ml, deu vegades superior a la utilitzada per Dos Santos *et al.*, amb les cèl·lules HEK293 (de 0 a 50 ng/ml). Com que en el nostre treball hi ha cinc fetus estudiats i, com ja s'ha comentat anteriorment, hi ha els 3 genotips possibles dins els cinc casos estudiats, aquest fet ens impedeix fer una estadística per estudiar com responen les cèl·lules davant el tractament amb la GH-WT i les GHs recombinants en funció dels genotips.

L'obtenció de resultats en un nombre superior de fetus ens permetrà en un futur realitzar un anàlisi estadístic adequat.

5. ESTUDI DE LES FAMÍLIES AMB GH MUTANTS: ASSOCIACIONS GENOTIP-FENOTIP

El creixement esquelètic és el resultat de l'expressió fenotípica d'una potencialitat genètica regulada per múltiples factors, entre els quals destaquen els nutricionals, els homeostàtics i diverses hormones i factors de creixement. Vam seleccionar per aquest estudi dos grups de pacients, un amb diagnòstic de retard de creixement i bona resposta al tractament substitutiu amb GH recombinant i l'altre amb RIUC, talla baixa i sense deficiència de secreció de GH.

La funcionalitat del gen GH1 és el resultat d'una expressió en quantitat i qualitat adequades, si la seqüència de la regió promotora manté la integritat dels elements de resposta, i si la seqüència de la proteïna resultant pot establir de forma òptima les seves relacions amb la GHBP i el GHR.

El treball realitzat per Horan *et al.*, va estudiar 16 polimorfismes de la regió promotora del gen GH1, els quals donen lloc a 40 haplotips diferents. Dotze

d'aquests haplotips estan associats amb una reducció significativa de l'activitat transcripcional del gen en comparació amb l'haplotip número 1, que és el més freqüent de la població estudiada per Horan *et al.* i per nosaltres (Esteban *et al.*, 2006) i hi ha 10 haplotips que estan associats amb una expressió significativament més elevada.

Mutació Phe25Tyr

La mutació Phe25Tyr ha estat detectada en dues famílies.

En el cas de la **Família 1**, vam detectar en el gen GH1 un canvi en l'aminoàcid 25 que es produïa en heterozigosi. L'al·lel mutat era d'origen patern (al·lel M1). El pare d'aquest nen té una estatura normal, pel que semblaria que no existiria una relació causa-efecte només per la presència d'aquest canvi d'aminoàcid. Ara bé, l'al·lel patern no transmès al pacient conté un promotor que correspon a l'haplotip número 8 segons la classificació de Horan *et al.*, que augmentaria un 33% l'expressió del gen respecte a l'haplotip número 1, que és el més freqüent. La resta de la seqüència nucleotídica d'aquest al·lel presenta un patró de polimorfismes normal, compatible amb la normalitat (Esteban *et al.*, 2006). Possiblement podria produir-se una sobreexpressió d'aquest al·lel que compensaria el dèficit de bioactivitat degut a l'altre al·lel mutant.

La mare d'aquest pacient porta un al·lel no descrit per Horan *et al.* (haplotip B) que és el que hereta el fill, i l'altre correspon a l'al·lel número 5 (haplotip D), que expressaria un 47% menys respecte l'haplotip número 1. L'al·lel que transmet al fill presenta el nucleòtid Guanina en el polimorfisme P6. Aquest polimorfisme afecta el lloc d'unió a Pit1; la presència de G en aquesta posició implica una menor afinitat per aquest factor de transcripció (Giordano *et al.*, 2006) i s'acompanya d'un fenotip de talla més baixa en la població control (Esteban *et al.*, 2006). Tot i amb això, aquest efecte estaria compensat en la mare degut a la presència en l'altre al·lel de GH1 del nucleòtid Guanina en el polimorfisme P25 (Esteban *et al.*, 2006), possiblement per acompanyar-se de la producció d'una forma més activa de l'hormona de creixement, tot i que la funcionalitat d'aquests polimorfismes està actualment en estudi al nostre laboratori.

El Pacient 1 d'aquesta família és doncs portador de l'al·lel patern amb la mutació Phe25Tyr, el promotor del qual no ha estat estudiat per Horan *et al.*, mentre que l'al·lel matern, del que tampoc se n'ha descrit l'activitat transcripcional del promotor, és portador del nucleòtid G en el polimorfisme P6, canvi que s'associa a talla més baixa en la població control (Esteban *et al.*, 2006).

La **Família 2** la componen dos germans, els dos afectes de retard de creixement (Pacient 2 i Pacient 3). Els dos germans tenen el mateix genotip i comparteixen els dos al·lels. L'al·lel no mutat (al·lel A), conté la seqüència promotora que correspon a l'haplotip 3 descrit per Horan *et al.* Aquest haplotip produiria una expressió un 68% inferior a la que correspondria a l'haplotip número 1, l'haplotip més freqüent de la població estudiada per Horan *et al.*, i que es correspon amb una activitat considerada normal. A més a més, la seqüència nucleotídica de l'al·lel mutat coincideix exactament amb la seqüència de l'al·lel mutat de la família 1 (haplotip M1). Per tant en aquests nens es pot pensar que a més de produir una proteïna anòmala, l'al·lel normal té una baixa activitat transcripcional i per tant una producció de GH disminuïda.

