

**IDENTIFICACIÓ DE NOUS GENS A LA REGIÓ CROMOSÒMICA
21q22. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE *KCNE2* I *KCNE3*.**

Memòria presentada per
Anna Domènech i Gimeno
per optar al grau de Doctora en Biologia

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Susana de la Luna, la Dra. Melanie Pritchard i el Dr. Xavier Estivill al centre de Genètica Mèdica i Molecular (Institut de Recerca Oncològica)

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Programa de Biologia i Patologia Cel·lulars, bienni 1995-1997
Tutor: Dr. Oriol Bachs

Susana de la Luna

Melanie Pritchard

Xavier Estivill

Oriol Bachs

Anna Domènech

Barcelona, setembre de 20001

ÍNDIX

PRESENTACIÓ	1
ABREVIACIONS	3
INTRODUCCIÓ	
1.- PROJECTE GENOMA	7
2.- CROMOSOMA 21	10
2.1.- MAPES	11
2.1.1.- <u>Mapes de punts de trencament</u>	11
2.1.2.- <u>Mapes de d'hibrids de radiació</u>	11
2.1.3.- <u>Mapes punts de restricció</u>	12
2.1.4.- <u>Mapes genètics (o mapes de lligament)</u>	12
2.1.5.- <u>Mapa de clons solapats</u>	13
2.1.6.- <u>Mapes transcripcionals</u>	13
2.2.- SEQÜÈNCIA DEL HSA21	14
2.2.1.- <u>Gens identificats</u>	15
3.- SÍNDROME DE DOWN	23
3.1.- TRISOMIA 21	24
3.2.- REGIÓ CRÍTICA-TRISOMIA PARCIAL	25
3.3.- ASPECTES CLÍNICS	27
3.3.1.- <u>Trets dismòrfics</u>	27
3.3.2.- <u>Retard mental</u>	29
3.3.3.- <u>Neurodegeneració del tipus Alzheimer</u>	30
3.3.4.- <u>Malformacions cardíagues congènites</u>	31
3.3.5.- <u>Leucèmia</u>	31
3.3.6.- <u>Defectes immunològics</u>	32
3.3.7.- <u>Malalties autoimmunes i disfunció de la tiroide</u>	33
3.3.8.- <u>Càncer</u>	33
3.3.9.- <u>Problemes auditius</u>	34
3.3.10.- <u>Defectes congènits en el tracte gastrointestinal</u>	34
3.4.- MODELS ANIMALS	35
3.4.1.- <u>Trisomia 16 murina</u>	36
3.4.2.- <u>Trisomia parcial murina <i>Ts65Dn</i></u>	37
3.4.3.- <u>Trisomia parcial murina <i>Ts108 Cje</i></u>	39
3.4.4.- <u>Trisomia parcial murina <i>MsTs65</i></u>	39
3.4.5.- <u>Ratolins quimèrics</u>	39
3.4.6.- <u>Ratolins transgènics</u>	40
3.4.7.- <u>Knockouts i transgenòmics</u>	41
4.- CANALS IÒNICS	42
4.1.- CANALS DE POTASSI DEPENDENTS DE VOLTATGE	44
4.2.- SÍNDROME QT LLARG (LQT)	45

4.2.1.- Mapatge dels gens responsables de LQT	47
4.3.- SUBUNITATS α TIPUS KvLQT (KCNQ1)	49
4.3.1.- <u>KCNQ1</u>	49
4.3.2.- <u>KCNQ2</u>	50
4.3.3.- <u>KCNQ3</u>	50
4.3.4.- <u>KCNQ4</u>	50
4.3.5.- <u>KCNQ5</u>	51
4.3.6.- <u>KCNH2 (HERG)</u>	52
4.4.- SUBUNITATS β	53
4.4.1.- <u>KCNE1</u>	53
OBJECTIUS	59
MATERIALS I MÈTODES	
1.- BIOLOGIA COMPUTACIONAL	63
1.1.- ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES	63
1.2.- BASES DE DADES	64
1.3.- CLONATGE <i>IN SILICO</i>	64
2.- AÏLLAMENT D'ÀCIDS NUCLEICS	65
2.1.- DNA GENÒMIC	65
2.2.- MAXIPREPARACIÓ DE DNA DE PLASMIDI	66
2.3.- MINIPREPARACIÓ DE DNA DE PLASMIDI I DE COSMIDI	67
2.4.- EXTRACCIÓ DE DNA DE LLEVATS	68
2.5.- EXTRACCIÓ DE RNA	69
3.- ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS	70
3.1.- ANÀLISI DE DNA EN GELS D'AGAROSA	70
3.2.- SOUTHERN BLOT	70
3.2.1.- <u>Digestió del DNA i electroforesi</u>	71
3.2.2.- <u>Transferència</u>	71
3.2.3.- <u>Hibridació</u>	72
3.3.- NORTHERN BLOT	72
3.3.1.- <u>Gels d'agarosa desnaturalitzants</u>	72
3.3.2.- <u>Transferència</u>	73
3.3.3.- <u>Hibridació</u>	74
3.3.4.- <u>Northern blot comercial i MTE array</u>	74
4.- CRIVELLATGE DE LLIBRERIES	75
4.1.- PREPARACIÓ DE LES CÈL·LULES	75
4.2.- TITULACIÓ DE LA GENOTECA	76
4.3.- PLAQUEIG DE LA GENOTECA	76
4.4.- PREPARACIÓ DELS FILTRES	77
4.5.- HIBRIDACIÓ	77
4.6.- AÏLLAMENT DE CLONS POSITIUS	77

5.- MARCATGE RADIOACTIU DE SONDES	78
5.1.- MARCATGE DE DNA PER INICIACIÓ A L'ATZAR O RANDOM PRIMING	78
5.2.- MARCATGE D'OLIGONUCLEÒTIDS	79
5.3.- GENERACIÓ DE SONDES D'EXTREMS DE COSMIDIS	79
5.3.1.- <u>PCR radioactiva amb un únic encebador</u>	79
5.3.2.- <u>Ribosondes</u>	79
6.- AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA	80
6.1.- REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	80
6.2.- RT-PCR	81
6.2.1.- <u>Construcció de la segona cadena</u>	81
6.2.2.- <u>PCR</u>	81
6.3.- RACE	82
7.- SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA	83
8.- PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA	84
9.- CLONATGE DE FRAGMENTS DE DNA EN PLASMIDIS	84
9.1.- DIGESTIONS	85
9.2.- DEFOSFORILACIÓ DEL VECTOR	85
9.3 GENERACIÓ DE MUTANTS DE GLICOSILACIÓ	86
9.3.1.- <u>Generació de KCNE2 N6Q</u>	86
9.3.2.- <u>Generació de KCNE2 N29Q</u>	86
9.4.- CLONATGE DELS SEGMENTS P DE LES SUBUNITATS β	87
9.5.- LLIGACIONS	87
9.6.- TRANSFORMACIÓ	88
10.- MAPATGE PER HÍBRIDS DE RADIACIÓ	89
11.- SSCP's	89
11.1.- AMPLIFICACIÓ DELS FRAGMENTS DE DNA	90
11.2.- PREPARACIÓ DEL GEL	90
11.3.- PREPARACIÓ DE LES MOSTRES	91
11.4.- PREPARACIÓ DE L'ELECTROFORESI	91
11.5.- TINCIÓ DEL GEL	92
12.- CULTIUS CEL·LULARS DE MAMÍFER	92
12.1.- CÈL·LULES	92
12.2.- TRIPSINITZACIÓ	92
12.3.- CONSERVACIÓ DE CÈL·LULES	93
12.4.- TRACTAMENTS	93
13.- TRANSFERÈNCIA DE DNA A CÈL·LULES DE MAMÍFER	94
14.- ANÀLISI DE PROTEÏNES	94
14.1.- TRADUCCIÓ <i>IN VITRO</i>	94
14.2.- PREPARACIÓ D'EXTRACTES PROTEICS	95
14.3.- GELS D'ACRILAMIDA	95

14.3.1.- <u>Preparació del gel</u>	96
14.3.2.- <u>Electroforesi</u>	97
14.4.- WESTERN BLOT	97
14.4.1.- <u>Transferència</u>	97
14.4.2.- <u>Incubació d'anticossos</u>	98
14.5.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA	99
15.- MOSTRES DE DNA	100
16.- LLISTAT D'ENCEBADORS UTILITZATS	101
RESULTATS	
1.- CONTIG DE COSMIDIS I MAPA TRANSCRIPCIONAL DE TRES REGIONS DE 21q22	105
1.1.- CONTIG DE COSMIDIS	105
1.2.- SELECCIÓ DE cDNAs I EL SEU MAPATGE	107
1.3.- SEQÜENCIACIÓ DELS cDNAs I RECERCA DE SIMILITUDS	109
1.4.- ESTUDIS D'EXPRESSIÓ	109
1.5.- CARACTERITZACIÓ DELS CLONS AÏLLATS PER SELECCIÓ DE cDNA	110
2.- CARACTERITZACIÓ DEL GEN <i>KCNE2</i>	112
2.1.- CLONATGE DEL GEN <i>KCNE2</i>	112
2.2.- ESTRUCTURA GENÒMICA DE <i>KCNE2</i>	115
2.3.- CARACTERITZACIÓ DEL PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE <i>KCNE2</i>	117
2.4.- ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA DE LA PROTEÏNA <i>KCNE2</i>	121
2.5.- ANÀLISI COMPARATIVA DE <i>KCNE2</i> EN MAMÍFERS	121
2.6.- EXPRESSIÓ DE <i>KCNE2</i> : TRADUCCIÓ <i>IN VITRO</i>	123
2.7.- EXPRESSIÓ DE <i>KCNE2</i> EN CÈL·LULES DE MAMÍFER: ESTUDI DE LA GLICOSILACIÓ DE LA PROTEÏNA	124
2.8.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE <i>KCNE2</i>	127
2.9.- SOBREEXPRESSIÓ EN LA SÍNDROME DE DOWN	132
2.10.- CERCA DE MUTACIONS EN PACIENTS DE SORDESA	134
3.- CARACTERITZACIÓ DEL GEN <i>KCNE3</i>	136
3.1.- CLONATGE DE <i>KCNE3</i>	136
3.2.- ESTRUCTURA GENÒMICA I MAPATGE DE <i>KCNE3</i>	139
3.3.- CARACTERITZACIÓ DEL PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE <i>KCNE3</i>	140
3.4.- ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA DE LA PROTEÏNA <i>KCNE3</i>	142
3.5.- ANÀLISI COMPARATIVA DE <i>KCNE3</i> EN MAMÍFERS	142
3.6.- EXPRESSIÓ DE <i>KCNE3</i> EN CÈL·LULES DE MAMÍFER: ESTUDI DE LA GLICOSILACIÓ DE LA PROTEÏNA	144
3.7.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR	145
3.8.- MUTACIONS EN PACIENTS DE SORDESA. SSCPS	148

4.- APARELLAMENT ENTRE SUBUNITATS α (KCNQs-HERG) I SUBUNITATS β (KCNEs)	150
DISCUSSIÓ	
1.- CONTIG DE COSMIDIS I MAPA TRASNCRIPCIONAL	155
1.1.- IMPORTÀNCIA DELS MAPES FÍSICS	155
1.2.- SELECCIÓ DE cDNA. CERCA DE GENS	155
2.- NOVES ESTRATÈGIES	157
3.- KCNE2	158
3.1.- ESTUDI DE LA GLICOSILACIÓ DE KCNE2	160
3.2.- KCNE2 I SÍNDROME DE DOWN	162
3.3.- CERCA DE MUTACIONS EN PACIENTS AMB SORDESA	163
4.- KCNE3	164
7.- COMPARACIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA KCNE	166
CONCLUSIONS	179
BIBLIOGRAFIA	183

El treball que aquí es presenta, és una petita contribució a l'estudi del cromosoma 21 i de les malalties que hi estan associades, en particular la síndrome de Down, des del punt de vista de la genètica molecular. La síndrome de Down és el resultat de la presència de tres còpies del cromosoma humà 21, essent aquesta l'aneuploidia més comú compatible amb la vida i la principal causa de retard mental i de defectes cardíacs congènits.

El treball, que tenia com a objectiu final la identificació de nous gens del cromosoma 21, va començar amb la construcció d'un mapa físic de cosmidis de la regió 21q22, que cobria unes 3 Mb. Amb el nombre mínim de cosmidis que cobrien tota la zona es va realitzar una selecció de cDNAs, amb l'objectiu d'aïllar seqüències expressades que poguessin portar a l'aïllament de nous gens.

Aquí es presenta el treball de clonatge i caracterització de *KCNE2*, un gen que codifica per una subunitat reguladora dels canals de potassi. A nivell proteic s'han estudiat la localització subcel·lular i modificacions post-traduccionals com la N-glicosilació. Finalment es van buscar mutacions en pacients de sordesa no sindròmica.

Un cop caracteritzat *KCNE2* es van buscar nous membres de la mateixa família. També es presenta aquí el clonatge i caracterització de *KCNE3*, tercer membre de la família dels KCNEs, també coneguts com a Mirps.

En la introducció s'explica el marc dins del qual s'inscriu aquest treball, el Projecte Genoma. Es fa un recull sobre el cromosoma 21, la importància dels mapes físics en l'obtenció de la seqüència completa del cromosoma i la síndrome de Down. Com que els gens descrits en aquest treball són subunitats de canals iònics, es fa un resum dels canals iònics, aprofundint en els canals de potassi, les patologies que hi estan associades i la seva implicació fisiològica en la generació del ritme cardíac.

El ventall de tècniques utilitzades és molt ampli, des de tècniques de genètica molecular a tècniques de biologia cel·lular. Totes aquestes tècniques queden especificades a l'apartat de materials i mètodes.

Els resultats obtinguts es detallen a l'apartat de Resultats, tant la construcció del mapa físic de la regió 21q22, com el clonatge i la caracterització a nivell genètic i proteic de *KCNE2* i *KCNE3*.

La discussió és una consideració global sobre el procés del treball realitzat, donant importància als estudis comparatius entre els membres de la família KCNE i del treball previ de mapatge del cromosoma 21.

ABREVIACIONS

aa	aminoàcid
APP	precursor de la proteïna amiloide
b	base
BAC	cromosoma artificial bacterià (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
BSA	albúmina de sèrum de vedella
cAMP	adeninamonofosfat cíclic
cDNA	àcid desoxiribonucleic còpia
Ci	curies
cM	centiMorgan
cpm	comptes per minut
cR	centiRays
°C	graus centígrads
dbEST	bases de dades d'ESTs
DNA	àcid desoxiribonucleic
DO	densitat òptica
DSCR	regió crítica de la síndrome de down (<i>Down Syndrome Critical Region</i>)
EST	Seqüència expressada (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent (<i>Fluorescence In Situ Hybridisation</i>)
g	gram
G	Unitat de centrifugació
GDB	base de dades genòmiques (<i>Genome Data Base</i>)
h	hora
HSA	cromosoma humà
HSA21	cromosoma humà 21
HUGO	organització genòmica humana (<i>Human Genome Organization</i>)
I _{KR}	corrent de potassi d'activació ràpida
I _{KS}	corrent de potassi d'activació lenta
IQ	coeficient d'intel·ligència
JLN	síndrome Jervell i Lange-Nielsen
kg	quilogram
l	litre
LDP	llet desnatada en pols
LQT	síndrome Q-T llarg
LTP	potenciació a llarg termini (<i>Long Term Potentiation</i>)
mA	miliamper
MA	malaltia d'Alzheimer
Mb	megabases
μCi	microcuries
μl	microlitre
ml	mililitre
mm	milímetre
min	minut

MMU	cromosoma murí
µg	microgram
µM	microMolar
mRNA	àcid ribonucleic missatger
ms	milisegons
mV	milivolts
N	normal
Nº cat.	número de catàleg
ng	nanogram
nm	nanòmetre
nM	nanomolar
ORF	pauta de lectura oberta (<i>Open Reading Frame</i>)
PAC	cromosoma artificial de P1 (<i>P1 Artificial Chromosome</i>)
pb	parell de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	electroforesi de camp pulsant (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
pfu	unitat formadora de placa
PKA	proteïna quinasa depenent de cAMP/cGMP
PKC	proteïna quinasa C
pM	picomolar
RACE	amplificació ràpida d' extrems de cDNA (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
Rad	radians
RNA	àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
rRNA	àcid ribonucleic ribosomal
RT-PCR	PCR de retrotranscripció
RW	síndrome Romano-Ward
s	segons
SD	síndrome de Down
SDS	dodecil sulfat sòdic (<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>)
SF	sèrum fetal
SSCP	polimorfisme de configuració de la cadena senzilla (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
STS	seqüència marcadora (<i>Sequence-Tagged Site</i>)
U	unitat
V	volts
W	vat
wt	tipus salvatge (<i>Wild type</i>)
YAC	cromosoma artificial de llevat (<i>Yeast Artificial Chromosome</i>)

1.- PROJECTE GENOMA

El Projecte Genoma Humà és un esforç internacional amb l'objectiu de construir mapes físics i genètics del genoma humà i de seqüenciar-lo completament. La finalitat del projecte és poder interpretar el significat del funcionament, la regulació, l'evolució i la variabilitat de la seva seqüència. Donada l'escala del projecte i els esforços, tant econòmics com humans, que s'hi ha involucrat, representa un dels primers "grans projectes" biològics.

El projecte s'inicia quan al 1984 al congrés "DNA Methods for Measuring Human Mutation Rates" celebrat a Alta (Utah, EEUU) es va plantejar la possibilitat de detectar mutacions directament del genoma. Una dècada abans, molts laboratoris havien desenvolupat tècniques de clonatge i caracterització de gens, però aquests esforços individuals no aportaven prou informació per l'esforç que s'hi invertia. D'aquí neix la idea de començar un projecte a gran escala. Però no és fins dos anys més tard, al 1986 a la reunió internacional de Santa Fe (New Mexico, EEUU), que es va arribar a la conclusió que era possible seqüenciar i ordenar clons genòmics que representessin tot el genoma humà. Els tres objectius principals del projecte eren la creació de mapes físics dels cromosomes humans, el desenvolupament de noves tecnologies i la creació d'una xarxa de comunicació, de bases de dades i de programes que permetessin l'anàlisi de la seqüència. Per tal de coordinar tots els esforços que es porten a terme en diferents països, al 1988 es va crear la Human Genome Organization (HUGO).

L'èmfasi inicial del projecte es posà en l'elaboració de mapes físics i genètics d'alta resolució, més que no en la seqüenciació a gran escala de tot el genoma, amb l'objectiu de crear el mapa físic i genètic definitiu, la seqüència de les 3000 Mb del genoma humà. Un objectiu intermediari era l'elaboració de contigs de clons de diferents cromosomes.

Com que l'objectiu últim del projecte no era tan sols obtenir la seqüència sinó també la interpretació i l'anàlisi del paper dels gens, en particular dels responsables de diferents malalties, es va pensar que l'estudi de diferents models

animals ajudaria en la integració de tota la informació. Per això es van emprendre nombrosos projectes de seqüenciació de diferents organismes com per exemple *Escherichia coli* K-12MG 1655 (Blattner et al., 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1997), *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium: Genome Sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, 1998) i *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) ja acabats, i *Mus musculus* i *Rattus norvegicus* que estan en progrés.