L'al·lel M1 que comparteixen les dues famílies conté, a més a més, un canvi puntual a l'intró 4. L'anàlisi de les seqüències d'*splicing* mitjançant el programa ESEfinder revela que, en produir-se aquesta deleció a l'intró 4, apareixeria un lloc d'unió per a una nova proteïna anomenada SRp40, i n'augmentaria l'afinitat d'una altra anomenada SF2/ASF.

Mitjançant l'amplificació dels trànscrips expressats en leucòcits de sang perifèrica, hem demostrat en el Pacient 1 que s'amplifica la variant 1 de GH amb el canvis trobats en heterozigosi al gen GH1. Tot i amb això, el canvi trobat a l'intró 4 no s'acompanya de l'aparició de noves variants.

La proteïna Phe25Tyr ha demostrat ser menys efectiva que la proteïna WT per a ser reconeguda *in vitro* per un immunoassaig així com en un bioassaig per induir l'expressió de IGF1. Per tant es pot pensar que la proteïna GH mutada circulant en sang del pacient és menys activa.

Els pacients 1, 2 i 3, portadors de la mutació Phe25Tyr, varen presentar respostes de la GH a les proves d'estimulació de secreció clarament deficitàries en el Pacient 1 i deficitàries o al límit del dèficit en els germans 2 i 3. De l'haplotip del promotor de l'al·lel mutat M1 d'aquests nens, no se n'ha estudiat l'activitat transcripcional. Tampoc en el cas de l'haplotip del promotor de l'al·lel normal del Pacient 1, tot i que és portador del nucleòtid G en el SNP P6 pel que hem demostrat una associació amb talla més baixa (Esteban *et al.*, 2006). En el cas dels dos germans, pacients 2 i 3, l'haplotip del promotor de l'al·lel normal correspon a un haplotip amb una activitat transcripcional reduïda segons Horan *et al.*, 2003.

Per tant, podem concloure que aquests nens no solament poden tenir una GH circulant en sang menys detectable per immunoassaig, sinó que alhora poden tenir

una secreció disminuïda de la proteïna normal degut a una baixa activitat transcripcional del promotor de l'al·lel normal. Això demostra la necessitat d'analitzar el genotip complet del gen GH1 i de separar-ne els al·lells quan s'estudiïn les associacions entre els genotips i els fenotips observats.

Aquest nens presentaven una velocitat de creixement (VC) espontània disminuïda en edats pre-puberals (de 3,6 a 4,8 cm/any). S'observa una bona resposta al tractament amb GH el primer any amb VC entre 7,6 i 8,6 cm/any. La VC disminueix el segon any de tractament, tot i ésser superior a la prèvia a l'inici del tractament i només torna a incrementar-se per sobre de la del primer any quan s'inicia la pubertat en el Pacient 1. Els pacients 2 i 3 encara no han iniciat la pubertat i cal esperar que amb tractament amb GH facin un brot de creixement puberal adequat.

Mutació Val173Leu

Pel que fa al **Pacient 4**, la seqüència nucleotídica del gen GH1 és homozigòtica, excepte pel nucleòtid 6633, canvi que produeix la mutació V173L. L'haplotip del promotor correspon amb el número 1 descrit per Horan *et al.*, és a dir, que aquesta persona hauria de tenir una talla normal, segons el treball realitzat per Horan *et al.*, excepte pel fet de portar la mutació Val173Leu.

No s'ha tingut accés a estudiar els pares.

Aquesta pacient amb l'antecedent de RIUC presentava un greu retard de creixement (talla -3,2 SDS) quan es va començar el tractament amb GH. S'havia descartat que tingués una deficiència de GH per una prova de secreció en la que es va mesurar una quantitat aparentment normal de GH. Tal com hem demostrat, és possible que part d'aquesta GH fos biològicament poc o gens activa, tot i que és de suposar que si l'al·lel normal s'expressés bé, li proporcionés una certa quantitat de GH normal.

Es trobava ja en un estadi molt avançat de la pubertat amb una maduració òssia de 12 anys i per això s'explica que hagués tingut prèviament una VC de 6,9 cm/any i uns nivells d'IGF1 en sèrum normals. És possible considerar que espontàniament hauria crescut encara menys i que l'addició de GH exògena hagi aconseguit que, en 2 anys de tractament, encara hagi crescut 8,8 cm que li permeten recuperar 0,6 SDS de talla i situar-se a -2,6 SDS quan presentava un estadi de pubertat IV, sense menarquia.

Aquest cas demostra l'oportunitat de realitzar estudis en la seqüència del gen GH1 en pacients amb retard de creixement important encara que les proves d'estimulació de secreció de GH aparentin ser normals per tal de diagnosticar els

possibles casos de GH bioinactiva. El tractament precoç d'aquests casos hauria de permetre millorar la talla final.

Canvi a l'intró 3. Mutació que provoca la deleció dels aminoàcids 32 a 71 en GH

Família 3. Pacient 5.

D'aquesta família s'ha analitzat el gen GH1 tant dels pares com del fill. Tant la mare com el fill són portadors de la mutació en heterozigosi a l'intró 3 5985 G>A. Aquesta mutació ja ha estat descrita per altres autors (Cogan *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1999, Saitoh *et al.*, 1999) i provoca la pèrdua de l'exó 3 i, conseqüentment, la pèrdua dels aminoàcids 32 a 71 de la proteïna madura.

La mare porta l'al·lel que transmet al fill i que conté la substitució que comporta la pèrdua de l'exó 3. Aquest al·lel té el promotor número 18 descrit per Horan *et al.*, i correspon amb una expressió un 18% disminuïda respecte a l'expressió que produiria l'haplotip número 1 de Horan *et al.* L'altre al·lel del gen GH1 de la mare correspon al número 8 segons la nomenclatura de Horan *et al.* i correspondria amb un promotor que expressaria un 33% més que el promotor 1 descrit per Horan *et al.* Això permet suggerir que el fill va presentar una clínica més precoç i greu per les hipoglicèmies degut a una deficiència més greu que la de la mare.

L'al·lel que no transmet el pare al seu fill (l'11 segons Horan *et al.*), té una expressió un 60% disminuïda respecte a com ho faria el promotor 1 descrit per Horan *et al.* En canvi, l'altre al·lel (l'I), no està descrit per la literatura.

L'estudi dels trànscrips d'ARN missatger de GH mostra la presència d'un sol trànscrip de 352 pb corresponent a l'amplificació de la variant 3 d'ARN (o variant 1 amb la deleció de l'exó 3). En aquest cas cal remarcar l'absència de variants 1 i 2.

S'ha demostrat que individus heterozigots per aquesta mutació porten associada una deficiència en GH, i mostren un fenotip de dèficit de GH. Cogan *et al.*, l'any 1995 van emetre la hipòtesi sobre la mutació descrita com una mutació recurrent, ja que apareixia *de novo* en tres famílies diferents, establint la causa d'aquestes la presència del dinucleòtid CpG a la unió entre l'exó 3 i l'intró 3. D'aquests dinucleòtids s'ha dit que tenen nivells incrementats de mutacions, degut a l'espontània deaminació de la 5-metilcitosina de la cadena sentit o antisentit (Cooper i Youssoufian, 1999; Duncan i Miller, 1980).

En resum, l'estudi de les associacions entre genotips i fenotips en pacients amb mutacions amb canvi d'aminoàcid a la proteïna GH ens ha demostrat l'interès d'analitzar no solament els canvis diferents dels SNPs i potencialment responsables

del fenotip sinó també els haplotips pels SNPs en relació a les seves activitats transcripcionals i a les seves associacions amb la talla en la població control.

La resposta al tractament amb GH depèn de l'edat a l'inici del tractament. Altres treballs publicats en els que han tractat amb GH nens amb GH bioinactiva per canvis d'aminoàcid han mostrat resultats variables. Així, Cogan *et al.*, 1993 tractaren amb GH dos cosins germans molt joves, de 0,6 i 3,2 anys amb la mutació Trp-7Term, que respongueren molt bé al primer any però que varen desenvolupar anticossos anti-GH després. Altres pacients tractats amb GH en edats posteriors, tot i que prepuberals, han mostrat respostes similars a les observades en els tres pacients amb la mutació Phe25Tyr als dos primers anys de tractament (Takahashi *et al.*, 1996, Takahashi *et al.*, 1997, Binder *et al.*, 2001, Besson *et al.*, 2005). La pacient amb la mutació Val173Leu va ser tractada a una edat posterior a la del brot de creixement puberal i, per tant, no se'n podia esperar un resultat prou recuperador.

El conjunt dels resultats de la literatura i els nostres demostren la necessitat de detectar les anomalies en el gen GH1 el més precoçment possible per tal de tractar els pacients amb GH fins al final del creixement. En el cas de les GH amb canvi d'aminoàcid els resultats de les proves de secreció no tradueixen la bioactivitat de la GH dosificada. A més, els nostres resultats suggereixen que caldrà tenir en compte els haplotips del promotor a l'hora d'avaluar la suficiència en hormona de creixement.

CONCLUSIONS

1. Els nostres resultats han confirmat i ampliat la descripció de la variabilitat estructural del gen GH1. Han permès descriure'n el mapa complet per primera vegada, en una població adulta amb talla normal compresa entre -2 i +2 SDS (n=307).
2. En les poblacions amb retard crònic de creixement (n=728) s'han detectat en un 11% de pacients canvis en la seqüència del gen GH1 diferents dels SNPs del mapa control. Entre els canvis, l'11,3% corresponen a canvis puntuals d'un aminoàcid (1% del total de pacients índex).
3. L'expressió de GH1 en leucòcits de controls no és constitutiva ni constant en quant a les variants d'*splicing* observades. Aquesta metodologia no permet detectar de forma fiable mutacions en pacients. En canvi, ens ha permès confirmar l'expressió de mutants com en el cas d'una substitució predictora de canvi d'aminoàcid, com també ha permès descartar una anomalia d'*splicing* o bé, al revés, confirmar-la en un altre cas.
4. L'utilització d'eines informàtiques ha permès realitzar una aproximació teòrica a l'efecte que dos canvis d'aminoàcid (Phe25Tyr i Val173Leu) en la proteïna GH tenen sobre la seva estructura i interacció amb GHR. L'anàlisi d'homologia de les proteïnes mutants amb les dels altres gens del clúster de la GH ha permès concloure que la substitució Phe25Tyr pot haver succeït per recombinació gènica amb el gen GH2, mentre que no és el cas per la proteïna amb el canvi Val173Leu.
5. Les proteïnes recombinants obtingudes al laboratori (WT i mutants) han estat aptes per el seu estudi *in vitro* (immunoreactivitat, proliferació cel·lular i bioactivitat).
6. Les GHs mutants Phe25Tyr i Val173Leu presenten una immunoactivitat i una bioactivitat disminuïdes. Els models cel·lulars línies HepG2 i C-28/I2 no han permès obtenir resultats mentre que els condrocits fetals humans han permès detectar que les dues GHs mutants presentaven una disminució en l'estimulació de la transcripció d'IGF1 mentre que estava augmentada l'expressió de GHR i de IGF1R.