Les previsions inicials estimaven que el Projecte Genoma es podia completar en 15 anys. James Watson va proposar en el congrés “Human Genome I” celebrat a San Diego (California, EEUU) al 1989, que la data d'inici pel projecte fos el primer d'octubre de 1990. Així doncs la data de finalització previsible seria el primer d'octubre del 2005. L'any 1998 es crea l'empresa Celera Genomics, sota la direcció de Craig Venter, que preveia finalitzar la seqüència completa del genoma humà en 3 anys, utilitzant la tècnica del clonatge a l'atzar (de l'anglès *shot-gun*). El ràpid desenvolupament tecnològic que han sofert els mètodes de construcció de mapes, de seqüenciació i d'anàlisi de dades, han permès que es milloressin considerablement les previsions inicials. Al novembre de 1999, la seqüència del HSA22 va ser alliberada a les bases de dades públiques (Dunham et al., 1999) i al mes de maig del 2000, la del HSA21 (Hattori et al., 2000). Finalment al juny del 2000, el consorci públic i Celera anunciaren la finalització de la seqüència del genoma humà, amb l'alliberament de les seqüències a les bases de dades públiques durant els tres mesos següents. La importància no només científica sinó també social del Projecte, ha quedat reflectida en el fet que l'anunci de la seva finalització va tenir com a portaveus el President dels Estats Units i el Primer Ministre de la Gran Bretanya.

Donada l'àmplia implicació comercial que suposa el Projecte Genoma, al 1991 el NIH (*National Institutes of Health* dels EEUU) va intentar patentar més de 7000 fragments de cDNAs de cervell que formaven part del projecte de mapatge d'ESTs (seqüències expressades, de l'anglès *Expressed Sequence Tag*) portat a terme per Craig Venter. Aquesta temptativa va topar amb l'oposició de la comunitat científica que va pressionar, perquè l'Oficina de Patents Americana

rebutgés les patents fins que no es conegués les funcions dels cDNAs. A l'abril de 1994, la companyia comercial SmithKline Beecham va invertir 80 milions de lliures per tenir l'exclusivitat de la base de dades de Venter i va anunciar a la comunitat científica que hi podria tenir accés només si se'ls concedia els drets de patent dels descobriments efectuats amb la informació extreta de la base de dades. Posteriorment altres companyies farmacèutiques com per exemple Merck, han creat els seus propis projectes de seqüenciació a gran escala d'ESTs, amb la promesa de que els resultats serien disponibles gratuïtament per tota la comunitat científica, tot i que no se sap en quin moment els resultats són alliberats. Així doncs, els interessos públics i privats en el Projecte Genoma són diferents.

El coneixement de la totalitat dels gens i de les proteïnes del genoma permetrà centrar els esforços de la investigació en els estudis del funcionament dels gens i la seva regulació, informació necessària per poder entendre els processos biològics en la seva globalitat. També canviarà l'enfocament del diagnòstic i del tractament d'algunes malalties, ja que la informació obtinguda proporcionarà la possibilitat de diagnòstic prenatal i presimptomàtic global en individus amb risc de ser portadors de gens responsables de malalties.

2.- CROMOSOMA 21

El cromosoma humà 21 (HSA21), és el cromosoma autosòmic humà més petit, representant l'1-1.5% de tot el genoma haploide. És un cromosoma acrocèntric, el seu braç llarg, 21q, mesura unes 37 Mb, mentre que el braç curt, 21p, medeix unes 10-15 Mb (Hattori et al, 2000) i té un alt grau de similitud amb els altres cromosomes acrocèntrics humans (Fig. 1).

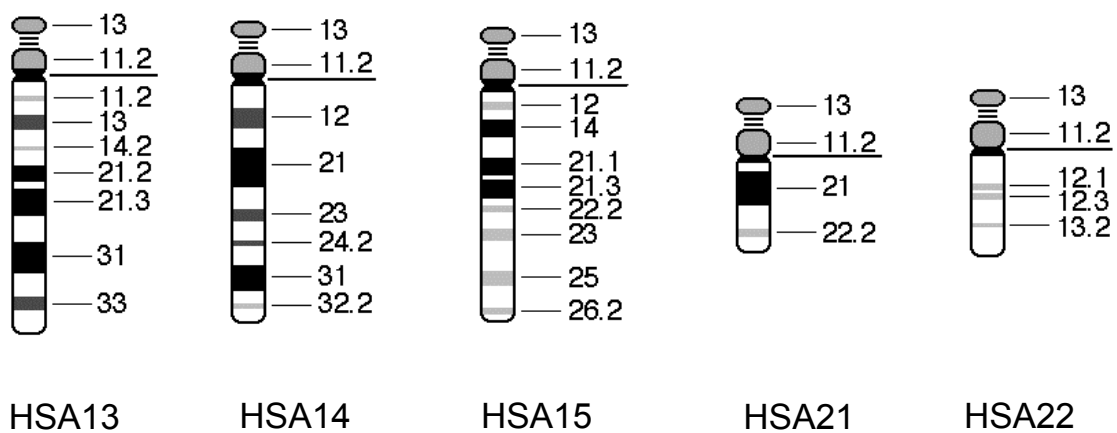


Figura 1. Comparació entre els diferents cromosomes acrocèntrics humans: HSA13, HSA14, HSA15, HSA22 i HSA21 (<http://selu.com/biocyto/human/>)

La trisomia total o parcial del HSA21 està associada a la malaltia complexa coneguda com a síndrome de Down (SD). L'absència de 21p no està associada a fenotips clínics i es creu que no contribueix al fenotip SD, ja que existeixen casos de translocacions $t(21q;21q)$, on no es troba 21p dels cromosomes translocats i no es veuen diferències fenotípiques respecte una trisomia 21 lliure (Antonarakis, 1998).

2.1.- MAPES

Malgrat és evident que la finalització de la seqüència genòmica del HSA21 fa que la informació obtinguda dels diferents mapes sigui redundat, es farà una revisió històrica dels diferents mapes. La informació obtinguda de tots els mapes es va anar integrant en un sistema unificat, incloent-hi clons solapats especialment de BACs (cromosomes artificials bacterians, de l'anglès *Bacterial Artificial Chromosome*) i de PACs (cromosomes artificials del bacteriòfag P1, de l'anglès *P1 Artificial Chromosome*), que van anar essent utilitzat per determinar la seqüència de nucleòtids del HSA21.

2.1.1.- Mapes de punts de trencament

Els punts de trencament que tenen lloc naturalment, ocasionant anomalies cromosòmiques, principalment translocacions, es van utilitzar per la creació de mapes. Aquestes anomalies cromosòmiques es van introduir en línies cel·lulars híbrides humanes-rossegadors, i es van utilitzar per dividir el cromosoma en intervals de Mb (Patterson et al., 1993; Graw et al., 1995). El principal desavantatge és la seva baixa resolució i a més a més, durant el creixement de la línia cel·lular es poden produir petites alteracions cromosòmiques, no detectables citogenèticament degut a la seva inestabilitat (Patterson et al., 1993).

2.1.2.- Mapes d'híbrids de radiació

Els mapes d'híbrids de radiació es construeixen a partir de línies cel·lulars híbrides tractades amb dosis elevades de radiació per tal de trencar els cromosomes entre 8 i 10 Mb. La unitat utilitzada és el centiRay (cR), que depèn de la dosi de radiació que han rebut els cromosomes. L'avantatge és la generació d'un conjunt de línies cel·lulars amb fragment de 8-10 Mb del HSA21, però té el desavantatge de produir mutacions o reordenaments cromosòmics durant el procés d'irradiació. L'últim mapa d'híbrids de radiació que es va obtenir després d'irradiar amb 10.000 rad

conté 161 marcadors i la distància total és de 1562 cR (24 kb/cR) (Stewart et al., 1997).

2.1.3.- Mapes de punts de restricció

Enzims de restricció de tall infreqüent, com per exemple NotI, es van utilitzar per construir mapes de restricció utilitzant la tècnica d'electroforesi en camp polsant, PFGE (de l'anglès *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), que permet separar fragment des de 50 kb a poques Mb. Per obtenir informació de la mida del cromosoma s'integra la informació proporcionada pels mapes de diferents enzims de restricció. El principal problema és que com s'elaboren a partir de línies cel·lulars poden haver-hi reordenaments que donarien lloc a errors (Patterson et al., 1993). Es va construir un mapa de restricció per NotI pel HSA21, de 37 Mb (Ichikawa et al., 1993; Wang i Smith, 1994). Per la regió pericentromèrica dels HSA13, HSA14 i HSA21, es va elaborar un mapa amb diferents enzims de restricció, que cobreix unes 2.5 Mb, i mostra la similitud entre el centròmer dels HSA13 i HSA21, parcialment compartida pel HSA14 (Trowell et al., 1993). També s'han construït mapes de restricció en YACs (de l'anglès *Yeast Artificial Chromosome*), tant de la regió proximal del braç llarg (Cheng et al., 1992; Gardiner et al., 1992; Tassone et al., 1992) com de la regió crítica de la SD, DSCR (de l'anglès *Down Syndrome Critical Region*) (Dufresne-Zacharia et al., 1994).

2.1.4.- Mapes genètics (o mapes de lligament)

Aquests mapes consisteixen en marcadors polimòrfics ordenats per freqüències de recombinació al llarg de tot el cromosoma. La unitat de distància és el centiMorgan (cM), que equival a una freqüència de recombinació de 0.01 i una distància física mitjana de 1 Mb. L'equivalència concreta depèn de cada regió cromosòmica, degut a l'existència de zones on la recombinació és més elevada.

Els mapes de lligament construïts a partir de meiosis femenines, són més llargs en la meitat proximal de 21q, no obstant en la regió més distal de 21q hi ha un excés de recombinació masculina donant lloc a un mapa de lligament masculí més llarg (Blouin et al., 1995). Existeixen molts mapes de lligament del HSA21, amb diferents mides per al braç llarg (Gardiner, 1990; McInnis et al., 1993; Bosch et al., 1994; Gyapay et al., 1994).

2.1.5.- Mapes de clons solapats

Aquests mapes consisteixen en fragments de DNA de tot el HSA21 ordenats de forma solapada. Els primers vectors utilitzats van ser els YACs, que poden arribar a contenir inserts de 2 Mb. Tenen l'avantatge de permetre construir mapes de tot el HSA21 amb pocs clons (McCormick et al., 1989a; Chumakov et al., 1992a; Nizetic et al., 1991; 1994; Gardiner et al., 1995^a; Korenberg et al., 1995), però per contra poden existir reordenacions i/o delecions. (Schlessinger, 1990). Aquests mapes han servit com a base pels mapes posteriors que s'han generat amb altres vectors que no presenten els problemes dels YACs, com són els PACs, els BACs i els cosmidis, que han estat més utilitzats posteriorment per la construcció de mapes transcripcionals i per la seqüenciació de tot el HSA21 (Soeda et al., 1995; Lafrenière et al., 1995; Eki et al., 1996; Ohira et al., 1996; Stone et al., 1996; Guimerà et al., 1997a; Hubert et al., 1997).

2.1.6.- Mapes transcripcionals

Els mapes transcripcionals consisteixen en l'ordenament a tot el llarg del cromosoma de seqüències codificants. Existeixen diferents tècniques que ens permeten aïllar aquestes seqüències com per exemple la selecció de cDNAs (*cDNA selection*; Lovett et al., 1991), l'atrapament d'exons (*exon trapping*; Buckler et al., 1991), la identificació d'illes CpG (Estivill i Williamson, 1987), la PCR *ALU-splice* (Fuentes et al., 1995; 1997) o les més recents de recerca per programes biocomputacionals. L'aplicació d'aquestes tècniques ha donat lloc a la publicació

de molts mapes transcripcionals pel HSA21 (Cheng et al., 1994; Kao et al., 1994; Peterson et al., 1994; Gardiner et al., 1995b; Lucente et al., 1995; Tassone et al., 1995; Yaspo et al., 1995; Chen et al., 1996, Guimerà et al., 1997a; Yu et al., 1997).

2.2.- SEQÜÈNCIA DEL HSA21

Al més de maig de 2000, el Consorci del Cromosoma 21 (The chromosome 21 mapping and sequencing consortium) publica tota la seqüència del HSA21 (Hattori et al., 2000) a la revista "Nature". Els grups principals que han portat a terme aquest projecte han estat l'institut alemany *Institut für Molekulare Biotechnologie, Genomanalyse* (JENA), el *German Research Centre for Biotechnology* (GBF), el *Max Planck Institut für Molekulare Genetik* i els grups japonesos *Department of Molecular Biology Keio University School of Medicine of Tokyo* i *Genomic Sciences Center-RIKEN*.

Per construir el mapa de clons previ a la seqüència, s'han utilitzat dues estratègies. La primera ha consistit en l'aïllament de clons de genoteques en graelles, mitjançant hibridacions no-isotòpiques. L'ordenament en contigs solapats i la reconfirmació dels solapaments amb enzims de restricció. Els contigs es van lligar als mapes de restricció de NotI i es van ordenar mitjançant STS coneguts. Els *contigs* es van confirmar per hibridació fluorescent *in situ*, FISH (de l'anglès *fluorescent in situ hybridization*) i els forats o *gaps* es van omplir mitjançant la seqüenciació amb oligonucleòtids específics. La segona estratègia ha consistit en aïllar clons amb STS seleccionats. Aquests clons s'utilitzen com a llavors; s'estenen els seus extrems amb nous clons genòmics, identificats per PCR o per cerques en bases de dades. Els contigs generats d'aquesta manera es confirmen per comparació de seqüències. El mapa final comprèn 518 clons bacterians, que formen 4 contigs llargs, deixant 3 *gaps*, de 30, 40 i 30 Kb respectivament.

Les estratègies de seqüenciació van ser el clonatge a l'atzar a M13 dels clons llargs, seqüenciant-los amb una redundància de 8-10 vegades i el mètode de

deleció proximal, amb una redundància de 4 vegades. El total seqüenciat del braç llarg del HSA21 és de 33.546.361 pb. La seqüència va des de 25 kb de repeticions d' α -satèlit del centròmer, fins a les repeticions seriades del telòmer, deixant 7 *gaps* que ocupen menys de 7 Kb. El contig més llarg de 21q ocupa 25 Mb. També s'ha seqüenciat un contig de 281.116 pb a 21p. La precisió de la seqüència és del 99.995% i s'estima que el total seqüenciat representa el 99.7% del cromosoma.

Les variacions de seqüència, no es van trobar distribuïdes homogèniament per tot el cromosoma. En la regió telomèrica 21q22.3-qter, la proporció és de 1/500 pb, trobant-se la variació més alta, 1/400 pb en una regió de 98 kb del telòmer. En la regió proximal, 21q11-q22.3, la variació és de 1/1.000 pb, essent la variació més baixa de 1/3.600 pb, en un segment de 61 Kb a 21q22.1.

L'anàlisi de les seqüències repetitives indica que el HSA21 conté 9.48% d'ALUs i 12.93% d'elements LINE1, mentre que al HSA22 les proporcions s'inverteixen, amb 16.8% d'ALUs i 9.73% de LINE1 (Dunham et al., 1999).

2.2.1- Gens identificats

El fet de tenir la seqüència del HSA21 pràcticament complerta, ha accelerat molt el procés d'identificació de gens, ja que als mètodes tradicionals de cerca de gens cal afegir les noves tecnologies de clonatge i predicció de gens *in silico*. Les primeres prediccions sobre el nombre de gens que hi hauria d'haver en el HSA21, se situava entre els 500 i els 1.000 gens (Antonarakis et al., 1993; Shimizu et al., 1994). Actualment es pensa que la densitat gènica no és constant en tot el cromosoma i que les prediccions inicials estan sobreestimades, situant-les al voltant de 250 gens.

El Consorci del HSA21, ha construït un catàleg de gens, ordenat jeràrquicament en 5 categories.

Categoria 1 : gens humans coneguts.

1.1 : gens amb un 100% d'identitat amb tot el cDNA i amb una associació funcional.

1.2 : gens amb un 100% d'identitat amb tot el cDNA, però de funció desconeguda.

Categoria 2 : gens nous amb similitud amb el cDNA o amb la pauta de lectura oberta de qualsevol organisme.

2.1 : gens que mostren similitud o homologia amb cDNAs de qualsevol organisme (25-100% identitat d'aminoàcids).

2.2 : gens amb similitud a una putativa pauta de lectura oberta predita *in silico*, sense verificació experimental.

Categoria 3 : gens nous amb similituds regionals a determinades regions proteiques.

3.1 : gens amb similitud d'aminoàcids en una regió proteica específica d'un domini funcional.

3.2 : gens amb similitud d'aminoàcids en una regió d'una proteïna coneguda sense associació funcional coneguda.

Categoria 4 : gens nous anònims, definits per predicció de gens, sense detectar similituds amb cap proteïna coneguda o amb cap motiu proteic.

4.1 : gens predits amb més de 2 exons i confirmats per EST amb *splice* (en menys de 20 Kb).

4.2 : gens predits corresponents a EST amb *splice* però no reconeguts per programes de predicció d'exons.

4.3 : gens predits, sense cap EST o cDNA.

Categoria 5 : pseudogens.

El catàleg llista 225 gens i 59 pseudogens. D'aquests, 127 corresponen a les categories 1.1 i 1.2 i 98 representen nous gens corresponents a les categories 2, 3 i 4. El 41% dels gens del HSA21 no tenen atributs funcionals (Taules 1 i 2).

Categoria	Nombre de gens
Categoria 1	127
Categoria 2	13
Categoria 3	17
Categoria 4	68

Taula 1. Nombre de gens del HSA21 de les categories explicades en el text (d'acord a Hattori et al., 2000).

Símbol	Nº accés	Descripció	Cadena	Posició
TPTE	AF007118	tensin, putative protein-tyrosine phosphatase, EC 3.1.3.48.	-	84293-83869
Centromere				
RBM11		RNA binding motif protein 11 like	+	1252617-1263937
STCH	U04735	microsomal stress 70 protein ATPase core	-	1409391-1419705
SAMSN-1		gene with homology to KIAA0790	-	1521779-1582895
NRIP1	X84373	nuclear factor RIP140	-	1997831-2005069
USP25	AF170562	ubiquitin specific protease USP25	+	2766805-2915540
CXADR	U90716	46 kD coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) protein	+	4549799-4603690
BTG3	D64110	B-cell translocation gene	-	4630458-4649509
YG81	AF239726	spliced variant EST AI126619	-	4829991-4856082
PRSS7	U09860	enterokinase; EC 3.4.21.9.	-	5306124-5440407
NCAM2	U75330	neural cell adhesion molecule 2	+	8232569-8490122
PRED22	AK000458	complete cDNA FLJ20451	-	12535700-12557525
ATP5A	M37104	mitochondrial ATPase coupling factor 6 subunit	-	12674543-12684464
GABPA	U13044, D13318	human nuclear respiratory factor-2 subunit alpha	+	12685464-12719695
APP	Y00264	mRNA for amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease	-	12830594-13120880
ADAMTS1	AF170084	metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs	-	13786471-13795380
ADAMTS5	NM_007038	disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5	-	13871628-13916697
ZNF294	AB018257	mRNA for KIAA0714 protein	-	15878401-15943199
USP16	AF126736	ubiquitin processing protease, EC 3.1.2.15.	+	15974947-16004744
CCT8	D13627	T-complex protein 1, theta subunit	-	16006583-16022451
BACH1	A20292	transcription regulator protein	+	16247722-16294818
GRIK1	L19058	glutamate receptor (GLUR5)	-	16502382-16888900
CLDN17	AJ250712	CLDN17 gene for claudin-17	-	17114968-17115642
CLDN8	AJ250711	CLDN8 gene for claudin-8	-	17163042-17164972
TIAM1	U16296	T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1 protein	-	18069188-18507997
SOD1	X02317	Cu/Zn superoxide dismutase, EC 1.15.1.1.	+	18608676-18617893
rA4	AF023142		-	18619970-18650793
KIAA0539	AB011111	mRNA for KIAA0539 protein	-	19259964-19290570

TCP10L		gene similar to TCP10	-	19531192-19552136
SYNJ1	AF009040	synaptojanin-1	-	19577707-19649002
GCFC	AF153208	GC-rich sequence DNA-binding factor candidate	-	19683781-19718831
PRKCBP2	U48250	PKC-binding protein RACK17	+	19975790-19977861
IFNAR2	X77722	interferon alpha/beta receptor	+	20179027-20211701
IL10RB	Z17227	cytokine receptor	+	20215375-20246167
IFNAR1	X60459	interferon-alpha receptor	+	20273930-20305504
IFNGR2	U05875	interferon-gamma receptor β chain	+	20351850-20386468
RPS5L	NM_001009	ribosomal protein S5 mRNA	+	20430493-20431180
GART	X54199	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, EC 2.1.2.2.	-	20452917-20491053
SON	X63753	SON DNA-binding protein	+	20499844-20526435
CRYZL1	AF029689	quinone oxidoreductase homolog-1	-	20538571-20590675
ITSN1	AF064243/4	intersectin 1	+	20743325-20787448
ATP5O	X83218	oligomycin sensitivity conferring protein	-	20852405-20864736
SLC5A3	AF027153	Sodium/myo-inositol cotransporter	+	21022392-21053127
KCNE2	AF071002	potassium channel subunit, MiRP1	+	21319354-21320085
KCNE1	L28168	cardiac delayed rectifier potassium channel protein	-	21398192-21398599
DSCR1	U28833	calcipressin 1	-	21465436-21562791
CLIC1L		p64 chloride channel like	+	21657652-21665430
RUNX1	D43967	acute myeloid leukemia 1 protein (oncogene AML-1)	-	21770223-21837636
RIMKLP		similar to bacterial ribosomal S6 modification protein	+	22999209-23001048
CBR1	J04056	carbonyl reductase 1, EC 1.1.1.184.	+	23019072-23022213
CBR3	AB004854	carbonyl reductase 3, EC 1.1.1.184.	+	23084242-23095605
C21orf5	AJ237839	chromosome 21 open reading frame 5 mRNA for KIAA0136 protein	+	23113590-23345278
KIAA0136		mRNA for KIAA0136 protein	+	23268980-23325388
CHAF1B	U20980	chromatin assembly factor-I p60	+	23334828-23365571
CLDN14	AJ132445	CLDN14 gene	-	23409717-23410436
SIM2	U80456	transcription factor SIM2	+	23648420-23698647
HLCS	D87328	holocarboxylase synthetase	-	23699922-23910899
DSCR5	AF216305	DSCR protein C	-	24014111-24021810
TTC3	D84294	tetratricopeptide repeat protein 3	+	24034533-24151928
DSCR3	D87343	DSCR protein A	-	24172248-24216356
DYRK1A	D86550	dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase, EC 2.7.1.	+	24367732-24464002
KCNJ6	U24660	G protein coupled inward rectifier potassium channel 2 (hiGIRK2)	-	24573396-24864896
DSCR4	AB000099	DSCR protein B	-	25002841-25069979
KCNJ15	Y10745	inwardly rectifying potassium channel Kir4.2	+	25245362-25249289
ERG	M17254	transcriptional regulator ERG	+	25330315-25609026
ETS2	J04102	erythroblastosis virus oncogene homolog 2	+	25754197-25771822
DSCR2	AJ006291	leucine rich protein C21-LRP	-	26123847-26131838
N143	AJ002572	transcriptional unit N143	-	26142249-26143447
WDR9		gene homolog to cAMP response element binding and beta-transducin family	-	26144078-26260855
HMG14	J02621	non-histone chromosomal protein	-	26289611-26296346
WRB	Y12478	tryptophan-rich protein, congenital heart disease 5 protein	+	26325991-26343350
SH3BGR	X93498	21-Glutamic Acid-Rich Protein (21-GARP)	+	26397539-26461157
B3GALT5	AB020337	GlcNAc- β -1,3-galactosyltransferase	+	26602223-26607784
IGSF5		immunoglobulin superfamily 5 like	+	26710455-26737020
PCP4	U52969	brain specific polypeptide PEP19	+	26812439-26874378
DSCAM	AF023450	CHD2-52 down syndrome cell adhesion molecule	-	26958276-27791902
BACE2	AF050171	β -site APP-cleaving enzyme 2	+	28113408-28221077
MX2	M30818	interferon-regulated resistance GTP-binding protein MXB	+	28307287-28354211
MX1	NM_002462	interferon-regulated resistance	+	28371509-28404533

TMPRSS2	U75329	GTP-binding protein MXA transmembrane protease, serine 2, EC 3.4.21	-	28410553-28443714
ANKRD3		dual-specificity S/T/Y kinase	-	28698345-28726003
ZNF298		gene containing C2 domain	-	28802792-28846674
ZNF295		similar to zinc finger 5 protein	-	28954266-28977792
UMODL1		gene similar to uromodulin	+	29043525-29105067
ABCG1	X91249	white protein homolog (ATP-binding cassette transporter 8)	+	29186705-29264680
TFF3	L08044	trefoil factor 3, HITF, human intestinal trefoil factor	-	29279510-29282789
TFF2	X51698	trefoil factor 2, SML1, human spasmolytic polypeptide (SP)	-	29313816-29318396
TFF1	X00474	trefoil factor, BCE1, human pS2	-	29329717-29333970
TMPRSS3		similar to transmembrane serine protease	-	29339326-29363526
UBASH3A		similar to UBA containing SH3 domain	+	29371350-29415100
TSGA2		homolog to mouse testis specific gene 2	-	29439932-29463727
SLC37A1		similar to glycerol-3-phosphate permease	+	29463525-29549761
PDE9A	AF067223	CGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase type 9, EC 3.1.4.17.	+	29621249-29742945
WDR4		WD repeat domain 4	-	29816661-29846963
NDUFV3	X99726/7/8	NADH-ubiquinone oxidoreductase 9 kD subunit precursor, EC 1.6.5.3.	+	29860728-29876602
PKNOX1	U68727	homeobox-containing protein	+	29971758-29999360
CBS	L00972	cystathionine-beta-synthase, EC 4.2.1.22.	-	30020629-30035840
U2AF1	M96982	U2 snRNP auxiliary factor small subunit	-	30060393-30074960
CRYAA	U05569	alphaA-crystallin (CRYA1)	+	30136479-30140239
HSF2BP	AB007131	heat shock transcription factor 2 binding protein	-	30249766-30458464
SNF1LK		similar to rat protein kinase KID2	-	30346014-30355450
H2BFS	AB041017	H2B histone family S member	+	30494512-30494892
KIAA0179	D80001	mRNA for KIAA0179 protein	+	30588872-30625350
PDXK	U89606	pyridoxal kinase, EC 2.7.1.35.	+	30648562-30685351
CSTB	L03558	cystatin B (liver thiol proteinase inhibitor)	-	30703222-30705637
D21S2056E	U79775	NNP-1/Nop52 (NNP-1), novel nuclear protein 1	+	30718866-30733378
AGPAT3		gene similar to plant lysophosphatidic acid acyltransferase	+	30833164-30911690
TMEM1	U19252	epilepsy holoprosencephaly candidate-1 protein	+	30941630-31034013
PWP2H	X95263	periodic W protein 2 homolog	+	31036667-31060455
C21orf33		HES1 protein, homolog to E.coli and zebrafish ES1 protein	+	31062955-31074982
KIAA0653	AB014553	mRNA for KIAA0653 protein	-	31156109-31170220
DNMT3L	AF194032	cytosine-5-methyltransferase 3-like protein	-	31175615-31191491
AIRE	Z97990	autoimmune regulator (APECED)	+	31215162-31227494
PFKL	X15573	liver-type 1-phosphofructokinase, EC 2.7.1.11.	+	31229326-31256648
C21orf2	Y11392	nuclear encoded mitochondrial protein, cDNA A2-YF5	-	31258219-31268538
TRPC7	AB001535	transient receptor potential- related channel 7, a Ca ²⁺ channel protein	+	31282531-31372356
KAPcluster		keratin associated proteins, gene cluster		31468577-31632094
UBE2G2	AF032456	ubiquitin conjugating enzyme G2	-	31698366-31731118
SMT3H1	X99584	ubiquitin-like protein, SMT3	-	31734951-31747380
ITGB2	M15395	cell surface adhesion glycoprotein, LFA-1/CR3/P150,959 beta subunit precursor	-	31815297-31850215

ADARB1 32155953	U76421	dsRNA adenosine deaminase DRADA2b	+	32003926-
KIAA0958	AB023175	mRNA for KIAA0958 protein	-	32193331-32217279
COL18A1	AF018081	type XVIII collagen	+	32384934-32443158
SLC19A1	U19720	reduced folate carrier (RFC)	-	32444153-32471866
PCBP3		poly (rC)-binding protein 3	+	32818086-32868160
COL6A1	X15880	mRNA for collagen VI alpha-1 C-terminal globular domain	+	32926714-32931431
COL6A2	X15882	mRNA for collagen VI alpha-2 C-terminal globular domain	+	33051649-33059229
FTCD	U91541	formiminotransferase cyclodeaminase, EC 4.3.1.4.	-	33062659-33081949
LSS	D63807	lanosterol synthase, EC 5.4.99.7.	-	33114827-33155144
MCM	AB005543	mRNA for MCM3 import factor	-	33161516-33211704
PCNT	U52962	pericentrin, kendrin (KIAA0402)	+	33250559-33372115
KIAA0184	D80006	mRNA for KIAA0184 protein	+	33468225-33511361
S100B	M59488	S-100 calcium-binding protein, beta chain	-	33524582-33525899
HRMT1L1	X99209	protein arginine N-methyltransferase 2, EC 2.1.1.	+	33562032-33591323

Taula 2. Gens del HSA21 (segons Hattori et al., 2000). S'indica el símbol i nom del gen, el número d'accés del GenBank (en el cas de gens coneguts), la posició en el cromosoma i el clo genòmic on està contingut.

La distribució de gens demostra l'existència de zones riques en gens com pot ser la regió 21q22.3 i zones pobres en gens com la 21q21, com ja s'havia hipotetitzant anteriorment (Saccone et al., 1993; Gardiner et al., 1995b). Alguns autors han especulat en la possible correlació entre la composició de bases, la densitat gènica i l'estructura de bandes dels cromosomes (Saccone et al., 1993). En la taula 3 es compara la densitat gènica general humana i la del HSA21, en les diferents isocores.

ISOCORES	CONTINGUT G-C	DENS. GÈN. HUMANA	DENS. GEN. HSA21
L	<43%	1/150 Kb	1/301 Kb
H1/H2	43-48%	1/54 Kb	1/95 Kb
H3	>48%	1/9 Kb	1/58 Kb

Taula 3. Comparació del contingut en G-C i la densitat gènica mitjana estimada (Zoubak et al., 1996) en les diferents isocores i la trobada en el HSA21 (segons Hattori et al., 2000).

Les discrepàncies entre el balanç general i el del HSA21 pot ser degut a que s'ha efectuat una sobreestimació del nombre total de gens humans, estimació basada en dades de ESTs, o bé que en l'estimació dels gens del HSA21 s'han perdut gens. Aquestes diferències amb la mitja general, juntament amb el fet que el HSA21 conté un nombre molt petit de gens predits, si es compara amb els 545 del HSA22 (Dunham et al., 1999), porta a concloure que el HSA21 és un cromosoma pobre en gens.

Apart dels fenotips SD que són el resultat de la presència de tres còpies del HSA21 en lloc de les dues habituals, en el HSA21 hi ha 18 gens que s'han identificat com a responsables de malalties monogèniques, com són *APP* per a la malaltia d'Alzheimer de tipus familiar (OMIM 104760), *SOD1* per a l'esclerosi lateral amiotròfica (OMIM 147450), *AIRE* per a la malaltia autoimmune poliglandular (OMIM 240300), *CBS* per a l'homocistinúria (OMIM 236200), *CSTB* per a l'epilèpsia mioclònica progressiva (OMIM 601145), *RUNX1* per a la leucèmia mieloide aguda (OMIM 151385) i per la malaltia plaquetària familiar (OMIM 601399), *KCNE1* per a la síndrome de Jervell and Lange-Nielsen (OMIM 176261), *HLCS* per a la deficiència de carboxilases sensibles a la biotina (OMIM 253270), *COL6A1* i *COL6A2* per la miopatia congènita benigna de Bethlem (OMIM 158810), *ITGB2* per la síndrome de deficiència d'adhesió leucocitària (OMIM 600065), *KCNE2* per a la susceptibilitat genètica per a l'arítmia cardíaca (OMIM 603796), *TMPRSS3* per a una sordesa congènita no sindròmica (OMIM 61072), *IFNGR2* per a la infecció micobacteriana atípica (OMIM 209950), *PFKL* per a l'anèmia hemolítica per deficiència de fosfofructoquinasa (OMIM 171860), *PRSS7* per a la deficiència d'enteroquinasa (OMIM 226200), *CRYAA* per les cataractes congènites (OMIM 123580) i *COL18A1* per la síndrome Knobloch (OMIM 267750). Existeixen altres loci per a malalties monogèniques, els gens responsables de les quals encara no han estat identificats, com per exemple la síndrome d'Usher tipus 1E (OMIM 602097) i l'holoprosencefàlia tipus 1 (OMIM 236100).

El fet de tenir tota la seqüència del HSA21, canviarà la metodologia per la cerca de gens responsables de malalties, que es buscaran amb la combinació de mapes genètics i anàlisi de mutacions en gens candidats. El catàleg també obre

portes a l'estudi de les anomalies cromosòmiques i dels fenotips complexos, així com a la cerca sistemàtica de candidats responsables dels fenotips que caracteritzen la SD.

3.- SÍNDROME DE DOWN

La trisomia del HSA21, produeix un fenotip descrit inicialment per John Langdon Down a l'any 1866 com a síndrome de Down (Down, 1866), tot i que no és fins cent anys més tard que no s'associa a la presència d'un HSA21 extra (Jacobs et al., 1959; Lejeune et al., 1959; Polani et al., 1960).

La SD afecta 1 de cada 700 nous nats, essent l'aneuploïdia més comú compatible amb la vida, i és la causa principal de retard mental i de defectes cardíacs congènits en la raça humana. Tot i que existeix una àmplia variació fenotípica entre els individus SD, hi ha uns trets comuns a tots ells (Epstein, 1995), que es descriuran en els següents apartats d'aquesta introducció i entre els que cal destacar uns trets facials característics, hipotonia i un retard mental entre moderat i sever, representant el 10% de tots els casos de retard mental.

La supervivència dels infants SD, està significativament disminuïda, essent els problemes cardíacs la principal causa de la mort. A principis dels anys 60, només el 50% dels infants SD superaven els 5 anys de vida, però en els últims 30 anys i degut als avenços mèdics el promig de supervivència ha augmentat considerablement. Actualment s'estima que el 75-80% superen els 10 anys de vida i existeixen evidències que un ambient ric en estímuls millora l'activitat intel·lectual.

Aquests trets característics no són presents en tots els individus SD, ni existeix cap individu que els presenti tots. Com a caos extrems, està descrit un cas de trisomia regular que només presenta dos dels trets característics (Avramopoulos et al., 1997), i un cas que a nivell clínic presenta un fenotip SD, mentre que no es detectava trisomia 21 de cap tipus (Ahlbom et al., 1996).

3.1.- TRISOMIA 21

Les trisomies del HSA21 són el resultat d'una còpia extra del HSA21, tant com a cromosoma lliure (trisomia regular) o per una translocació robertsoniana (fusió de braços llargs sencers entre dos cromosomes acrocèntrics) o en alguns casos per una translocació no robertsoniana o recíproca (intercanvis de material cromosòmic entre cromosomes). En el 96-98% dels casos, totes les cèl·lules del cos tenen tres còpies del HSA21, mentre que el 5% restant correspon a casos de mosaïcisme, on existeixen poblacions cel·lulars amb tres còpies i poblacions amb dues còpies, donant lloc a expressions clíniques SD poc severes. Depenent d'on i quan s'hagi produït el mosaïcisme, alguns individus poden ser mosaics teixit-específic. Aquest fet pot complicar el diagnòstic, ja que habitualment el cariotip es fa a partir de limfòcits, o menys habitualment a partir de fibroblasts.

La classificació citogenètica i la freqüència amb la que es troben es resumeixen en la taula 4.

<i>ANOMALIA CITOGÈNÈTICA</i>	<i>FREQÜÈNCIA %</i>
47,+21	89.3-93.9
47,+21/46 mosaic	1.0-3.7
Translocacions robertsonianes	
46,-14,+rb(14;21)	1.5-3.4
46,-13,+rb(13;21)	0.1-0.6
46,-15,+rb(15;21)	0.2-0.6
46,-21,+rb(21;21)	1.6-2.1
46,-22,+rb(22;21)	1.3-0.3
Translocacions recíproques	0.2-0.3

Taula 4. Freqüència de les diferents anomalies citogenètiques en pacients amb SD (segons Thuline i Pueschel, 1982 i Hook, 1982).

Estudis amb tècniques moleculars han demostrat que la no-disjunció materna representa el 95% dels casos de trisomia del HSA21 (Sherman et al., 1991; Antonarakis et al., 1992). D'aquests, el 77% corresponen a errors de la meiosi II i el 23% restant a errors de la meiosi I, on l'edat de la mare no sembla marcar la diferència. En els casos de no-disjunció paterna, el 22% tenia lloc durant la meiosi I (Antonarakis, 1991).

El risc de tenir un fill amb la SD creix amb l'edat materna, de manera que la proporció de fills amb SD augmenta linealment al voltant del 0.04-0.05/1000 per any fins als 37-38 anys de la mare (Adams et al., 1981). A partir d'aquesta edat sembla que la incidència augmenta de manera exponencial (Hook et al., 1988). El fort efecte de l'edat materna contrasta amb el petit, si existeix, efecte de la incidència de l'edat paterna (Stene et al., 1987a; Cross i Hook, 1987; Hatch et al., 1990). Les causes d'aquest fort efecte de l'edat materna són desconegudes.

3.2.- REGIÓ CRÍTICA-TRISOMIA PARCIAL

Els reordenament cromosòmics, tant duplicacions intersticials del HSA21 com translocacions que afecten només el HSA21, que resulten en la presència triplicada de zones del HSA21, s'anomenen trisomies parcials. L'estudi de trisomies parcials, ha permès la construcció d'un mapa fenotípic que hauria de permetre la correlació de característiques fenotípiques concretes de la SD amb regions o loci determinats del cromosoma (Fig. 2). Les conclusions consens, no obstant, s'han de prendre amb cautela, doncs el fenotip ha estat caracteritzat bàsicament de manera subjectiva i no s'han utilitzat aproximacions diagnòstiques quantitatives.