7. El canvi d'aminoàcid Phe25Tyr incorporat en un al·lel de GH1 portat en heterozigosi per dues famílies no relacionades es manifesta com retard de creixement durant la infància que s'acompanya de resposta deficitària de secreció de GH i disminució d'IGF1. La resposta al tractament amb GH és adequada i permet recomanar-ne el tractament fins al final del creixement.

El canvi Val173Leu detectat en una pacient amb talla baixa i RIUC, sense dèficit aparent de GH amb pubertat ja avançada i resposta al tractament amb GH, permet suggerir que la detecció precoç de mutacions en el gen GH1 quan la secreció aparenta ser normal permetria un tractament més precoç que hauria millorat el seu pronòstic de talla final.

L'anàlisi dels haplotips complets de GH1 permet interpretar l'efecte de la combinació de mutacions en la proteïna amb els genotips pels SNPs.

BIBLIOGRAFIA

Aikawa S, Sato T, Ono T, Kato T, Kato Y. 2005. High level expression of Prop-1 gene in gonadotropic cell lines. *Journal of Reproduction and development* 52(2):195-201.

Alber T, Sun DP, Nye JA, Muchmore DC, Matthews BW. 1987. Temperature-sensitive mutations of bacteriophage T4 lysozyme occur at sites with low mobility and low solvent accessibility in the folded protein. *Biochemistry* 26(13):3754-3758.

Ambrosio R, Fimiani G, Monfregola J, Sanzari E, De Felice N, Salerno MC, Pignata C, D'Urso M, Ursini MV. 2002. The structure of human STAT5A and B genes reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT5B promoter. *Gene* 285:311-318.

Audí L, Carrascosa A, Ballabriga A. 1984. Androgen metabolism by human fetal epiphyseal cartilage and their chondrocytes in primary culture. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 58:819-825.

Audí L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Pérez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollmann H, Fryklund L, Parodi L.A and the Spanish SGA Study Group. 2006. Exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism (d3/fl-GHR) genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n=247) and in an adult control population (n=289) show increased fl/fl in short SGA. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Sep 26 doi:10.1210/jc.2006-0828.

Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, De Vries BC. 1986. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 62:134-141.

Bernat B, Pal G, Sun M, Kosiakoff AA. 2003. Determination of the energetics governing the regulatory step in growth hormone-induced receptor homodimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100 (3) 952-957.

Besson A, Salemi S, Deladoëy J, Vuissoz J.M, Eblé A, Bidlingmaier M, Bürgi S, Honegger U, Flück C, Mullis P.E. 2005. Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (GH-C53S). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90(5):2493-2499.

Bichell DP, Kikuchi K, Rotwein P. 1992. Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor 1 gene transcription *in vivo*. *Molecular Endocrinology* 6(11):1899-908.

Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. 2006. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(2):659-64.

Binder G, Brown M, Parks JS. 1996. Mechanisms responsible for dominant expression of human growth hormone gene mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81:4047-4050.

Binder G, Keller E, Mix M, Massa GG, Stokvis-Brantsma WH, Wit JM, Ranke MB. 2001. Isolated GH deficiency with dominant inheritance: new mutations, new insights. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:3877-3881.

Binder G, Ranke MB. 1995. Screening for Growth Hormone (GH) gene splice-site mutations in sporadic cases with severe isolated GH deficiency using ectopic transcript analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:1247-1252.

Blum W.F, Machinis K, Shavrikova E.P, Keller A, Stobbe H, Pfaeffle R.W, Amselem S. 2006. The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolated GH deficiency is independent of the presence of the exon 3-minos isoform of the GH receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* First published ahead of print July, 2006 doi:10.1210/jc.2006-0063.

Boyan B.D, Sylvia V.L, Dean D. D, Del Toro F, Schwartz Z. 2002. Differential regulation of growth plate chondrocytes by $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ and $24R,25-(OH)_2D_3$ involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 13(2):143-154.

Carrascosa A, Audí L. 1993. Human studies on the biological actions of IGF1. Evidence suggesting that fetal and postnatal epiphyseal cartilage is a target tissue for IGF1 action. *The Journal of Pediatric Endocrinology* 6:257-261.

Carrascosa A, Audi L, Ballabriga A. 1985. Morphologic and metabolic development of human fetal epiphyseal chondrocytes in primary culture. *Pediatric Research* 19(7):720-727.

Carrascosa A, Audi L, Ballabriga A. 1986. Human fetal epiphyseal chondrocytes in culture: an in vitro model for studying human fetal growth. *Acta Endocrinologica Supplementum (Copenhagen)*. 279:41-46.

Carrascosa A, Audí L, Ferrández MA, Ballabriga A. 1990. Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75:134-140.

Carrascosa A, Ferrández MA, Audí L, Ballabriga A. 1992 Thyroid hormone effects and identification of specific T₃-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75:140-144.

Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Clemente M, Audí L, Wollmann H, Fryklund L, Parodi L, Spanish SGA Study Group. 2006. The d3-growth hormone receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66 µg/kg/day) or the spontaneous growth in short non-GH-deficient small for gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study in 170 Spanish patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(9):3281-3286.

Carrascosa A, Yeste D, Copil A, Gussinyé M. 2004. Aceleración secular del crecimineto. Valores de peso, talla e índice de masa corporal en niños, adolescentes y adultos jóvenes de la población de Barcelona. *Medicina Clínica (Barcelona)* 123:445-451.

Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang M. Q, Krainer A.R. 2003. ESEfinder: a web resource to identify exonic *splicing* enhancers. *Nucleic Acids Research* 31(13):3568-3571.

Cartharius K, Frech F, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21(13):2933-2942.

Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera –Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH. 1989. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4(4):479-97.

Chen J, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler-Bauer A, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Rao BS, Panchenko AR, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ, Bryant SH, 2003. MMDB: Entrez's 3D-structure database, *Nucleic Acids Research* 31(1): 474-7.

Chia D.J, Ono M, Woelfle J, Schlesinger-Massart M, Jiang H, Rotwein P. 2005. Characterization of distinct STAT5B binding sites that mediate growth hormone-stimulated IGF-1 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 281(6):3190-3197.

Clackson T, Uitsch MH, Wells JA, de Vos AM. 1998. Structural and functional analysis of the 1:1 growth hormone:receptor complex reveals the molecular basis for receptor affinity. *Journal of Molecular Biology* 277:1111-1128.

Clackson T, Wells JA. 1995 A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 267:383-386.

Cogan J.K, Phillips III J.A, Sakati N, Frisch H, Schober E, Milner R.D.G. 1993. Heterogeneous growth hormone (GH) gene mutations in familial GH deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76(5):1224-1228.

Cogan J. D, Phillips III J. A, Schenkman S. S, Milner R. D. G, Sakati N. 1994. Familial growth hormone deficiency: a model of dominant recessive mutations affecting a monomeric protein. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79(5):1261-1265.

Cogan J.D, Ramel B, Lehto M, Phillips III J.A, Prince M, Blizzard R.M, de Ravel T. J. L, Brammert M, Groop L. 1995. A recurring dominant negative mutation causes autosomal dominant growth hormone deficiency- A clinical research center study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(12):3591-3595.

Cooper DN, Youssoufian H. 1988. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human Genetics* 78(2):151-155.

Correia I. J, Paquete C. M, Coelho A, Almeida C. C, Catarino T, Louro R. O, Frazao C, Saraiva L. M, Carrondo M. A, Turner D.L, Xavier A. V. 2004. Proton assisted two electron transfer in natural variants of tetraheme cytochromes from *Desulfomicrobium* Sp. *The Journal of Biological Chemistry* 279(50):52227-52237.

Courtois S.F, Lafontaine D.A, Lemaigre F. P, Durviaux S. M, Rousseau G.G. 1990. Nuclear factor-1 and activator protein-2 in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and *trans*-active the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Research* 18(1):57-64.

Cunningham BC, Mulkerrin MG, Wells JA. 1991b. Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* 253:545-548.

Cunningham BC, Wells JA. 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244:1081-1085.

Cunningham BC, Wells JA. 1993. Comparison of a structural and a functional epitope. *The Journal of Molecular Biology* 234:554-563.

Cunningham BC, Wells JA. 1991a. Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:3407-3411.

de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-312.

Dean A. 2006. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends in genetics* 22(1):38-45.

Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougnères P. 2004. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nature genetics* 36(7):720-724.

Duda DM, Brooks CL. 2003. Differential effects of zinc on functionally distinct human growth hormone mutations. *Protein Engineering* 16(7) 531-534.

Duncan BK, Miller JH. 1980. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 287(5782);560-561.

Esteban C, Audí L, Carrascosa A, Fernández-Cancio M, Pérez-Arroyo A, Ulied A, Andaluz P, Arjona R, Albisu M, Clemente M, Gussinyé M, Yeste D. 2006. Human growth hormone (GH1) gene polymorphism map in a normal-statured adult population. *Clinical Endocrinology* (in press).

Ferrández MA, Carrascosa A, Audí L, Ballabriga A. 1992. Somatostatin effects on cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *Pediatric Research* 32:571-573

Finger F, Schörle C, Zien A, Gebhard P, Goldring M.B, Aigner T. 2003. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines. *Arthritis and Rheumatism* 48(12):3395-3403.

Galsgaard E. D, Goulleux F, Groner B, Serup P, Nielsen J.H, Billestrup N. 1996. Identification of a growth hormone responsive STAT5-binding element in the rat Insulin 1 gene. *Molecular Endocrinology* 10(6):652-660.

García-Ramírez M, Torán N, Carrascosa A, Audí L. 1998. Down's syndrome: altered chondrogenesis in fetal rib. *Pediatric Research* 44:93-98.

García-Ramírez M, Torán N, Carrascosa A, Audí L. 2000a. Anomalous costochondral cartilage in fetal anencephaly. *Pediatric and Developmental Pathology* 3:256-263.

García-Ramírez M, Audí L, Andaluz P, Carrascosa A. 1999. Effects of TGF- β 1 on proliferation and IGFBP3 production in a primary culture of human fetal epiphyseal chondrocytes (HFEC). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84:2978-2981.

García-Ramírez M, Torán N, Andaluz P, Carrascosa A, Audí L. 2000b. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed in human fetal growth cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research* 15:1-7.

Garcia-Villalba P, Jimenez-Lara AM, Aranda A. 1996. Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Molecular and Cellular Biology* 16(1):318-327.

Giordano M, Godi M, Giacopelli F, Lessi M, Mellone S, Paracchini R, Petri A, Bellone J, Ravazzolo R, Bona G, Momigliano-Richiardi P. 2006. A variation in a Pit-1 site in the growth hormone gene (GH1) promoter induces a differential transcriptional activity. *Molecular and cellular endocrinology* 249:51-57.