En els primers estudis es va establir que el fenotip SD complert, com a resultat de la manifestació del retard mental, defectes cardíacs congènits, trets facials característics, anomalies a les mans i canvis dermatoglífics, apareix quan la banda 21q22 està duplicada, i es requereix les subbandes 21q22.1 i 21q22.2 (Summit, 1981; Rethoré, 1981). Estudis posteriors de més pacients suggereixen

que hi ha una regió d'unes 4 Mb entre el marcador *D21S17* i el gen *ETS2*, que si es troba triplicada s'associa a nombrosos trets característics de la SD com el pont nasal aplanat, llengua protuient, arc palatal gran, orelles doblegades, anomalies a les mans, hiperlaxitud, hipotonia muscular, estatura baixa i retard mental (Rahmani et al., 1989; McCormick et al., 1989b; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994). Aquesta regió es va anomenar Regió Crítica de la Síndrome de Down (DSCR, de l' anglès *Down Syndrome Critical Region*). La DSCR correspon al 10% de tot el HSA21. La triplicació de zones distals al marcador *BCEI*, inclou altres trets com són fissura palpebral obliqua, epicants, taques de Brushfield, solc simià i alguns signes dermatoglífics (Antonarakis, 1998).

En tots aquests estudis, la presència d'un determinat fenotip és molt important, mentre que la seva absència no contribueix a la definició de la regió, doncs els pacients amb una trisomia completa tampoc presenten totes les característiques fenotípiques. Existeixen casos de pacients que no tenen triplicada la DSCR però si la part proximal i en canvi presenten alguns fenotips característics de la SD com són el retard mental, hipotonia, estatura baixa, microcefàlia, trets facials característics i dermatoglífics anòmals (Korenberg et al., 1994). Aquestes observacions van en contra de que una única regió cromosòmica triplicada és la responsable de la majoria dels fenotips SD. Per tant i malgrat s'han portat a terme nombroses temptatives per excloure el paper d'algunes bandes de 21q22 implicades en la patogènesi de la SD, no es pot dir que cap regió del HSA21 sigui la causa exclusiva en el desenvolupament del fenotip SD.

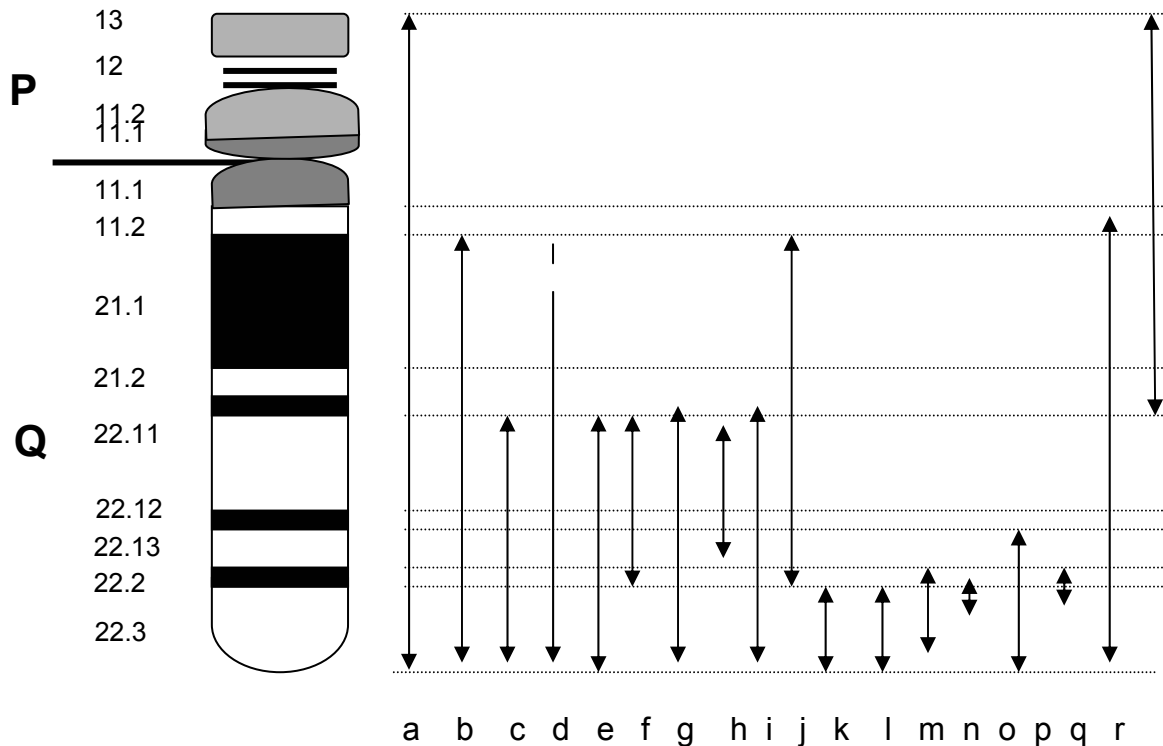


Figura 2. Mapes fenotípics de la SD. Les fletxes indiquen, en ordre cronològic d'esquerra a dreta, els segments proposats que en trisomia donarien lloc al fenotip SD. a) Lejeune et al., 1959. b) Aula et al., 1973. c) Niebuhr, 1974. d) Williams et al., 1975. e) Wahrman et al., 1976. f) Poissonier et al., 1976. g) Raoul et al., 1976. h) Sinet et al., 1976. i) Pfeiffer et al., 1977. j) Cantu et al., 1980. k) Mattei et al., 1981. l) Pellissier et al., 1988. m) McCormick et al., 1989. n) Rahmani et al., 1989. o) Korenberg et al., 1990. p) Delabar et al., 1993. q) Korenberg et al., 1994. r) Daumer-Hass et al., 1994 (tretasomia parcial).

3.3.- ASPECTES CLÍNICS

3.3.1.- Trets dismòrfics

Les manifestacions fenotípiques més aparents, encara que no les més greus, són els trets dismòrfics característics que constitueixen, globalment, el fenotip físic distintiu de la SD (Taula 5). Encara que els individus amb SD poden manifestar alguns d'aquests trets, és rar que un mateix individu els presenti tots. Per altra banda cap d'aquestes característiques és específica de la SD o d'anomalies cromosòmiques, així doncs, individus que presentin una o varies d'aquestes

característiques no necessàriament han de patir una anomalia cromosòmica o SD.

TRET DISMÒRFIC	FREQÜÈNCIA (%)
Fenedures palpebrals obliqües	82
Pell extensible a la base del coll	81
Paladar estret	76
Braquicefàlia	75
Hiperlaxitud articular	73
Absència de pont nasal	68
1er i 2on dits del peu espaiats	68
Mans curtes i amples	64
Coll curt	61
Dentició anòmala	61
Epicant	59
Dit petit curt	58
Boca oberta	57
Curvatura del dit petit	56
Llengua escrotal	55
Plec simià	53
Orelles plegades i displàstiques	50
Llengua protruïent	47

Taula 5. Freqüència dels diferents trets dismòrfics en la SD (segons Pueschel et al., 1982).

A més d'aquests trets, hi ha una sèrie de característiques dermatoglífiques característiques que havien estat més utilitzades que actualment en el diagnòstic clínic, com per exemple el patró de l'arc tibial de l'àrea halucal del peu, segons dits amb curvatura i triradi en la zona distal palmar.

Aquests trets dismòrfics, han permès la creació d'un índex que permet el diagnòstic del 95% dels pacients amb sospita de SD, amb una precisió del 99.9%.

3.3.2.- Retard mental

El retard mental en la SD està tipificat per un retard en el desenvolupament, dèficits en la memòria a curt i llarg termini, problemes en el llenguatge i anomalies cognitives i d'aprenentatge en els processos auditori-verbal (Korenberg et al., 1994; 1995; Wang i Bellugi, 1994). Les mesures del coeficient d'intel·ligència (IQ) efectuades en individus amb SD varien entre 20 i 69, depenent de l'edat i de l'ambient, així com de factors genètics encara desconeguts (Carr, 1994).

Estudis anatòmics clàssics combinats amb les noves tecnologies de neuroimatges, han caracteritzat parcialment el sistema nerviós dels individus amb SD, com per exemple la disminució del volum del cervell, dels hemisferis cerebrals i del tronc cerebral, un augment pronunciant del lòbul occipital, disminució del girus temporal, opercularització incompleta amb exposició del còrtex insular i solcs secundaris reduïts (Raz et al., 1995). Aquestes anomalies són degudes a la disminució i al creixement anòmal dels lòbuls frontals i temporals.

Estudis histopatològics demostren que la major diferència entre un cervell SD i un cervell normal està en el nombre i l'organització de les neurones, en l'arborització dendrítica i en la laminació cortical (Ferrer i Gullota, 1990; Kaufmann i Moser, 2000). Existeixen algunes diferències subtils en diferents capes corticals, particularment es troba una reducció del nombre neuronal en les capes 2 i 4 (Wisniewski, 1990; Becker et al., 1993). També s'ha vist que els paràmetres sinàptics pre i postnatsals són anòmals i portarien a una disminució en l'eficiència de la transmissió sinàptica. A més a més s'ha descrit un retard en la mielinització i una alteració en les propietats electrofisiològiques de la membrana neuronal (Wisniewski, 1990; Becker et al., 1993), un augment en l'expressió de la proteïna S100 en els astròcits (Marks et al., 1996), activació de la micròglia (Wierzb-Bobrowicz, 1999) i es poden trobar displàsies vasculars amb focus de calcificacions en el gangli basal (Okano et al., 1992).

Encara que es creu que el substrat neuroanatòmic del retard mental és l'anòmala

estructura dels arbres dendrífics, no han estat demostrats encara la contribució d'altres factors com la funció disminuïda de la glia, la vasculopatia i l'activació de les citoquines, en el mal desenvolupament i en els aspectes cognitius alterats (Becker et al., 1993).

3.3.3.- Neurodegeneració del tipus Alzheimer

Tots els individus SD que superen els 35 anys de vida desenvolupen canvis neuropatològics que tenen una gran similitud amb els que tenen lloc en la malaltia d'Alzheimer (MA) (Schapiro et al., 1988; Mann, 1988a,b; Lai i Williams, 1989), encara que no tots desenvolupen demència amb símptomes clínics (Devenny et al., 1996; Holland et al., 2000)). La SD sembla ser el millor model natural de la neuropatologia del tipus MA pre-programada, fet que suggereix que un millor coneixement del cervell SD podria contribuir a un millor coneixement de la neurodegeneració del tipus MA.

La MA és una demència o degeneració cerebral, en la que es dona un deteriorament progressiu i global de les facultats intel·lectuals, que comença entre la meitat i l'últim terç de la vida. Aquests trets clínics van acompanyats de la pèrdua de neurones en estructures cerebrals superiors amb la presència de plaques senils extracel·lulars o dipòsits de β -amiloide i feixos neurofibril·lars intracel·lulars (Selkoe, 1999).

El gen *APP* (de l'anglès *amyloid precursor protein*), localitzat en el HSA21, codifica per una proteïna transmembrana que quan és tallada dona lloc als pèptids β -amiloides. Aquests s'acumulen majoritàriament extracel·lularment en forma de dipòsits fibril·lars insolubles en els cervells de pacients amb MA i d'adults joves amb SD. Estudis immunològics demostren que encara que la sobre-expressió d'*APP* en individus amb SD té lloc des del naixement (Oyama et al., 1994), no es troben plaques en infants amb SD (Arai et al., 1997). No obstant, els cervells SD es diferencien dels controls per la progressiva acumulació, edat-dependent, de dipòsits heterogenis de β -amiloide en plaques i en vasos cerebrals

(Armstrong, 1999).

3.3.4.- Malformacions cardíques congènites

Les anomalies congènites més freqüents en la SD són les cardíques, afectant entre el 40 i el 50 % dels infants amb SD (Rehder, 1981). Un gran nombre de les cardiopaties es deuen al mal desenvolupament embrionari dels coixinets endocàrdics, estructures que quan es desenvolupen generen els tabics entre els diversos compartiments cardíacs. Existeix una gran variabilitat de malformacions (Taula 6), sent la més freqüent la comunicació atrio-ventricular, un defecte produït per la no fusió del tabic interauricular i del tabic interventricular durant el desenvolupament fetal, que representa el 40% de totes les malformacions cardíques congènites en la SD, mentre que és molt infreqüent en la població general.

<i>Cardiopatia</i>	<i>Freqüència (%)</i>
Canal atrio-ventricular	39%
Defecte tabic interventricular	31%
Ductus arteriosus	9%
Defecte tabic interauricular	9%
Tetralogia de Fallot	6%

Taula 6. Freqüència de les diferents cardiopaties en la SD (segons Pueschel, 1982).

3.3.5.- Leucèmia

Es considera que el risc relatiu de que els infants amb SD pateixin leucèmia és entre 10 i 18 vegades superior fins a 16 anys, respecte la població control, i que aquest risc augmenta amb l'edat. Concretament, la leucèmia megacariocítica aguda és 200-400 vegades més freqüent en infants SD que en la població

cromosòmicament normal (Zipursky, 2000).

La distribució dels diferents tipus de leucèmia varia, segons l'edat. Així doncs, en infants menors d'un any, predomina la leucèmia no limfocítica aguda. L'edat de manifestació de la malaltia és diferent en la població SD que en la població control, apareixen abans en la població SD, fet que no es produeix en altres tipus de leucèmia com per exemple la leucèmia limfocítica aguda, tot i que en aquesta la supervivència és menor que en individus diploids. Durant el període neonatal, són freqüents les leucèmies transitòries, fenotip que ha estat mapat a la part proximal del braç llarg (Niikawa et al., 1991). El mateix autor proposa que l'elevat risc de patir leucèmia dels infants amb SD és degut a un al·lel que quan es troba en homozigositat provoca la pèrdua de funció d'un gen supressor de tumors.

La resposta a la quimioteràpia és diferent en pacients amb SD que en pacients no-SD. A dosis terapèutiques estàndards el metotrexat presenta una major toxicitat en els individus amb SD (Peeters i Poon, 1987).

3.3.6.- Defectes immunològics

Observacions clíniques suggereixen que els individus amb SD són més susceptibles als agents infecciosos que els individus controls, essent les malalties infeccioses la seva primera causa de mort (Ugazio et al., 1990). Per exemple, la incidència de l'hepatitis infecciosa és d'un 28% mentre que en individus amb altres tipus de retard mental és del 3% (Shapiro, 1983).

Les bases per aquest augment de susceptibilitat a la infecció i a la leucèmia, no es coneixen, però s'ha proposat que pot ser degut a un augment de la sensibilitat a l'interferó (Zihni, 1994). Alguns gens del HSA21 estan involucrats en la resposta immunitària/interferó, incloent-hi alguns receptors, com per exemple *IFNAR1* (OMIM 107450), *IFNAR2* (OMIM 602376) i *IFNGR2* (OMIM 147569). Es pot pensar que la sobre-expressió d'aquests receptors pot donar una major sensibilitat a l'interferó, donant lloc a una resposta immunitària anòmala en la SD (Murphy et

al., 1995). A aquest fet s'hauria d'afegir que el nombre de limfòcits T en sang està disminuït i la seva resposta proliferativa alterada (Scotese et al., 1998), així com el nombre de cèl·lules que expressen els receptors de limfòcits T, suggerint que el timus dels individus SD és ineficient en l'alliberament de cèl·lules T madures, degut probablement a anomalies anatòmiques (Murphy i Epstein, 1992).

3.3.7.- Malalties autoimmunes i disfunció de la tiroide

No es coneix l'etiologia de les anomalies de la tiroide, però s'ha especulat que està relacionada amb els problemes immunitaris descrits en l'apartat anterior. S'han descrit casos tant d'hipertiroïdisme com d'hipotiroïdisme en individus adults amb SD, amb freqüències del 2.5% i del 17% respectivament. El goll es troba en el 18% dels casos. Es pensa que les persones amb SD són propenses a patir malalties autoimmunes, tot i que no està ben estudiat i només s'han descrit anticossos anti-tiroide (Cutler et al., 1986).

3.3.8.- Càncer

La incidència de certs tipus de tumors en individus amb SD és més baixa que en la població general. Així, per exemple els individus amb SD rarament pateixen càncer d'estómac (Satge et al., 1998a)

En un estudi de 6.724 infants europeus amb neuroblastoma, no n'hi havia cap amb SD, i s'han descrit pocs casos de càncer de mama i neuroblastoma (Satge et al., 1998b; Hasle et al., 2000). En el cas de tumors gàstrics, es va suggerir que com a mínim dos dels gens supressors de tumors es troben en el HSA21 (Sakata et al., 1997), mentre que en el cas de neuroblastomes la proteïna S100B sobre-expressada podria ser responsable del fenotip protector (Satge et al., 1998a).

3.3.9.- Problemes auditius

S'ha relacionat els problemes de desenvolupament del llenguatge i de les capacitats d'aprenentatge amb els problemes auditius dels infants amb SD. El 90% dels individus amb SD pateixen una pèrdua important d'oïda, habitualment del tipus conductiu (Mazzoni et al., 1994).

El pavelló auditiu és més petit i sovint el conducte auditiu extern també és més petit, sent estenoic en alguns casos. A nivell d'oïda interna, s'han descrit espirals coclears més curtes en individus amb SD respecte a la població general, que poden causar una distorsió en l'audició (Walby i Schuknecht, 1984). En alguns casos també s'han descrit malformacions estructurals del sistema vestibular (Harada i Sando, 1981). Per altra banda, els defectes immunològics que pateixen els individus amb SD, també afecten el sistema auditiu, sent les otitis mitges bastant freqüents, i poden arribar a ser cròniques. També influeix el fet de tenir una certa disfunció de les trompes d'Eustaquí deguda a la braquicefàlia i a la hipotonia, juntament amb les alteracions del múscul del paladar.

3.3.10.- Defectes congènits en el tracte gastrointestinal

Encara que aquests tipus de defectes congènits són molt menys freqüents que els cardíacs, hi ha un augment de la freqüència en la població SD respecte a la població control. La lesió més característica és l'estenosi duodenal, que en la població general té una freqüència d'un entre 10000-40000 naixements mentre que en infants amb SD arriba al 4-7%. El 35% dels casos d'estenosi duodenal congènita estan associats a la SD (Korenberg et al., 1992). A més a més, l'estenosi duodenal no s'associa com a tret característic de cap altra síndrome descrit.

Altres lesions del tracte digestiu, característiques de la SD són el pàncrees annular en un 2.5%, anus no perforat en un 1%, malaltia d'Hirschsprung en un 0.56% i fístula traqueoesofàgica o atrèsia esofàgica en un 0.43% (Milunsky i

Fisher, 1968; Garver et al., 1985; Levy, 1991).

3.4.- MODELS ANIMALS

Moltes de les conseqüències de l'aneuploidia es presenten durant el període de la morfogènesi. Això suposa un greu obstacle per la seva investigació, doncs és tècnica, legal i èticament impossible l'experimentació en dones gestants. D'aquí la importància de la creació de bons models animals, que en gran mesura repliquin les condicions humanes en termes de funció i de desenvolupament. Cap model animal pot ser una rèplica exacta de la patologia humana, no obstant, els models animals basats en altres mamífers semblen els més apropiats, doncs comparteixen moltes similituds biològiques amb els humans.

S'ha observat l'existència de primats amb una equivalència clínica i genètica amb la trisomia 21 i el SD (McClure et al., 1969; Andrie et al., 1979), però l'estudi d'aquests models no ofereixen cap avantatge respecte els humans.

Donades la seva facilitat de manipulació, el seu control genètic i la seva similitud amb els humans durant els processos de morfogènesi i en el funcionament neuroquímic del sistema nerviós central, el ratolí ha estat escollit com a model animal. A més a més, encara que existeixen algunes reorganitzacions en el genoma, moltes regions cromosòmiques entre ratolí i humans són estructuralment similars i són portadores de gens homòlegs. No obstant, aquests models també generen problemes, com pot ser la impossibilitat d'obtenir animals viables en etapes postnatales, quan grans regions del seu genoma no estan balancejades. També cal considerar que no poden replicar les grans funcions del sistema nerviós central, com per exemple la cognició, tan vulnerable als efectes de l'aneuploidia en humà.