Giordano M, Marchetti C, Chiorboli E, Bona G, Richiardi PM. 1997. Evidence for gene conversion in the generation of extensive polymorphism in the promoter of the growth hormone gen. *Human genetics* 100:249-255.

Godowski P. J, Leung D. W, Meacham L. R, Galgani J. P, Hellmiss R, Keret R, Rotwein P. S, Parks J. S, Laron Z, Wood W. I. 1989. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:8083-8087.

Goldring M.B, Birkhead F.R, Suen L-F, Mizuno S, Glowacki J, Arbiser J.L, Apperley J.F. 1994. Interleukin-1 β -modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *Journal of Clinical Investigation* 94:2307-2316.

Hasegawa Y, Fujii K, Yamada M, Igarashi Y, Tachibana K, Tanaka T, Onigata K, Nishi Y, Kato S, Hasegawa T. 2000. Identification of novel human GH-1 gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(3):1290-1295.

Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. 1994. Spontaneous growth hormone (GH) secretion by unstimulated human lymphocytes and the effects of GH-Releasing hormone and somatostatin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79:1678-1680.

Hattori N, Kitagawa K, Inagaki C. 1999. Human lymphocytes express *hGH-N* gene transcripts of 22 kDa, 20 kDa and minor forms of GH, but not *hGH-V* gene. *European Journal of Endocrinology* 141:413-418.

Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang B-H, Kitagawa K Inagaki C. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(9):4284-4291.

Hayashi Y, Yamamoto M, Ohmori S, Kamijo T, Ogawa M, Seo H. 1999. Inhibition of growth hormone (GH) secretion by a mutant GH-I gene product in neuroendocrine cells containing secretory granules: an implication for isolated GH deficiency inherited in an autosomal dominant manner. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(6):2134-2139.

Horan M, Millar DS, Hedderich J, Lewis G, Newsday V, Mo N, Fryklund L, Procter AM, Krawczak M, Cooper DN. 2003. Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region. *Human Mutation* 21:408-423.

Iliev D. I, Wittekindt N. E, Ranke M. B, Binder G. 2005. Structural analysis of human growth hormone with respect to the dominant expression of growth hormone (GH) mutations in isolated GH deficiency type II. *Endocrinology* 146(3):1411-1417.

Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55(3):519-529.

Iyengar GV, Kollmer WE, Bowen HJ. 1978. *The elemental composition of human tissues and body fluids*, 1st ed. Weinheim/New York: Verlag Chemie;13-27.

Jacquemin P, Oury C, Peers B, Morin A, Belayew A, Martial J.A. 1994. Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. *Molecular and Cellular Biology* 14(1):93-103.

Jorge A.A, Marchisotti F.G, Montenegro L.R, Carvalho L.R, Mendonca B. B, Arnhold I.J. 2006. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and*

Metabolism 91(3):795-796.

Kiess W, Butenandt O. 1985. Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells: reexpression, identification, and characterization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 60 (4):740-6.

Kofoed E.M, Hwa V, Little B, Woods K.A, Buckway C.K, Tsubaki J, Pratt K.L, Bezrodnik L, Jasper H, Tepper A, Heinrich J.J, Rosenfeld R.G. 2004. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5B mutation. *The New England journal of medicine* 349:1139-47.

Koike H, Motooka M, Kanda T, Onigata K, Murakami M, Suzuki T, Kobayashi I. 2001. Detection of point mutation for human growth hormone in patients with anti-pituitary antibody positive type 1 diabetes mellitus. *Journal of International Medical Research* 29(5):397-408.

Kossiakoff A.A, Somers W, Ultsch M, Andow K, Muller Y.A, de Vos A.M. 1994. Comparison of the intermediate complexes of human growth hormone bound to the human growth hormone and prolactin receptors. *Protein Science* 3:1697-1705.

Kowarski AA, Schneider J, Ben-Galim E, Weldon VV, Daughaday WH. 1978. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 47(2):461-464.

Krawczak M, Chuzhanova NA, Cooper DN. 1999. Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. *Gene* 237:143-151.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17(12):1244-1245.

Laumonier F, Ronce N, Hamel B.C. J, Thomas P, Lespinasse J, Raynaud M, Paringaux C, van Bokhoven H, Kalscheuer V, Fryns J. P, Chelly J, Moraine C, Briault S. 2002. Transcription factor SOX3 is involved in X linked mental retardation with growth hormone deficiency. *American Journal of Human Genetics* 71:1450-1455.

Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J.L, Butler A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* 22(1): 53-74.

Lemaigre FP, Courtois SJ, Lafontaine DA, Rousseau GG. 1989. Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind in vitro to the promoter of the human-growth-hormone gene. *European Journal of Biochemistry* 181(3):555-561.

Leung K-C, Doyle N, Ballesteros M, Waters M.J, Ho K.K.Y. 2000. Insulin regulation of human hepatic growth hormone receptors: divergent effects on biosynthesis and surface translocation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(12):4712-4720.

Lewis MD, Horan M, Millar DS, Newsway V, Easter TE, Fryklund L, Gregory JW, Norin M, Jorge del Valle C, López-Siguero JP, Cañete R, López-Canti LF, Díaz-Torrado N, Espino R, Ulied A, Scanlon MF, Procter AM, Cooper DN. 2004. A novel dysfunctional growth hormone variant (Ile179Met) exhibits a decreased ability to activate the extracellular signal-regulated kinase pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(3):1068-1075.