Els models murins desenvolupats van des d'aquells que tenen una còpia extra sencera del cromosoma -ratolins trisòmics- fins aquells que tenen una còpia extra d'un o varis gens del HSA21 -ratolins transgènics-. Existeixen també possibilitats

intermèdies, com poden ser les duplicacions parcials del HSA21 o del seu homòleg murí.

3.4.1.- Trisomia 16 murina

El cromosoma 16 de ratolí (MMU16) no és completament homòleg al HSA21, sinó que hi ha gens que en humans es troben en altres cromosomes, i no tots els gens del HSA21 humà es troben en el MMU16 de ratolí (Davisson et al., 1990), sinó que els més distals es troben en els MMU17 i MMU10 (Fig. 3). A més a més el MMU16 té seqüències d'altres cromosomes humans, principalment del HSA3, però també del HSA22, HSA8 i HSA16 (Davisson i Costa, 1998). El MMU16 és un 35% més gran que el HSA21, conseqüentment, la trisomia murina estarà menys balancejada que la humana. No obstant aquestes dades, el trisòmic murí ha estat utilitzat com a model animal, doncs tenen algunes de les característiques del SD (Epstein et al., 1985), sobretot a nivell morfològic (Webb et al., 1996), bioquímic (Epstein et al., 1985) i hematològic (Gjertson et al., 1999).

Existeixen algunes diferències fenotípiques entre el trisòmic murí i l'humà, essent una de les principals la supervivència dels fetus trisòmics, que en humans està al voltant del 10% i en ratolins és pràcticament nul·la (Epstein et al., 1985). No està clar si aquestes diferències són degudes a la variació entre espècies o poden ser atribuïdes a la pertorbació de la dosi gènica dels gens que estan en el MMU16 i no es troben en el HSA21. També cal destacar que algunes característiques de la SD no estan presents en el trisòmic 16, doncs part dels gens del HSA21 es troben en el MMU17 i/o MMU10.

La no supervivència dels ratolins trisòmics limita, òbviament l'estudi del fenotip postnatal o adult. Per tant, la gènesi e ratolins trisòmics parcials (*Ts65Dn*, *Ts108Cje* i *MS1Ts65*), que neixen vius i sobrevisquin, va ser de gran utilitat (Fig. 3).

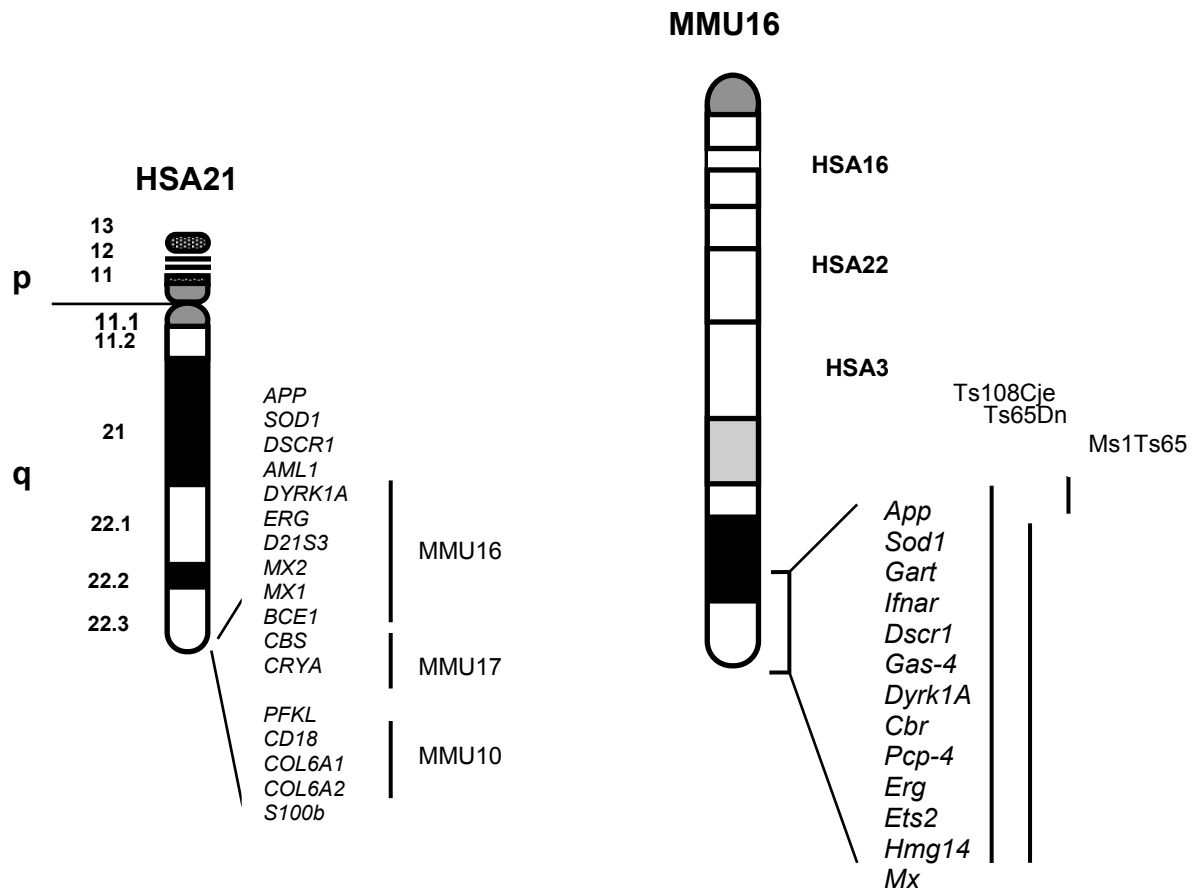


Figura 3. Sintènia entre el HSA21 i el MMU16 i els models animals generats.

3.4.2.- Trisomia parcial murina *Ts65Dn*

El ratolí *Ts65Dn* té una trisomia parcial del MMU16 que comprèn des del gen *App* fins a *Mx1* (Davisson et al., 1993), una regió que és perfectament sintènica amb el HSA21. A continuació s'anomenen les característiques del *Ts65Dn* descrites fins ara:

- El *Ts65Dn* és més petit que els seus germans de camada (Davisson et al., 1993; Davisson i Costa, 1998).
- A l'igual que el transgènic de *ETS2*, desenvolupa hidrocefàlia en algun moment de la seva vida, similar a la que pateixen els individus adults SD que tenen els sacs de líquid cerebrospinal més grans (Davisson et al., 1993;

Davisson i Costa, 1998).

- Anomalies túniques, incloent una elevada apoptosi (Paz-Miguel et al., 1999)
- Els *Ts65Dn* amb background B6C3 HFI, són obesos a l'edat de 4-5 mesos, amb un augment del greix abdominal, predominantment intraperitoneal (Davisson et al., 1993). Aquest aspecte del fenotip podria ser anàleg a l'obesitat prematura que presenten alguns individus SD.
- S'observen algunes característiques craniofacials típiques de la SD com la hipoplàsia, braquicefàlia, paràmetres mandibulars i cranials alterats i disgènia de l'esquelet (Richtsmeier et al., 2000). Algunes d'elles podrien ser degudes a la sobre-expressió d'*Ets2*, ja que aquest transgènic també les presenta, encara que amb una àmplia variació en la penetrància (Sumarsono et al., 1996).
- El *Ts65Dn* presenta astrocitosi, que també es troba en la SD (Davisson i Costa, 1998). El cerebel està reduït, afectant particularment a la soca granular (Baxter, 2000)
- A nivell molecular s'han detectat dèficits sinàptics importants en el córtex temporal (Kurt et al., 2000), deficiències importants en les transmissions sinàptiques del sistema β -adrenèrgic, encara que de manera selectiva per àrees específiques del cervell (Dierssen et al., 1997). La producció basal de cAMP es troba reduïda en l'hipocamp i en el còrtex cerebellós, però no en el cerebel. Les neurones colinèrgiques, serotoninèrgiques i catecolaminèrgiques no semblen estar afectades (Megias et al., 1997).
- Pateixen tremolors i els ratolins més vells, atacs (Davisson i Costa, 1998), fet que podria estar relacionat amb la freqüència d'atacs en individus SD és un ordre de magnitud més gran que la població normal. No hi ha evidències de demència del tipus Alzheimer, no s'han trobat plaques d'amiloide ni cabdells neurofibril·lars, en ratolins menors de 21 mesos (Reeves et al., 1995). No obstant, s'ha trobat una degeneració relacionada amb l'edat, de les neurones colinèrgiques del cervell anterior, degeneració característica de les persones grans amb SD o amb malaltia d'Alzheimer, i es pensa que podria contribuir d'alguna manera a la demència (Holtzman et al., 1996).
- Pel que respecte als aspectes de comportament i/o aprenentatge, els trisòmics parcials tenen problemes en la memòria i/o l'aprenentatge que requereix la integració de la informació visual i espacial (Escorihuela, 1998). Presenten un

augment en l'activitat exploratòria i/o hiperactivitat, tant vertical com horitzontal en la fase fosca (Escorihuela et al., 1995; Reeves et al., 1995; Holtzman et al., 1996; Hyde et al., 2001). S'ha descrit també pèrdua de coordinació motora (Costa et al., 1999).

3.4.3.- Trisomia parcial murina Ts108 Cje

El ratolí Ts108Cje és trisòmic pels gens que es troben en la regió 21q22, coneguda com DSCR, des de *Sod1* que està inactivat fins a *Mx1* (Sago et al., 1998). Aquests ratolins presenten un retard en el creixement en l'etapa postnatal i defecte en l'aprenentatge. L'activitat exploratòria està alterada i tenen problemes en l'aprenentatge espacial (Sago et al., 1998). Al contrari que els ratolins Ts65Dn, mostren hipoactivitat (Sago et al., 2000)

S'han descrit diferències respecte el *Ts65Dn*, com per exemple la no degeneració de les neurones colinèrgiques del cervell anterior i la fertilitat (Sago et al., 1998).

3.4.4.- Trisomia parcial murina Ms1Ts65

El ratolí Ms1Ts65 és trisòmic pels gens que es troben des de *App* fins a *Sod1* (Sago et al.,), és a dir, la regió de diferència entre les dues trisomies anteriors. Aquests ratolins mostren dèficits d'aprenentatge menys severs que els ratolins Ts65Dn.

3.4.5.- Ratolins quimèrics

Aquests animals són portadors de trisomies en mosaïcisme formalment anàlogues a la humana. Aquestes quimeres poden tenir un 50-70% de cèl·lules trisòmiques en teixits com el cervell, però la representació trisòmica en teixits com la sang és molt baixa (Cox et al., 1984; Gearhart et al., 1986).

Estudis del comportament d'aquestes quimeres demostren un augment de l'activitat en la part fosca del cicle (Epstein et al., 1991).

3.4.6.- Ratolins transgènics

Aquest model té moltes limitacions, però ofereix alguna avantatge respecte els models anteriors. Una avantatge d'aquesta tècnica és que la sobre-expressió d'un únic gen pot ajudar a dilucidar el paper de gens individuals en les parts específiques del fenotip. Les limitacions estan relacionades principalment amb la introducció d'una seqüència exògena que pot alterar de manera important el genoma receptor, no tant per l'expressió de la seqüència exògena sinó perquè la inserció pot trencar alguna seqüència codificant endògena. Una altra limitació és l'estricta expressió espai-temporal del gen d'interès. En molts casos, les regions promotores no són conegudes i llavors s'utilitza un promotor heteròleg, que fa que s'expressi en determinats teixits, o en determinades condicions, que poden no ser equivalents al gen original.

La informació obtinguda d'alguns models transgènics ha estat de gran importància en la definició del paper fisiològic d'alguns dels gens del HSA21.

- El primer ratolí transgènic per la SD que es va generar va ser el transgènic de *SOD1* (Epstein et al., 1987) un gen que codifica per una proteïna involucrada en els processos d'oxidació cel·lular. Els ratolins tenen anomalies en la llengua, en les unions neuromusculars, inducció de l'apoptosi en el timus i en el cervell, presenten deficiències en l'aprenentatge espacial i la potenciació a llarg termini (LTP) és defectuosa.
- El transgènic de *S100b* demostra que aquest gen està involucrat en el desenvolupament de l'astrocitosi (Reeves et al., 1994).
- El transgènic de *ETS2* (Sumarsono et al., 1996), presenta anomalies neurocranials, viscerocranials, cervicals i esquelètiques, amb una gran similitud amb les que presenten els trisòmics murins i els individus amb SD que sobre-expressen aquest gen. *ETS2* codifica un factor de transcripció que

s'expressa en diferents teixits, sobretot durant les etapes de desenvolupament.

- El transgènic pel gen fosfofructoquinasa (*PFK*) (Elson et al., 1994) té la glicòlisi hepàtica alterada.

També s'han generat transgènics amb regions genòmiques grans, com per exemple les que contenen els YACs (Smith et al. 1995). Aquest sistema té l'avantatge d'introduir totes les regions pròpies del gen, tant les codificants com les no codificants, però té l'inconvenient tècnic que els fragments grans es trenquen més fàcilment. Un dels transgènics generat amb un YAC de 180 kb, que contenia el gen *DYRK1A* (*minibrain*), presentava problemes d'aprenentatge (Smith et al. 1997).

Actualment s'està treballant molt en aquest camp i la generació d'animals transgènics dels gens que es vagin caracteritzant ajudarà a delimitar el paper de cada gen individual als diferents aspectes del fenotip.

3.4.6.- Knockouts i transgenòmics

També s'està treballant en la generació de ratolins que tenen un gen concret alterat, donant lloc a la no funció d'aquest. Aquests models s'anomenen *knockout*.

Si s'aconsegueixen generar múltiples knockouts (disrupció simultània de diferents gens del MMU16), i es creuen amb ratolins parcialment trisòmics o transgènics, es pot avaluar si la progènie reverteix part del fenotip fins a la normalitat.

4.- CANALS IÒNICS

Els canals iònics funcionen en tots els tipus cel·lulars controlant el flux d'ions cap a dintre i cap a fora de la cèl·lula, en resposta als canvis que tenen lloc en l'entorn fisiològic cel·lular. Segons al tipus de senyal al que responen, els canals iònics es poden classificar en canals dependents de lligand i canals dependents de voltatge. Els primers són activats per la unió de neurotransmissors, hormones o altres molècules actives i són de gran importància en les cèl·lules musculars i en les regions post-sinàptiques de les neurones (Gasic i Heinemann, 1991; Unwin, 1993). L'activitat dels canals dependents de voltatge es regula per canvis en la polaritat de la membrana i són responsables de la generació de senyals elèctrics en les membranes cel·lulars.

La importància dels canals iònics queda reflectida en el gran nombre de malalties hereditàries associades a mutacions en diferents subunitats formadores de canal (taula 7).

Tots els canals de potassi (K^+) tenen unes característiques de permeabilitat a ions similars, $K^+ \approx Rb^+ > Cs^+$, amb permeabilitats per a Na^+ i Li^+ indetectables. Aquesta selectivitat pel potassi K^+ depèn de la presència d'un element estructural denominat domini P o formador del porus (Doyle et al., 1998), molt conservat entre les quatre classes estructurals de subunitats de canals de K^+ , incloent les subunitats amb vuit dominis transmembrana i dos dominis P (Ketchum et al., 1995), les subunitats amb sis dominis transmembrana i un domini P similars a la proteïna *shaker* de *Drosophila* (Deal et al., 1996), les subunitats amb quatre dominis transmembrana i dos dominis P (Lesage et al., 1996 a; b) i les subunitats amb dos dominis transmembrana formadores dels canals Kir de rectificació interior (de l'anglès *inwardly rectifying*) (Reiman i Ashcroft, 1999) (Fig. 4).

	HOME	RATOLÍ
CANALS DE K⁺		
Tipus <i>shaker</i>		
KCNA1/Kcna1	Atàxia episòdica	
KCNC1/Kcnc1		Mutació: resposta d'alarma i coordinació motora anòmales
KVLQT/Kvlqt	Síndrome QT llarg 1. Síndrome Jervell and Lange-Nielsen	
Tipus <i>eag</i>		
HERG/Herg	Síndrome QT llarg 2	
INWARD RECTIFIERS		
KCNJ1/Kcnj1	Síndrome de Bartter	
KCNJ6/Kcnj6		Weaver
CANALS DE Na⁺		
SCN4A/Scn4a	Paràlisi periòdica hipercalèmica. Miotonia permanent, fluctuant i activada per K ⁺ . Paramiotonia congènita	
SCN5A/Scn5a	Síndrome QT llarg 3	
SCN8a/Scn8a		Malaltia disc motor. Tremolor
CANALS DE Ca⁺		
Subunitats α		
CACNL1A3/ Cacn1as	Paràlisi periòdica hipercalèmica. Susceptibilitat hipertèrmica maligna	Disgènesi muscular
CACNL1A4/ Cchl1a4	Atàxia episòdica. Atàxia espinocerebelar. Migranya hemiplègica familiar.	Trontolleig
Subunitats β		
CACNB1/Cacnb1		Mutació: Asfíxia. Mort prematura
CACNB4/Cacnb4		Letàrgia

Taula 7. Taula resum de les malalties associades a canals iònics en l'home i en el ratolí (segons Doyle i Stubbs, 1998).

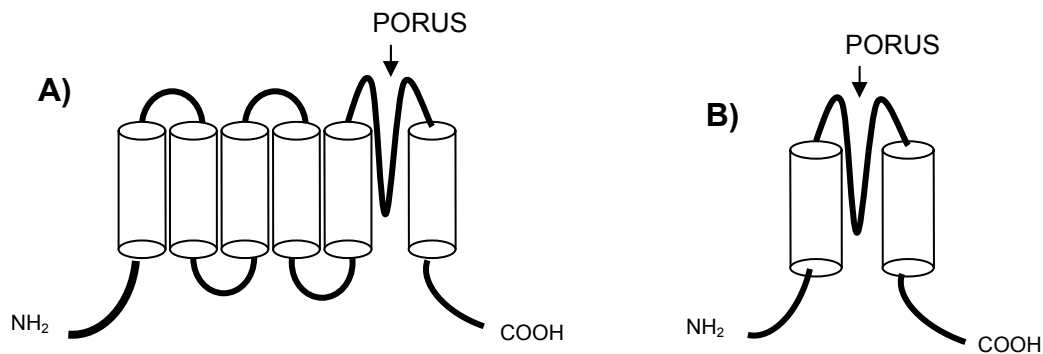


Figura 4. Estructura dels canals de K⁺. A) Canal voltatge-dependent tipus *shaker*. B) Canal del tipus de rectificació interior.

4.1.- CANALS DE POTASSI DEPENDENTS DE VOLTATGE

Les subunitats α (conductores) dels canals dependents de voltatge de Na⁺, K⁺ i Ca⁺ són membres d'una superfamília de proteïnes similars a nivell de seqüència, estructura i funcions bàsiques, però que presenten una conductància iònica molt selectiva i eficient i unes propietats farmacològiques i de regulació diferents (Catterall, 1995). Els canals dependents de voltatge poden existir en tres estats funcionalment diferents: repòs, activats i inactivats. Els canals en estat de repòs i inactivats no condueixen ions, però aquests últims són refractaris a l'activació si no retornen a un estat de repòs per repolarització de la membrana.