Lipkin SM, Naar AM, Kalla KA, Sack RA, Rosenfeld MG. 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes and Development* 7(9):1674-1687.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75(1):59-72.

Madsen K, Friberg U, Roos P et al. 1983. Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature* 304:545-547.

Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Research* 33: D192-6.

McGuinness L, Charalambos M, Sesay A.K, Mathers K, Carmignac D, Manneville J-B, Christian H, Phillips III J.A, Robinson I.C.A.F. 2003. Autosomal dominant growth hormone deficiency disrupts secretory vesicles *in Vitro* and *in Vivo* in transgenic mice. *Endocrinology* 144(2):720-731.

Mercado M, Dávila N, McLeod JF, Baumann G. 1994. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78(3) 731-735.

Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsway V, Easter TE, Gregory JW, Fryklund L, Norin M, Crowne EC, Davies SJ, Edwards P, Kirk J, Waldrom K, Smith PJ, Phillips III JA, Scanlon MF, Krawczak M, Cooper DN, Procter AM. 2003. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Human Mutation* 21:424-440.

Miyata I, Cogan JD, Prince MA, Kamijo T, Ogawa M, Phillips JA III. 1997. Detection of growth hormone gene defects by dideoxy fingerprinting (ddF). *Endocrine Journal* 44(1):149-154.

Molsoft LLC: ICM Browser version 3.4 2005.

Morales O, Faulds M.H, Lindgren U.J, Haldosén L.A. 2002. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via the janus kinase (JAK2)/signal transducers and activators of transcription (STAT5) system in osteoblast-like cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277(38):34879-34884.

Mulhall C, Hegele RA, Cao H, Tritchler D, Yaffe M, Boyd NF. 2005. Pituitary growth hormone and growth hormone-releasing hormone receptor genes and associations with mammographic measures and serum growth hormone. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 12(11 pt 1):2648-2654.

Mullis PE, Deladoëy J, Dannies PS. 2002. Molecular and cellular basis of isolated dominant-negative growth hormone deficiency, IGHD type II: insights on the secretory pathway of peptide hormones. *Hormone Research* 58:53-66.

Oakes SR, Haynes KM, Waters MJ, Herrington AC, Werther GA. 1992. Demonstration and localization of growth hormone receptor in human skin and skin fibroblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75:1368-1373.

Ohlsson C, Bengtsson B.A, Isaksson O.G.P, Andreassen T.T, Słotweg M.C. 1998. Growth hormone and bone. *Endocrine Reviews* 19(1): 55-79.

Owerbach D, Rutter WJ, Martial JA, Baxter JD, Shows TB. 1980. Genes for growth hormone, chorionic somatomammotropin, and growth hormones-like gene on chromosome 17 in humans. *Science* 209(4453):289-292.

Pakula A.A, Young V.B, Sauer R.T. 1986. Bacteriophage λ *cro* mutations: effects on activity and intracellular degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:8829-8833.

Palmetshofer A, Zechner D, Lugre T.A, Barta A. 1995. *Splicing* variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 113:225-234.

Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger C.J, Heinrich U, Amselem S. 2003. Heterozygous nonsense mutation in Exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron Syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(4):1705-1710.

Pantel J, Machinis K, Sobrier M.L, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. 2000. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *The journal of Biological Chemistry* 275(23):18664-18669.

Phillips III J.A, Hjelle B.L, Seeburg P.H, Zachmann M. 1981. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(10):6372-6375.

Phillips III J.A. 2003. Genetics of growth retardation. *Anales de Pediatría* 58 (supl 2):79-89.

Pilotta A, Mella P, Filisetti M, Felappi B, Prandi E, Parrinello G, Notarangelo LD, Buzi F. 2006. Common polymorphisms of the growth hormone (GH) receptor do not correlate with the growth response to exogenous recombinant human GH in GH-deficient children. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91(3):1178-1180.

Procter AM, Phillips II JA, Cooper DN. 1998. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Human genetics* 103:255-272.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Research* 23 (23):4878-4884.

Rinderknecht E, Humbel R.E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor 1 and its structural homology with proinsulin. *The journal of biological chemistry* 253(8):2769-2776.

Rosenfeld R.G, Rosenbloom A.L, Guevara-Aguirre J. 1994. Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocrine Reviews* 15(3):369-390.

Rosenfeld R.G. 2003. Insulin-like growth factors and the basis of growth. *New England Journal of Medicine* 349:2184-2186.

Rosenfeld R.G. 2006. Molecular mechanisms of IGF-1 deficiency. *Hormone Research* 65(suppl1):15-20.

Ross R. J. M, Esposito N, Shen X.Y, Von Laue S, Chew S. L, Dobson P. R. M, Postel-Vinay M. C, Finidori J. 1997. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Molecular endocrinology* 11(3):265-273.

Rotwein P. 1986. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:77-81.

Ryther R. C. C, Flynt A. S, Harris B. D, Phillips II J. A, Patton J. G. 2004. GH1 *splicing* is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant negative GH isoform that can be degraded by allele-specific small interfering RNA (siRNA). *Endocrinology* 145(6):2988-2996.

Saitoh H, Fukushima T, Kamoda T, Tanae A, Kamijo T, Yamamoto M, Ogawa M, Hayashi Y, Ohmori S, Seo H. 1999. A Japanese family with autosomal dominant growth hormone deficiency. *European Journal of Pediatrics* 158(8):624-627.