Les subunitats α dels canals de K⁺ dependents de voltatge es classifiquen en tres grans grups (Pongs, 1999): a) els semblants a *shaker* de *Drosophila*, b) els relacionats amb *ether-a-go-go*, també de *Drosophila* (tipus EAG) amb vuit membres. Les subunitats tipus *shaker* es classifiquen en quatre subclasses dependent de la seva similitud als diferents tipus de *shaker* de *Drosophila*: *shaker*, *shab*, *shaw* i *shal*. Així, s'han caracteritzat vuit gens relacionats amb *shaker* (KCNA1→KCNA8), tres relacionats amb *shab* (KCNB1→KCNB3), quatre relacionats amb *shaw* (KCNC1→KCNC4) i tres relacionats amb *shal* (KCND1→KCND3). I c) la subfamília KCNQ, amb cinc membres. Tots contenen

sis segments transmembrana hidrofòbics envoltant el domini P (Fig. 4), però els tipus EAG es caracteritzen per la presència en l'extrem C-terminal de dominis d'unió a nucleòtids cíclics.

Els canals actius de K^+ es formen quan quatre subunitats α s'agreguen formant estructures homo o heteromèriques. L'activitat d'aquestes estructures pot ser modificada per subunitats auxiliars (β, γ i/o δ). Les més ben caracteritzades són les subunitats β , codificades per famílies gèniques que no estan relacionades entre si o amb la superfamília α . La unió de les subunitats β pot alterar l'amplitud del corrent, les cinètiques d'activació/inactivació o altres paràmetres.

4.2.- SÍNDROME QT LLARG (LQT)

El cor humà adult es contrau de forma rítmica unes 72 vegades per minut, en condicions normals. Aquest òrgan té un sistema especial per generar rítmicament impulsos que produeixin la contracció periòdica del múscul cardíac i per conduir aquests impulsos a tot el cor. Quan aquest sistema funciona normalment, les aurícules es contrauen un sisè de segon abans que els ventricles, fet que permet que els ventricles s'omplin abans d'impulsar la sang cap als pulmons i la circulació perifèrica. Un altre fet important és que totes les parts dels ventricles es contrauen quasi simultàniament, ja que d'aquesta manera es pot generar una pressió eficaç en les cavitats ventriculars.

La contracció rítmica automàtica del cor és possible gràcies a que la majoria de fibres cardíques són autoexcitables, especialment les del nodus sinoauricular (S-A) (petita cinta aplanada i elipsoidal que es troba en la paret anterosuperior de l'aurícula dreta), que en excitar-se transmeten el potencial d'acció a les fibres auriculars, controlant el ritme cardíac.

En el múscul cardíac trobem tres tipus de canals iònics que són els responsables dels canvis de voltatge del potencial d'acció: a) canals ràpids de Na^+ , b) canals lents de Ca^+ i de Na^+ i c) canals de K^+ . L'obertura dels canals ràpids de Na^+ durant

alguns 10^{-6} s és la causa de l'inici ràpid del potencial d'acció (en forma d'espiga) que s'observa en el múscul ventricular, produït per l'entrada ràpida d'ions positius en l'interior de les fibres. A continuació es produeix el planell del potencial d'acció ventricular, degut a l'obertura dels canals lents de Ca^+ i de Na^+ , que dura unes dècimes de segon. Finalment, l'obertura dels canals de K^+ i la difusió de grans quantitats d'ions K^+ cap a l'exterior de la fibra tornen el potencial de membrana al seu estat de repòs.

El potencial de repòs de les fibres S-A és entre -55 i -60 mV, mentre que per les fibres ventriculars és de -85 a -90 mV. A nivells de -55 i -60 mV, els canals ràpids de Na^+ s'han inactivat, el que significa que s'han quedat bloquejats, per tant només poden obrir-se els canals lents de Ca^+ i de Na^+ i provocar el potencial d'acció. Per aquest motiu, el potencial d'acció auricular és més lent que el ventricular i a més a més es recupera amb una disminució lenta del potencial d'acció, enlloc de fer-ho ràpidament com ho fa en els ventricles.

Un electrocardiograma normal està format per una ona P, un complex QRS (que inclou tres ones separades la Q la R i la S) i una ona T (Fig. 5). L'ona P depèn dels corrents elèctrics generats quan les aurícules es despolaritzen abans de la contracció. El Complex QRS es produeix per les corrents produïdes quan els ventricles es despolaritzen abans de contraure's. L'ona T està causada per corrents produïdes quan els ventricles es recuperen de l'estat de despolarització. L'interval QT, és per tant una mesura de la repolarització ventricular i acostuma a durar 0.40 s.

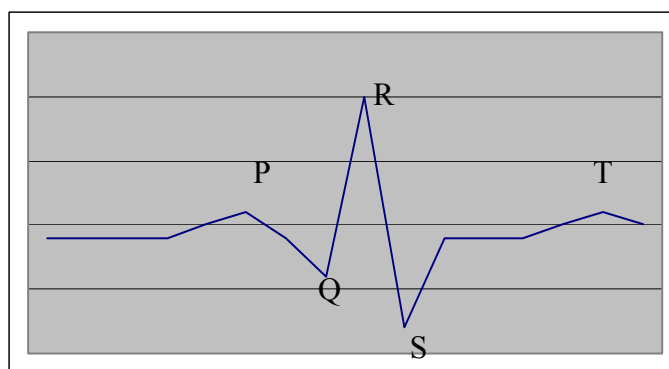


Figura 5. Electrocardiograma normal, on s'assenyalen les diferents ones, P, Q, R S i T.

La síndrome LQT es caracteritza per anomalies electrocardiogràfiques que inclouen un interval QT prolongat, degut a una repolarització tardana del potencial d'acció cardíaca. Encara que el fenotip clínic és variable, fins i tot entre els membres d'una mateixa família, els individus afectes tenen una major predisposició a patir sincopes, *torsade de pointes* i fibril·lació ventricular responsable en alguns casos de mort sobtada. Aquests es poden dividir en dos tipus majoritaris, familiars i adquirits, essent aquest tipus el més freqüent.

Existeixen dos tipus de LQT familiar; el LQT autosòmic dominant conegut com la síndrome de Romano-Ward (RW) (OMIM 192500) (Romano et al., 1963; Ward, 1964) i el LQT autosòmic recessiu anomenat síndrome de Jervell i Lange-Nielsen (JLN) (OMIM 220400) (Jervell i Lange-Nielsen, 1957). La síndrome RW té una prevalença de $1.6-6 \times 10^{-6}$, mentre que la síndrome JLN té una prevalença de $0.1-6.6 \times 10^{-5}$ i a més a més dels problemes cardíacs està associat a sordesa.

4.2.1.- Mapatge dels gens responsables de LQT

En els últims anys s'han mapat diferents loci per les formes familiars de LQT: LQT1 a 11q15.5 (Keating et al., 1991), LQT2 a 7q35-q36 (Jiang et al., 1994), LQT3 a 3p21-p24 (Keating et al., 1991; Jiang et al., 1994). Un quart locus, LQT4, es va mapar a 4q25-q27 (Schott et al., 1995) i un cinquè LQT5 a 21q22.1-22.2 (Schulze-Bahr et al., 1997a,b; Splawski et al., 1997).

Posteriorment es van identificar els gens corresponents a cada locus, excepte per LQT4 que encara no ha estat identificat. Mutacions a *KCNQ1* són responsables de LQT1 (Wang et al., 1996; Neyroud et al., 1997), en *KCNH2* o *HERG* de LQT2 (Curran et al., 1995; Tanaka et al., 1997), en el canal de sodi *SCN5A* de LQT3 (Wang et al., 1995) i en la subunitat β *KCNE1* de LQT5 (Schulze-Bahr et al., 1997a; Splawski et al., 1997).

KCNQ1, *HERG*, *KCNE1* codifiquen per subunitats de canals de K^+ expressats majoritàriament en el cor i són els responsables del corrent rectificador de K^+

d'activació lenta, I_{ks} (de l'anglès *slowly activating delayed rectifier K⁺ current*) i del corrent rectificador de K^+ d'activació ràpida, I_{kr} (de l'anglès *rapidly activating delayed rectifier K⁺ current*) (Fig. 6).

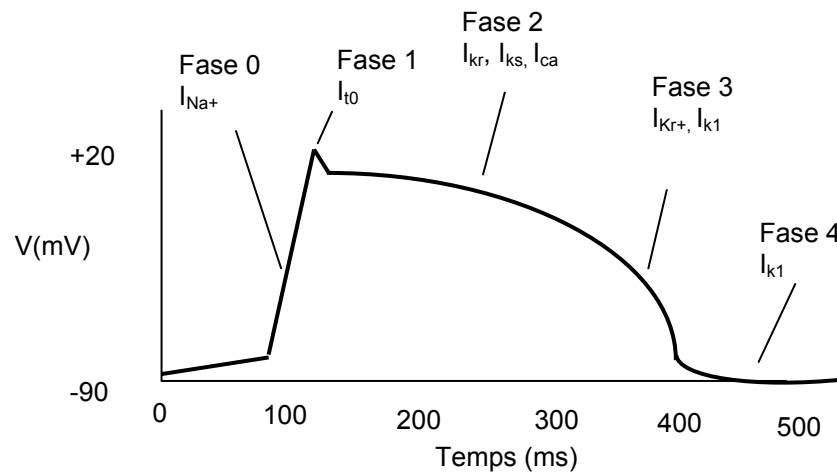


Figura 6. Relació entre el potencial d'acció cardíac i les corrents iòniques elèctriques I_{Na^+} , I_{kr} , I_{k1} , I_{t0} , per les quals han estat identificats els gens responsables (*SCN5A*, *KCNA4*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNH2*, *KCNQ1*, *RyR2*). Un potencial d'acció correspon a un batec cardíac i es pot dividir en cinc fases. La fase 0 correspon a una ràpida despolarització. La fase 1 a una repolarització ràpida seguida del pic. La fase 2 al planell. La fase 3 a una repolarització ràpida i finalment la fase 4 és el període entre el màxim negatiu i la pujada del següent potencial d'acció i representa la relaxació venricular. I_{Na^+} : corrent de sodi voltatge dependent, I_{t0} : corrent de potassi transitòria exterior, I_{ca} : corrent lent de calci interior, I_{ks} : corrent de potassi d'activació lenta, I_{kr} : corrent de potassi d'activació ràpida, I_{k1} : corrent de potassi rectificador interior.

Un ampli estudi portat a terme per Zareba en el 1998 (Zareba et al., 1998), va determinar la influència del genotip en el fenotip del LQT. 112 pacients tenien mutacions en el locus LQT1, 72 en el LQT2, i 62 en el LQT3. La freqüència d'accidents cardíacs (síncopes, aturades cardíques o mort sobtada) era més alta en els pacients amb mutacions en LQT1 (63%), seguit del LQT2 (46%) i del LQT3 (18%). La mortalitat acumulativa a partir dels 40 anys era la mateixa en els tres grups de famílies estudiades. No obstant, la probabilitat de mort durant un accident cardíac era significativament major en les famílies LQT3 (20%) respecte a les famílies amb mutacions en LQT1 (4%) o LQT2 (4%).

4.3.- SUBUNITATS α TIPUS KvLQT (KCNQ)

4.3.1.- KCNQ1

KCNQ1, també anomenat KvLQT, és una proteïna de 581 aminoàcids, amb 6 segments transmembrana. El gen que codifica per KvLQT, *KCNQ1*, té 16 exons i s'estén unes 400 kb en el cromosoma 11p15.5 (Splawski et al., 1998). El seu patró d'expressió en humans és molt ampli, doncs s'expressa en cor, ronyó, pulmó, placenta i pàncrees, però no en múscul esquelètic, fetge o cervell (Chouabe et al., 1997; dades d'aquesta tesi).

KCNQ1 té una signatura de por K^+ -selectiu altament conservada. Estudis electrofisiològics en sistemes d'expressió heteròlegs, confirmen que es tracta d'un canal de K^+ voltatge-depenent que quan s'expressa només és responsable d'un corrent ràpid de rectificació posterior tipus K_v (de l'anglès *delayed rectifying*) d'amplitud petita (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996).

S'han trobat mutacions a *KCNQ1* en famílies amb LQT (Wang et al., 1996; Russell et al. 1996; Tanaka et al., 1997), establint que *KCNQ1* és el responsable de LQT1 (Splawski et al., 1998). Les mutacions de *KCNQ1* associades a LQT, actuen de forma dominant-negatiu, és a dir la forma mutada interfereix en la funció de la forma normal. La mutació més freqüent és A212V, considerant-la un *hot spot* (Wang et al., 1996; Russell et al. 1997; Tanaka et al., 1997). Mutacions en heterozigosi de *KCNQ1*, són la causa de la síndrome RW (Wang et al., 1996), mentre que en homozigosi causen la síndrome JLN (Splawski et al., 1997; Duggal et al., 1998).

Els ratolins knockouts per *Kcnq1* són sords i tenen un fenotip *shaker/waltzer* i ones T i P anòmales (Casimiro et al., 2001).

4.3.2.- KCNQ2

Aquesta proteïna de 841 aminoàcids, està codificada pel gen *KCNQ2*, que mapa al cromosoma 20, a la regió 20q13.3 (Wang et al., 1998). Existeixen algunes variants d'splicing amb insercions de 12 aa (Iannotti et al., 1998) o de 30 aa (Singh et al., 1998). S'expressa majoritàriament a cervell (Wang et al., 1998).

Pot formar heterodímers funcionals amb *KCNQ3* però no amb *KCNQ1* (Wang et al., 1998). Juntament amb *KCNQ3* és el responsable de la corrent M, un corrent de K^+ d'activació/inactivació lenta que és clau en la determinació del llindar d'excitabilitat elèctrica en neurones (Wang i McKinnon, 1998).

Mutacions en el gen *KCNQ2*, estan relacionades amb formes d'epilèpsia idiopàtica (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998). L'eliminació del gen *Kcnq2* de ratolí resulta en un fenotip embrionari letal (Watanabe et al., 2000).

4.3.3.- KCNQ3

Proteïna de 872 aminoàcids, codificada pel gen *KCNQ3*, que mapa en el cromosoma 8, en la regió 8q23-q24 (Schroeder et al., 1998). S'expressa majoritàriament a cervell. S'han descrit algunes variants d'splice, donant lloc a insercions o delecions en fase (Biervert et al., 1998). Pot formar heterodímers funcionals amb *KCNQ2* i *KCNQ4*.

Mutacions en el gen *KCNQ3*, estan relacionades amb una forma hereditària d'epilèpsia idiopàtica (Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Schroeder et al., 1998).

4.3.4.- KCNQ4

És una proteïna codificada pel gen *KCNQ4*, que mapa en el locus de *DFNA2* a

1p34 (Kubisch et al., 1999). El cDNA codifica per una proteïna de 695 aa i existeixen variants d'splice amb una deleció de 54 aa (Kubisch et al., 1999). Presenta llocs potencialment fosforilables per la proteïna quinasa C. Al contrari que KCNQ1 i KCNQ2, KCNQ4 no presenta la seqüència consens de fosforilació dependent de cAMP. Pot formar heterodímers funcionals amb KCNQ3, però no amb KCNQ1 o KCNQ2. Heterodímers KCNQ4/KCNQ3 poden ser responsables del corrent M (Kubisch et al., 1999).

S'expressa principalment a nuclis de les vies auditives centrals del tronc cerebelar (Kharkovets et al., 2000) i es detecta per hibridació *in situ* a les cèl·lules ciliades externes de la còclea. KCNQ4 probablement contribueix a la conductància basolateral de K^+ de les cèl·lules ciliades externes, ajudant a l'eliminació del K^+ . Una mutació de canvi de sentit (G285S) en el domini P segrega amb tots els membres d'una família afectada amb una sordesa dominant autosòmica (Kubisch et al., 1999).

4.3.5.- KCNQ5

KCNQ5 codifica per una proteïna de 897 aminoàcids, amb un pes molecular predit de 97 kDa, i mapa a la regió 6q14 (Schroeder et al., 2000a; Lerche et al., 2000).

Estudis d'expressió varen mostrar que majoritàriament s'expressava a cervell i a múscul esquelètic. A còrtex cerebral, pol occipital, lòbuls frontal i temporal, putamen i hipocamp, co-expressa amb KCNQ2 (Biervert et al., 1998) i KCNQ3 (Schroeder et al., 1998).

KCNQ5 produeix corrents que s'activen lentament en estat de despolarització que pot ser inhibit per receptors M1 i té propietats farmacològiques (Schroeder et al., 2000a; Lerche et al., 2000) que concorden amb l'esquema general dels corrents M. Així, KCNQ5 contribuiria a la diversitat molecular dels canals-M. La forma predominant en múscul esquelètic és una isoforma que conté un exó extra en l'extrem C-terminal, que li confereix característiques diferents que no recorden als

corrents M (Schroeder et al., 2000a). Pot formar canals heteromèrics amb KCNQ3, però probablement no amb KCNQ1, KCNQ2 i KCNQ4 (Schroeder et al., 2000a; Lerche et al., 2000).

Existeixen loci per diverses malalties retinals que mapen a la mateixa regió que *KCNQ5*, però no ha estat publicada cap mutació en cap d'elles.

4.3.6.- KCNH2 (HERG)

Està codificada pel gen *HERG* (Warmke i Ganetzky, 1994), que mapa a la regió 7q35-36 (Curran et al., 1995). Aquest gen és l'homòleg del gen *ether-a-go-go* de *D. melanogaster*. Codifica per una proteïna de 1159 aa. L'estructura genòmica ocupa 55 Kb, i està organitzada en 16 exons (Itoh et al., 1998; Splawski et al., 1998). S'ha descrit que s'expressa majoritàriament a cor i a pulmó (Curran et al., 1995).

La proteïna té una estructura que recorda la família dels canals de K^+ activats per despolarització, doncs té 6 putatius segments transmembrana, malgrat això, actua com si fos un canal de K^+ de rectificació interior, família de canals d'estructura molecular molt diferent, doncs només tenen dos segments transmembrana. La presència d'un domini d'unió a nucleòtids cíclics suggereix la possible unió entre activitat nerviosa autònoma alterada i arítmies en LQT2 (Curran et al., 1995).

És la responsable d'un corrent I_{kr} , quan forma un complex estable amb KCNE1 (Sanguinetti et al., 1995). L'obertura característica d'aquest canal suggereix que aquest canal podria tenir un paper específic en la supressió normal de les arítmies (Smith et al., 1996). També es pensa que la supressió dels batecs extrems, podria explicar l'augment de la incidència de la mort sobtada en pacients que no tenen el corrent produït per HERG, tant perquè són portadors d'un defecte congènit (LQT2) o bé perquè han estat tractats amb antiarítmics de classe III, que bloquegen els canals HERG.

Les mutacions que s'han trobat en pacients LQT2 (Curran et al., 1995; Satler et al., 1996; 1998) inclouen tant canvis d'aminoàcids, com de llocs d'*splice*, delecions intragèniques en pauta com canvis de pauta de lectura provocant un codó de terminació, que resulten en proteïnes que són retingudes de forma anòmala en el reticle endoplasmàtic, proteïnes sense activitat electrofisiològica o proteïnes que responen de forma anòmala a l'activació (Zhou et al., 1998). És possible que moltes d'aquestes mutacions tinguin un efecte dominant negatiu sobre la funció del canal.

4.4.- SUBUNITATS β

En el moment d'inici d'aquest estudi, només la subunitat β Isk (també anomenada Mink) havia estat caracteritzada.

4.4.1.- KCNE1

El gen *KCNE1* que mapa en el locus 21q22.1-q22.2 (McPherson et al., 1991; Chevillard et al., 1993), codifica per una proteïna de 129 aminoàcids. L'anàlisi de la seva seqüència indica que es tracta d'una proteïna transmembrana amb un únic segment i un extrem C-terminal intracel·lular. L'extrem N-terminal, extracel·lular, està glicosilat en asparagines (Murai et al., 1989). Aquesta proteïna se la coneix també amb altres noms, com Mink (de l'anglès *minimal potassium ion channel*) o bé Isk que fa referència al tipus de corrent que produeix.

L'expressió d'Isk no indueix cap tipus de corrent en diferents tipus cel·lulars (Lesage et al., 1993), no obstant estudis de cotransfecció de KCNQ1 i KCNE1, van demostrar que aquestes dues proteïnes s'ajuntaven per formar el canal cardíac I_{Ks} (Sanguinetti et al., 1996). Més endavant, estudis electrofisiològics efectuats amb cèl·lules COS expressant KCNQ1 de ratolí, van demostrar que KCNQ1 forma el canal responsable del corrent I_{Ks} cardíac, però que es requereix la presència de KCNE1 per la formació del canal regulable (Barhanin et al., 1996).

KCNE1 també pot interaccionar amb HERG, formant complexos estables responsables del corrent cardíac I_{Kr} (McDonald et al., 1997). No s'ha detectat interacció funcional amb KCNQ2 ni KCNQ3 (Yang et al., 1998) o KCNQ4 (Kubisch et al., 1999). No obstant, la co-expressió de KCNE1 amb heterodímers KCNQ2+KCNQ3 atenua de forma significativa l'amplitud del corrent i disminueix la cinètica de resposta, que podria relacionar KCNE1 amb alteracions en l'excitabilitat neuronal (Yang et al., 1998).

KCNE1, a través de la formació de complexos heteromèrics, tant amb KCNQ1 com amb HERG, és l'element central en el control del ritme cardíac i de la seva velocitat.

S'han trobat mutacions en homozigosi a *KCNE1* en pacients amb la síndrome de JLN el fenotip dels quals era indistingible dels que tenien mutacions en el gen *KCNQ1* (Tyson et al., 1997). Altres estudis han trobat mutacions en aquest gen, excloent-ne els loci LQT1, LQT2 i LQT3 (Schulze-Bahr et al., 1997), i referint-se a *KCNE1* com a locus LQT5 (Bianchi et al., 1999). Els autors van concloure que KCNE1 és un cofactor en l'expressió tant del corrent I_{Ks} com del corrent I_{Kr} i que les manifestacions clíniques de LQT5 podrien complicar-se pels diferents efectes de les mutacions de *KCNE1* a *KCNQ1* o *HERG*.

Per estudiar amb més profunditat el paper *in vivo* de *Kcne1*, en els diferents teixits, Vetter i col·laboradors (Vetter et al., 1996) van generar una línia de ratolins amb tota la regió codificant de *Kcne1* delecionada.

Les cries de ratolí amb un o dos al·lels nuls del gen *Kcne1* (*Kcne1* +/-, *Kcne1* -/- respectivament), tenen una aparença normal, no obstant els ratolins -/- no són capaços de posar-se drets, fet que desapareix quan maduren. Amb l'edat, apareixen altres dèficits locomotors com un moviment descoordinat, mostren hiperactivitat, moviments bruscos del cap i ocasionalment el cap inclinat. Els individus -/- més madurs mostren un comportament de moviments en cercles, intermitent i bidireccional, fenotip conegut com a *shaker/waltzer* (Deol, 1968), característic de ratolins amb defectes en l'oïda interna. En resum, el

comportament i el fenotip general dels ratolins *-/-* suggereixen que l'oïda interna està alterada i pot ser considerat un nou model de sordesa, no morfogenètic, doncs inicialment l'oïda interna es desenvolupa normalment, fet que no passa en altres models. Estudis patològics de l'oïda interna de pacients amb la síndrome JLN, tenen una elevada similitud amb el que s'observa en els ratolins *-/-*.

Els ratolins adults *Kcne1 -/-* mostren un fenotip cardíac molt lleuger, amb paràmetres de potencials d'acció de l'endocardi ventricular indistingibles dels ratolins normals (Charpentier et al., 1998).

L'**objectiu final** d'aquesta tesi és la identificació i caracterització de nous gens del HSA21. Per assolir aquest objectiu es van marcar uns objectius intermedis, que es detallen a continuació:

- Construcció d'un contig de cosmidis solapats dels YACs 72H9, 336G11, 238B1, 221B9 i 552A3.
- Construcció d'un mapa transcripcional dels YACs anteriors, mitjançant experiments de selecció de cDNA.
- Expansió dels cDNAs obtinguts durant la construcció del mapa transcripcional.
- Cerca *in silico* de nous gens del HSA21.
- Aïllament i caracterització dels gens trobats *in silico*.
- Estudi dels patrons d'expressió.
- Estudis funcionals dels productes proteics codificats pels gens aïllats.

1.- BIOLOGIA COMPUTACIONAL

1.1.- ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

Per a l'anàlisi de seqüències nucleotídiques s'utilitzà el programa SEQUENCHER™ 3.1 (Gene Codes Corporation), que permet alinear diferents seqüències, comparar-les i buscar la seqüència consens.

Per buscar zones codificants s'han utilitzat els programes Genscan (<http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html>), GRAIL (<http://avalon.epm.ornl.gov/Grail-bin/>), i GeneFinder (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/gene-finder/gf.html>). Les seqüències genòmiques de Genbank, AP00052 i AP00053, es van utilitzar com a seqüència problema, amb l'objectiu de trobar zones codificants. S'utilitzà un filtre per les zones repetitives. Els programes analitzen la seqüència, i mitjançant algorismes matemàtics identifiquen zones d'alta probabilitat de ser exons.

La recerca de similituds a nivell de nucleòtids i d'aminoàcid es va fer amb el conjunt de programes BLAST (Altschul et al., 1997) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), i s'han consultat a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Les seqüències genòmiques de Genbank, AP00052 i AP00053, es van utilitzar com a seqüència problema en bases de dades públiques d'ESTs, amb l'objectiu de trobar zones codificants.

L'anàlisi de la seqüència de les proteïnes putatives, es va fer amb els programes públics ScanProsite (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite>), SMART (http://coot.embl_heidelberg.de/smart), PredictProtein (http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pdh_html_predict), ExPASy (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) i TopPred2 (<http://www.biokemi.su.se/server/toppred2/toppredServer.cgi>). Els alineaments múltiples de les seqüències proteiques es va fer amb el programa CLUSTALW (http://wpbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_clustalw.html).

L'anàlisi filogenètica es va realitzar amb el mètode de la màxima parsimònia, amb el programa PROTPARS del paquet PHYLIP.

1.2.- BASES DE DADES

La base de dades pública amb un ritme de creixement més alt és la de seqüències expressades (dbEST), els ESTs. És gestionada pel Genbank, i s'ha consultat al portal <http://www.ncbi.nih.gov/dbEST>. Els ESTs són seqüències curtes, pocs centenars de nucleòtids, que deriven d'una seqüenciació parcial d'inserts seleccionats a l'atzar de genoteques de cDNA, i que per tant representen seqüències expressades.

Altres bases de dades que s'han utilitzat són genòmiques, públiques o d'algun consorci, en especial les del HSA21.

1.3.- CLONATGE *IN SILICO*

L'estratègia de clonatge *in silico* consisteix en trobar gens putatius mitjançant tècniques biocomputacionals. El primer pas és trobar la seqüència genòmica d'interès d'entre les bases de dades de nucleòtids, o de seqüència generada en el propi laboratori. Aquesta seqüència es llença contra bases de dades d'ESTs humans mitjançant programes com el BLAST-n (comparació de nucleòtids en bases de dades de nucleòtids) per identificar seqüències de DNA genòmic, representats en les diferents genoteques de cDNA de les bases de dades. Els ESTs resultants de la cerca, que presenten una elevada similitud, són els considerats per estudis posteriors.

Els criteris d'elecció d'ESTs per prosseguir l'estudi són els següents: presència d'ESTs en altres espècies (utilitzant BLAST-n) i existència de similitud a nivell d'aminoàcids amb dominis proteics coneguts o amb altres proteïnes descrites

(utilitzant BLAST-x, que tradueix la seqüència nucleotídica en les sis possibles pautes de lectura i les compara en bases de dades d'aminoàcids).

Seguidament, es passen programes de predicció de gens, de zones codificants, com són el GRAIL o el GENSCAN.

Finalment es dissenyen encebadors que seran utilitzats per clonar dirigitament el cDNA obtingut *in silico*, per RT-PCR. Els fragments amplificats s'utilitzaran com a sondes per a la recerca de cDNAs complets en llibreries de cDNAs. La proporció d'ESTs en diferents genoteques de teixits humans ajuda a escollir la genoteca sobre la que es farà el crivellatge.

2.- AÏLLAMENT D'ÀCIDS NUCLEICS

2.1.- DNA GENÒMIC

El protocol que es descriu a continuació, s'ha utilitzat per extreure DNA genòmic de sang humana.

1. Es renta la sang total amb sèrum fisiològic (Braun-Palex) i se centrifuga durant 5-10 min a 4°C a 7-8 g, sense fre. Totes les centrifugacions del protocol es realitzaran en aquestes mateixes condicions de temperatura i sense fre. Es decanta el sobrenedant.
2. Afegir tampó de lisi d'eritròcit fins a un volum de 50 ml. Agitar suaument fins que el sediment de cèl·lules es dissolgui completament. Centrifugar 15 min a 10 g i decantar el sobrenedant. Repetir aquest pas dues vegades.
3. En aquest punt es pot congelar el pellet a -20°C o -80°C. Si es continua el processament, s'afegeix 6 ml de solució WCLB, o solució de lisi de leucòcits. Afegir 400 µl de 10% SDS i 1 ml de solució de proteïnasa K. Agitar i incubar a 37°C amb agitació contínua durant tota la nit.
4. S'afegeix 1 ml de 5.5 M NaCl. Agitar durant 15 min amb el vòrtex i centrifugar durant 15 min a 10 g.

5. Traspassar el sobrenedant a un tub estèril i centrifugar durant 15 min a 10 g.
6. Extreure amb un volum de cloroform i recuperar la fase superior.
7. Afegir 2 volums d'etanol absolut. Agitar fins que apareix la medusa de DNA, pescar-la i rentar-la per immersió en 70% etanol.
8. Assecar el DNA i resuspendre'l amb 10 mM Tris-HCl 0.2 mM EDTA. Incubar a 37°C amb agitació durant unes hores.

Tampó de lisi d'eritròcits: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂

Solució WCLB: 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5

Solució de proteïnasa K: 2 mg/ml proteïnasa K, 2 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS

2.2.- MAXIPREPARACIÓ DE DNA DE PLASMIDI

Es prepara un pre-cultiu del plasmidi d'interès, a partir d'una colònia aïllada, en 20 ml de medi LB amb l'antibiòtic necessari per mantenir la pressió selectiva. Es deixa créixer durant 6-8 hores 37°C, en agitació contínua, prèviament a re-inocular 200 ml de medi LB amb antibiòtic. El cultiu es deixa créixer a 37°C durant tota la nit, amb agitació contínua.

Per fer la maxipreparació del DNA, es van utilitzar les columnes i els reactius de Plasmid maxi Kit (QIAGEN n° cat. 12162), seguint les instruccions del fabricant.

Medi LB (Luria-Bertani): 1% (w/v) bacto-triptona, 0.5% (w/v) extracte de llevat i 0.5% (w/v) NaCl. Ajustar el pH a 7.0 amb 5N NaOH. Esterilitzar a l'autoclau.

2.3.- MINIPREPARACIÓ DE DNA DE PLASMIDI I DE COSMIDI

Es prepara un cultiu del plasmidi d'interès, a partir d'una colònia aïllada, en 5 ml de medi LB, amb antibiòtic. Es deixa créixer tota la nit a 37°C, amb agitació contínua.

1. Es recullen 1.5 ml del cultiu en un tub tipus eppendorf i se centrifuga a 10000 rpm en una microfuga durant 2 min. Es decanta el sobrenedant i es repeteix l'operació en el mateix tub.
2. Es resuspèn el pellet en 100 µl de solució 1, i es deixa 5 min a temperatura ambient.
3. Afegir 200 µl de solució 2. Invertir suaument el tub 4 o 5 vegades. Mantenir en gel durant 5 min.
4. Afegir 150 µl de 3 M d'acetat sòdic pH 4.6. Invertir suaument el tub 4 o 5 vegades. Mantenir en gel durant 5 min.
5. Centrifugar a 14000 rpm en una microfuga durant 10 min. Recollir el sobrenedant i precipitar-lo amb 2.5 volums d'etanol absolut fred, en gel o a -20°C. Centrifugar en una microfuga a 14000 rpm durant 10 min, descartar el sobrenedant i afegir 1 volum d'etanol 75% fred. Centrifugar a 14000 rpm durant 10 min. Descartar el sobrenedant i deixar assecar bé el pellet.
6. Resuspendre en 50 µl d'aigua o TE i afegir 1 µl de RNAsa A (10 mg/ml). Incubar 15 min a 65°C.
7. Purificar amb fenol: cloroform, precipitar amb etanol i resuspendre en 50 µl d'aigua o TE.

Solució 1: 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 15% (w/v) sacarosa.

Solució 2: 0.2 N NaOH, 1% SDS.

Solució TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA pH 8.0

2.4.- EXTRACCIÓ DE DNA DE LLEVATS

Per tal d'evitar que el DNA d'alt pes molecular, es trenqui durant la seva manipulació, el DNA s'encapsula en boletes d'agarosa. L'encapsulació en petites boletes d'agarosa, augmenta la superfície disponible i permet una difusió més ràpida dels enzims. El DNA de YACs en boletes d'agarosa, s'ha utilitzat per fer el mapa de restricció dels seus extrems, digerint el DNA amb enzims de tall poc freqüent i separant els fragments resultants en una PFGE. El mètode que s'ha utilitzat és una modificació del descrit per Overhauser i Radic (1987).

1. Es prepara un cultiu a partir d'una colònia aïllada que contingui el YAC d'interès, en 200 ml de medi AHC, i es fa créixer durant 3 dies a 30°C, fins que arriba a una OD₆₀₀=1.
2. Se sedimenten a 500 g durant 5 min i es resuspenen en 10 ml de medi SE. Repetir el pas 2 dues vegades, i acabar resuspenent en 3 ml de medi SE a 45°C.
3. Afegir 3 ml d'1% agarosa de punt de fusió baix en SE a 45°C, als 3 ml de cèl·lules i barrejar amb força.
4. Afegir 15 ml d'oli mineral a 45°C a les cèl·lules en agarosa. Barrejar-ho vigorosament fins que es formi una emulsió uniforme.
5. Abocar ràpidament l'emulsió als 70 ml de SE fred, continguts en un recipient de 500 ml amb un agitador magnètic i en gel. Agitar 2-4 min.
6. Centrifugar a 500 g durant 10 min. Treure el màxim oli possible (fase superior) i resuspendre les boletes d'agarosa, pipetejant vigorosament, amb una pipeta pasteur de plàstic i tornar a centrifugar descartant el sobrenedant.
7. Afegir 0.5 ml de β-mercaptoetanol i 5 mg de líticaasa. Ajustar el volum a 10 ml amb SE i dispersar les boletes i incubar 2 h a 37°C.
8. Centrifugar a 500 g durant 5 min i resuspendre en 20 ml de 1% sarcosil, 25 mM EDTA i 50 µg/ml proteïnasa K.
9. Incubar durant 2 dies a 50°C. Alternativament es pot incubar o/n però llavors afegim 1 µl PMSF/ml a la solució de boletes, preparat fresc a una concentració de 100 mM en isopropanol.

10. Centrifugar a 500 g durant 5 min i descartar el sobrenedant. Dispersar les boletes en 20 ml de TE/0.1 mM PMSF.
11. Centrifugar a 500 g durant 5 min, descartar el sobrenedant, rentar amb TE. Repetir el procés dues vegades.
12. Aproximadament s'obtenen 10 ml de boletes. Guardar a 4°C.

Medi AHC: 0.17% (w/v) base nitrogenada de llevat sense aminoàcids i sense $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% (w/v) caseïna hidrolitzada sense vitamines i sense sals, 2% (w/v) hemisulfat d'adenina. Ajustar a pH 5.8. Autoclavar. Quan està a temperatura ambient, s'afegeix 50 ml de 40% glucosa estèril.

Medi AHC-Agar: afegir al medi AHC 20 g/l d'agar.

Medi SE: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0.

2.5.- EXTRACCIÓ DE RNA

L'extracció de RNA es va efectuar a partir de cors humans de 18-22 setmanes de gestació, tant d'individus controls, avortaments espontanis no SD i sense cardiopatia coneguda, com d'individus amb SD. Els teixits varen ser obtinguts per la Dra. Coral Sanfeliu del CSIC-IDIBAPS, durant les primeres 12 h post-mortem, segons el protocol ètic de la institució. En ambdós casos, per tal d'evitar variacions individuals, el RNA és una barreja de dos individus del mateix sexe.

El RNA es va obtenir utilitzant el RNeasy midi Kit (QIAGEN nº cat. 75144) seguint les indicacions del fabricant i partint de 3 g de teixit. Amb aquest procediment recuperem fins a 200 µg de RNA total.

3.- ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS

3.1.- ANÀLISI DE DNA EN GELS D'AGAROSA

L'electroforesi de gels d'agarosa s'utilitza per separar fragments de DNA segons el seu pes molecular. La distància migrada en el gel varia inversament al logaritme del pes molecular. La mida dels fragments es pot determinar calibrant el gel, utilitzant estàndards de pesos coneguts, i comparant les distàncies del fragment de pes desconegut. Aquesta tècnica es pot utilitzar per separar DNAs complexes per un posterior anàlisi de Southern blot, o simplement per visualitzar productes de digestions o de PCR.

La concentració del gel es pot variar segons el pes dels fragments esperats. Per pesos petits (200-500 pb) es poden utilitzar concentracions d'agarosa del 2%, mentre que per fragments grans (4-10 kb) concentracions d'agarosa del 0.8%.

L'electroforesi es realitza en 0.5X TBE i s'aplica un camp elèctric (30-150 V). El DNA es visualitza mitjançant tinció de bromur d'etidi (5 µg/ml en aigua).

5X TBE: 450 mM Tris base, 360 mM àcid bòric, 10 mM EDTA . Ajustar a pH 8.3 amb àcid acètic.

3.2.- SOUTHERN BLOT

El DNA digerit amb enzims de restricció, se separa en els diferents fragments resultants de la digestió, en gels d'agarosa de percentatge depenent de la mida dels fragments a separar. La transferència del DNA del gel d'agarosa a filtres de niló es fa d'acord amb la tècnica descrita per Southern (Southern, 1975).

3.2.1.- Digestió del DNA i electroforesi

1. Digestió del DNA segons les condicions de l'enzim de restricció utilitzat. Per DNA genòmic, s'ha utilitzat 10 µg.
2. El producte de la digestió se separa en gels d'agarosa al 0.8% amb 0.5X TBE a 30 V durant tota la nit i es visualitza mitjançant tinció de bromur d'etidi.