Salemi S, Yousefi S, Eblé A, Deladoey J, Mullis PE. 2006. Impact of del32-71-GH (exon3 skipped GH) on intracellular GH distribution, secretion and cell viability: a quantitative confocal microscopy analysis. *Hormone Research* 65:132-141.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12):5463-5467.

Seoane S, Alonso M, Segura C, Pérez-Fernández R. 2002. Localization of a negative vitamin D response sequence in the human growth hormone gene. *Biochemical and biophysical research communications* 292:250-255.

Shepard A.R, Zhang W, Eberhardt N.L. 1994. Two CGTCA motifs and a GHF1/Pit1 binding site mediate cAMP-dependent protein kinase A regulation of human growth hormone gene expression in rat anterior pituitary GC cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269(3):1804-1814.

Sjögren K, Liu J. L, Blad k, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Törnell J, Isaksson O. G. P, Jansson J. O, Ohlsson C. 1999. Liver derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7088-7092.

Smit L.S, Vanderkuur J. A, Stimage A, Han Y, Luo G, Yu-Lee L.Y, Schwartz J, Carter-Su C. 1997. Deoxyribonucleic acid binding activity of Stat5A and Stat5B. *Endocrinology* 138(8):3426-3434.

Snow J.W, Abraham N, Ma M.C, Herndier B. G, Pastuszak A. W, Goldsmith M.A. 2003. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/B-deficient mice. *The journal of immunology* 171:5042-5050.

Stallings-Mann M.L, Ludwiczak R.L, Klinger K.W, Rottman F. 1996. Alternative *splicing* of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:12394-12399.

Takahashi Y, Kaji H, Olimura Y, Coji K, Abe H, Chihara K. 1996. Brief report: short stature caused by a mutant growth hormone. *The New England Journal of Medicine* 334(7):432-435.

Takahashi Y, Shirono H, Arisaka O, Takahashi K, Yagi T, Koga J, Kaji H, Okimura y, Abe H, Tanka T, Chihara K. 1997. Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. *Journal of Clinical Investigation* 100(5):1159-1165.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680.

Thorlacius-Ussing O. 1987. Zinc in the anterior pituitary of rat: a histochemical and analytical work. *Neuroendocrinology* 45:545-548.

Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Kobayashi R. 2003. A single amino acid difference between α and β Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase kinase dictates sensitivity to the specific inhibitor, STO-609. *The Journal of Biological Chemistry* 278(13):10908-10913.

Ullrich A, Gray A, Tam A.W, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Yamaguchi Y.F. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* 5(10):2503-2512.

Urbanek M, MacLeod JN, Cooke NE, Liebhaber SA. 1992. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative *splicing* of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Molecular Endocrinology* 6:279-287.

Venugopal T, Anathy V, Pandian T.J, Gong G.Z, Mathavan S. 2002. Molecular cloning of Growth Hormone-encoding cDNA of an Indian Major Carp, *Labeo rohita*, and its expression in *Escherichia coli* and Zebrafish. *General and comparative endocrinology* 125:236-247.

Wagner JK, Eblé A, Cogan JD, Prince MA, Phillips JA, Mullis PE. 1997. Allelic variations in the human growth hormone-1 gene promoter of growth hormone-deficient patients and normal controls. *European Journal of Endocrinology* 137:474-481.

Wagner JK, Eblé A, Hindmarsh PC, Mullis PE. 1998. Prevalence of human GH-1 gene alterations in patients with isolated growth hormone deficiency. *Pediatric Research* 46(1):105-110.

Wagner K, Hemminki K, Israelsson E, Grzybowska E, Klaes R, Chen B, Butkiewicz D, Pamula J, Pekala W, Forsti A. 2005. Association of polymorphisms and haplotypes in the human growth hormone 1 (GH1) gene with breast cancer. *Endocrine Related Cancer* 12(4):917-928.

Wang Y, Jiang H. 2005. Identification of a distal STAT5-binding DNA region that may mediate growth hormone regulation of insulin-like growth factor 1 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280(12):10955-10963.

Weigent DA, Baxter JB, Wear WE, Smith S R, Bost KL, Blalock JE. 1988. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journals* 2(12): 2812-2818.

Weigent DA, Blalock JE. 1989. Expression of growth hormone by lymphocytes. *International Reviews of Immunology* 4(3):193-211.

Wells JA. 1996. Binding in the growth hormone receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:1-6.

Woelfle F, Billard J, Rotwein P. 2003. Acute control of insulin-like growth factor-1 gene transcription by growth hormone through Stat5b. *The Journal of Biological Chemistry* 278(25):22696-22702.

Woods K. A, Camacho-Hübner C, Savage M. O, Clark A. J. L. 1996. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *The New England journal of medicine* 335(18):1363-1367.

Wu H, Rama D, Malrkey W.B. 1996. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system-A clinical research study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81:1278-1282.

Yakar S, Liu J. L, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7324-7329.

Yao Z, Cui Y, Watford W, Bream J.H. Yamaoka K, Hissong B.D, Li D, Durum S.K, Jiang Q, Bhandoola A, Hennighausen L, O'Shea J.J. 2006. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1000-1005.

Ye P, Li L, Richards G, DiAugustine R. P, D'Ercole A. J. 2002. Myelination is altered I insulin-like growth factor-1 null mutant mice. *The Journal of Neuroscience* 22(14):6041-6051.

Zhang R, Ducy P, Karsenty G. 1997. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1):110-116.