3.2.2.- Transferència

1. Tractar el gel amb 0.2 N HCl per despurinitzar el DNA, durant 20 min a temperatura ambient en agitació suau. Rentar el gel amb aigua, per evitar precipitacions de sals en el tractament posterior.
2. Tractar el gel amb 0.4 N NaOH durant 30 min, en agitació suau, per desnaturalitzar el DNA.
3. Per a la transferència es prepara una safata amb 0.4 N NaOH, amb un vidre a sobre cobert amb un paper Whatman 3MM que toqui el NaOH. Es posa el gel, tenint en compte l'orientació, la membrana (Hybond-N, Amersham nº cat. RPN 203N), i 6 trossos de paper Whatman 3MM, 3 d'ells mullats amb 0.4 N NaOH, de la mida del gel i del filtre. Finalment s'acaba amb uns 10 cm de cel·lulosa, per afavorir la capilaritat. Amb plàstic es tapa tot el paper Whatman de la base, perquè no s'assequi, i la transferència sigui uniforme.
4. Deixar transferir durant tota la nit amb aproximadament 0.5 kg de pes sobre la cel·lulosa.
5. Es recupera la membrana, es marca (tant per saber l'orientació, com per tenir punts de referència) i es renta amb 2X SSC, per treure l'excés de sals i possibles trossos d'agarosa. Es deixa assecar a sobre de paper Whatman 3MM i el DNA es fixa a 80°C durant 2 h.

10X SSC: 1.5 M NaCl, 0.15 M citrat sòdic. Ajustar a pH 7.0 amb HCl.

3.2.3.- Hibridació

1. Les membranes mullades amb 2X SSC s'enrotllen de manera que no quedin bombolles que puguin interferir amb la hibridació i es posen dins de tubs d'hibridació.
2. Es pre-hibriden durant com a mínim 2 h amb tampó fosfat-SDS, a 65°C, amb rotació contínua per evitar que els filtres s'assequin i perquè la hibridació sigui homogènia.
3. Les hibridacions es varen fer en tampó fosfat-SDS, a 65°C durant 16 h, amb rotació contínua, i contenint 100 µg/ml d'esperma de salmó denaturat i la sonda marcada i purificada en columnes de Sephadex-G50, a una concentració de 10⁶ cpm/ml de tampó.
4. Els filtres es renten durant 20 min a temperatura ambient amb 2X SSC, 0.1% SDS. Repetir el rentat uns altres 20 min. Amb la segona solució de rentat a 0.2X SSC i 0.1% SDS es renten durant 20 min a 65°C. Repetir el rentat.
5. Els filtres es posen entre plàstic en un xassís amb pantalles intensificadores, i es deixen exposar amb films AGFA RP2, a -80°C.

Tampó fosfat-SDS: 7% SDS, 0.5 M Tampó fosfat pH 6.8.

3.3.- NORTHERN BLOT

Aquesta tècnica ens permet transferir RNA d'un gel d'agarosa a una membrana.

3.3.1 Gels d'agarosa desnaturalitzants

1. S'utilitzaren gels d'agarosa que contenien 2.2 M formaldehid final. Per preparar un gel del 1.2% d'agarosa, per un volum de 200 ml, s'agafen 2.4 g d'agarosa, 20 ml de tampó 10X FA, s'afegeix aigua fins a un volum de 140 ml, i es fa bullir. Es deixa temperar, i hi afegim 36 ml de 37% formaldehid (12.3 M). Es barreja i es tira en el portagels.

2. Per la preparació de les mostres s'agafen entre 15 i 30 μg de RNA i s'assequen les mostres a l'speed-vac. El RNA sec es resuspèn amb 4.5 μl d'aigua DEPC, 2 μl de 10X FA, 3.5 μl 37% formaldehid i 10 μl formamida desionitzada. Les mostres es desnaturalitzen 10 min a 65°C i se sembren després d'afegir 2 μl de tampó de càrrega (2.5 $\mu\text{g/ml}$ blau de bromofenol, 0.4 g/ml sacarosa).
3. L'electroforesi es realitza durant 4 o 5 h a 60 V en 1X FA, 0.25 M formaldehid.

Solució 10X FA: 200 mM MOPS, 50 mM acetat sòdic, 10 mM EDTA. Ajustar a pH 7.0. Esterilització per filtració. Es guarda protegit de la llum a 4°C.

3.3.2.- Transferència

1. Es renta el gel amb aigua durant 20 min, canviant l'aigua un parell de vegades, per treure tot el formaldehid. El gel es tenyeix amb bromur d'etidi, es fa la foto del gel i es destenyeix amb aigua uns altres 20 min.
2. Per tal de desnaturalitzar les mostres, es manté el gel durant 30 min en una solució de 0.05 N NaOH i 0.15 M NaCl. Per transcrypt més petit de 4 kb aquest pas és opcional.
3. Seguidament es neutralitza amb una solució de 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 i 0.15 M NaCl durant 30 min.
4. Finalment s'equilibra amb 20X SSC durant 30 min.
5. Per preparar la transferència es prepara una safata amb 20X SSC, amb un vidre a sobre cobert amb un paper whatman 3MM que toqui el SSC. Es posa el gel, tenint en compte l'orientació, la membrana (Hybond-N, Amersham n° cat. RPN 203N) equilibrada en 20X SSC, i 6 trossos de paper Whatman 3MM, 3 d'ells mullats amb 20X SSC, de la mida del gel i del filtre. Finalment es posen uns 10 cm de cel·lulosa, per afavorir la capilaritat i amb plàstic es tapa tot el paper Whatman de la base, perquè no s'assequi, i la transferència sigui uniforme.
6. Deixar transferir durant tota la nit amb aproximadament 0.5 kg de pes sobre la cel·lulosa.

7. Es recupera la membrana, es marca, tant per saber l'orientació, com per tenir punts de referència i es renta amb 2X SSC, per treure l'excés de sals i possibles trossos d'agarosa. Es deixa assecar a sobre de paper Whatman 3MM i el RNA es fixa a 80°C durant 2 h.

3.3.3.- Hibridació

Les hibridacions es varen fer en 50% formamida, 6X SSC, 5% dextrà sulfat, 1% SDS, 5X solució Denhardtts i 20 µg/ml DNA d'esperma de salmó.

1. Pre-hibridar durant unes 2 h a 42°C amb rotació.
2. Hibridar tota la nit a 42°C amb rotació, amb la sonda desnaturalitzada i a una concentració de $1-2 \times 10^6$ cpm/ml de tampó.
3. Els rentats es van fer amb un volum de 300-400 ml en les següents solucions: 2X SSC, 0.1% SDS, a temperatura ambient, durant 30 min, canviant el medi als 15 min; 0.2X SSC, 0.1% SDS, a temperatura ambient, durant 30 min, canviant el medi als 15 min; 0.2X SSC, 0.1% SDS, a 42°C durant 30 min, canviant el medi als 15 min.

3.3.4.- Northern blot comercial i MTE array

Es van comprar Northern blots que contenien RNA poliA⁺ de diferents teixits humans (Clontech n° cat. 7760-1 i 7760-2).

Aquests Northern es van hibridar, rentar i exposar, segons les indicacions del fabricant, utilitzant el tampó ExpressHybTM Hybridization solution (Clontech n° cat. S0910) que recomana el protocol, a 65°C durant 2 h. Els rentats més astringents es van fer a 65°C a 2X SSC durant 30 min.

Per determinar el patró d'expressió es va utilitzar el Multiple Tissue Expression ARRAY (Clontech n° cat. 7775-1), amb les mateixes condicions d'hibridació que

els Northern Blots. Aquestes membranes contenen RNA poliA⁺ de 72 teixits humans diferents, normalitzats per diferents RNAs controls.

4.- CRIVELLATGE DE LLIBRERIES

4.1.- PREPARACIÓ DE LES CÈL·LULES

Es fa créixer un cultiu de 20 ml durant 16 hores, amb medi LB, 0.2 % maltosa i 10 mM MgSO₄, a 37°C amb agitació, a partir d'una colònia aïllada.

Les genoteques que s'han utilitzat i les soques d'*Escherichia coli* que infecten queden reflectides en la taula següent.

HOSTE	FAG
C600hfi	λgt10
Y1090	λgt11
XL1Blue	λZAP ⁺

Les cèl·lules es recullen per centrifugació a 500 g a temperatura ambient i es resuspenen amb 1/5 del volum de 10 mM MgSO₄. Les cèl·lules preparades d'aquesta manera són viables durant uns quants dies.

Plaques de LB-agar: 15 g/l bacto-agar en LB.

Top-agarosa: 0.8% agarosa en LB.

SM: 0.1 M NaCl, 17 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% gelatina

4.2.- TITULACIÓ DE LA GENOTECA

Es preparen dilucions seriadades dels fags en SM (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}), el dia abans de plaquejar, doncs és en les primeres 24 hores on es dona la baixada del títol, després es manté estable. S'infecten 300 μ l de cèl·lules amb 100 μ l de la dilució del fag a 37°C durant 20 min. Es barreja amb els 8 ml de top-agarosa temperada a 46-48°C s'agita suaument i es tira sobre del medi de les plaques (prèviament temperades a 37°C). Es deixa solidificar i es posa a 37°C cap per avall fins que les calves de lisi són prou clares. Finalment es compten les calves i es calcula el títol.

$$\text{pfu/ml} = \text{n}^\circ \text{ calves/ml sembrats} \cdot \text{factor dilució} \cdot 10^3 \mu\text{l/ml}$$

4.3.- PLAQUEIG DE LA GENOTECA

Es plaquegen al voltant de 5×10^6 fags, repartits en 10 plaques de petri de 150 mm de diàmetre.

Es preparen 10 tubs amb 10 ml de top-agarosa, i s'es tempera a 46-48°C. En un tub es posen 3 ml de cèl·lules i la quantitat de genoteca necessària per obtenir el títol desitjat. S'incuba 20 min a 37°C, amb agitació suau.

S'agafen 300 μ l de la infecció i es posen en el tub on hi ha la top-agarosa. S'agita ràpidament i es posa a sobre del medi de les plaques. Es deixa solidificar. Quan ja està sòlid (pocs minuts), es posen al forn de 37°C, de cap per avall, fins que les calves de lisi siguin d'aproximadament 1.5 mm de diàmetre o no solapades.

4.4.- PREPARACIÓ DELS FILTRES

Quan la genoteca ja està preparada, es posa a 4°C durant com a mínim 2 h. Es fan dues rèpliques per tal d'evitar falsos positius. Per transferir els bacteriòfags a filtres de niló (Hybond N+, Amersham), se situa el filtre sobre el medi, procurant que no quedi cap bombolla, durant 45 segons, la primera rèplica, i 90 segons la segona. Es marca el filtre i la placa, per tal de poder-lo orientar posteriorment i es posa, amb la cara que conté els bacteriòfags cap amunt, a sobre d'un paper Whatman 3MM que té solució A durant 6 min. A continuació es posa sobre un altre paper Whatman 3MM amb solució B durant 3 min, procés que es repeteix una segona vegada. Finalment es renten els filtres amb 2X SSC, es deixen assecar i es posen a 80°C durant 2 h.

Solució A (desnaturalitzant) : 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH

Solució B (neutralitzant) : 3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl. Ajustar a pH 6.0 amb HCl.

4.5.- HIBRIDACIÓ

Les genoteques es van pre-hibridar 2 h amb tampó fosfat-SDS a 65°C i es van hibridar durant 16 hores a 65°C amb tampó fosfat-SDS amb 100 µg/ml de DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat i sonda marcada per random priming i purificada amb columnes de G-50, a una concentració de 10⁶ cpm/ml de tampó. Els rentats es van fer fins a una astringència de 0.2X SSC a 65°C. Es deixa exposar entre una setmana i deu dies a -80°C, amb pel·lícules AGFA RP2.

4.6.- AÏLLAMENT DE CLONS POSITIUS

Els bacteriòfags que donen senyal d'hibridació en les dues rèpliques, s'extreuen de la placa mitjançant una pipeta Pasteur de plàstic estèril, en condicions de màxima esterilitat, i es deixa en 1 ml de SM amb una gota de cloroform, a temperatura ambient durant 2 h, per tal de lisar les cèl·lules i permetre la difusió del bacteriòfag en el medi. Amb aquest sistema no es poden picar clons aïllats, donada la proximitat de les calves. Per això es procedeix a una segona ronda de

crivellatge, i fins i tot a una tercera, fent diferents dilucions. El plaqueig es fa en plaques de petri de 90 mm de diàmetre.

Els clons aïllats, són amplificats per PCR, amb encebadors del fag, subclonats en vectors del tipus plasmidis, i seqüenciats.

5.- MARCATGE RADIOACTIU DE SONDES

5.1.- MARCATGE DE DNA PER INICIACIÓ A L'ATZAR O RANDOM PRIMING

1. Escalfar a 98°C durant 5 min 10-50 ng de DNA en 28 µl d'aigua. Posar en gel.
2. En un tub tipus eppendorf, es barregen 10 µl d'OLB, 1 µl de BSA (100 µg/ml) i 4 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl).
3. Afegir el DNA denaturat i 1 U de Klenow.
4. Incubar a temperatura ambient durant 4 h o bé durant 1 h a 37°C.

OLB: 2 volums de solució A, 5 volums de solució B, 3 volums de solució C.

Solució A: 20 mM dATP, 20 mM TTP, 20 mM dGTP, 2% β -mercaptoenanol, 1.25 M Tris-HCl pH 7.5, 123 mM MgCl₂.

Solució B: 2 M HEPES pH 6.6.

Solució C: 90 unitats DO/ml hexadeoxiribonucleòtids en TE.

5.2.- MARCATGE D'OLIGONUCLEÒTIDS

Les reaccions es van fer en un volum final de 20 μl , contenint 80 pmols d'oligonucleòtid, 2 μl de tampó 10X (Amersham), 2 μl $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) i 1 U de polinucleòtid quinasa del fag T4 (Amersham n^o cat. 70083). La reacció té lloc a 37°C durant 1 h. Per purificar-los s'utilitzen columnes de Sephadex-G25.

5.3.- GENERACIÓ DE SONDRES D'EXTREMS DE COSMIDIS

5.3.1.- PCR radioactiva amb un únic encebador

Les reaccions es van portar a terme en un volum final de 25 μl , contenint 80 ng de DNA de cosmidi (digerit amb RsaI i purificat amb extracció de fenol:cloroform), 0.4 μM encebador T3 o T7, 20 μM dCTP, 0.2 mM dATP, dGTP, dTTP, 2.5 μl de tampó 10X, 1.5 μl $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) i 1 U Taq polimerasa (Roche n^o cat 1146-173). Les condicions de la PCR són:

94°C	3 min	
94°C	30 s	X 35
46°C	40 s	
74°C	1 min	
74°C	5 min	

5.3.2.- Ribosondes

Les reaccions es van portar a terme en un volum final de 25 μl , contenint 400 ng de DNA de cosmidi (digerit amb RsaI i purificat amb extracció de fenol:cloroform), 1 μl RNAsin[®], 1.25 mM CTP, ATP, GTP, 0.2 mM UTP, 2.5 μl $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-UTP}$ (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) i 1 U T3/T7 RNA polimerasa. Incubar 1 h a 37°C.

6.- AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA

6.1.- REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*, és una tècnica *in vitro* que es basa en l'amplificació selectiva de regions específiques de DNA, delimitades per les seqüències d'un parell d'encebadors (Saiki, 1985). La tècnica consisteix en la repetició de cicles consistents en desnaturalització, anellament dels encebadors i extensió de les cadenes per acció de la Taq polimerasa, DNA polimerasa recombinant de *Thermus aquaticus* BM.

Les condicions de la PCR depenen en gran part de la seqüència dels encebadors, que tenen una temperatura d'hibridació característica, calculada segons la fórmula següent:

$$T_m = 4(C+G) + 2(A+T) - 4$$

Una reacció de PCR consisteix en un cicle inicial de desnaturalització del DNA motlle, a 94°C durant 3 min. A continuació s'enllacen 30-35 cicles de tres etapes cada un. La primera de desnaturalització, 30 s a 94°C, la segona que permet l'anellament dels encebadors, 30 s a la temperatura característica dels encebadors utilitzats, i finalment l'etapa d'extensió de les cadenes, 1 min per Kb de DNA que es vulgui amplificar a 74°C. Per tal que totes les cadenes es copiïn íntegrament, després dels 30-35 cicles es fa una extensió final de 10 min a 74°C.

Les reaccions es van portar a terme en un volum final de 25 µl, contenint 0.5 ng DNA, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM encebadors, 2.5 µl de Tampó 10X i 1 U de Taq polimerasa (Roche nº cat 1146-173)

Tampó 10X : 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3

6.2.- RT-PCR

La RT-PCR és una tècnica que ens permet retrotranscriure el RNA a cDNA, gràcies a la capacitat de la transcriptasa reversa de copiar molècules de RNA a DNA.

6.2.1.- Construcció de la primera cadena

1. Barrejar:

- 11 (1 µg de RNA poliA⁺ desnaturalitzat a 60°C durant 10 min)
- 4 µl Tampó 5X (GibCo BRL)
- 2 µl 0.1 M DTT
- 1 µl 10 mM dNTP
- 1 µl 30 µM Hexàmers
- 1 µl Transcriptasa reversa Superscript
(GibCo BRL n° cat. 18064-014)

2. Incubar durant 1 h a 37°C.

3. Parar la reacció a 93°C durant 5 min.

6.2.2.- PCR

1. Diluir al 50% el cDNA obtingut.

2. Preparar el mix de PCR afegint-hi 1 µl del cDNA diluït.

3. Per uns encebadors determinats, utilitzar les mateixes condicions de PCR com si es tractés de DNA com a motlle.

6.3.- RACE

L'acrònim RACE, prové de l'expressió anglesa *Rapid Amplification of cDNA Ends*. Aquesta tècnica és utilitzada per estendre la seqüència de cDNAs cap els seus extrems. Per a dur a terme les RACE, s'han utilitzat Marathon-Ready cDNA (Clontech) de diferents teixits, seguin les indicacions del fabricant. A partir de RNA poliA⁺, se sintetitza la primera i la segona cadena del cDNA, que es lliga a uns adaptadors. Aquest cDNA s'utilitza com a motlle en rondes de PCR, amb encebadors dels adaptadors i encebadors específics de la seqüència coneguda del cDNA d'interès.

Els fabricants recomanen la utilització d'una barreja de polimerases, l'Advantage[®] cDNA Polymerase Kit (Clontech cat nº 8417-1) en lloc de fer la PCR amb la Taq tradicional, doncs d'aquesta manera s'augmenta l'eficiència, la llargada dels productes de PCR i es disminueix la taxa d'error. També permet fer un *hot start* real sense necessitat d'afegir l'enzim un cop denaturat el DNA, doncs la barreja porta incorporat anticossos monoclonals contra la polimerasa, que bloquegen la reacció a temperatura ambient, però a temperatures més altes de 70°C els anticossos no són funcionals i l'activitat de les polimerases queda restaurada.

En la primera ronda s'utilitzen els encebadors més exteriors, tant dels adaptadors com els específics del cDNA, amb unes condicions de PCR *touch down*, que consisteix en anar variant la temperatura d'anellament en alguns cicles, començant amb uns cicles amb temperatura més alta i anar-la baixant en cicles posteriors. La segona ronda es fa amb encebadors més interiors, tant dels adaptadors com dels específics, i utilitzant una dilució 1:50 de la primera PCR com a motlle.

Un exemple de condicions de PCR *touch down* és:

94°C	1 min	
94°C	30 s	X5
74°C	4 min	
94°C	30 s	X5
72°C	4 min	
94°C	30 s	X25
70°C	4 min	

Els cDNAs proporcionats per Clontech ens permet fer RACEs en sentit 5' i sentit 3' a partir del mateix cDNA motlle, en tubs diferents, utilitzant encebadors diferents en cada cas.

Els productes de PCR, es corren en un gel d'agarosa, es subclonen en un vector plasmídic, i finalment se seqüencien.

7.- SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA

Per obtenir la seqüència tant de productes de PCR, com de DNA subclonat en plasmidis, es va utilitzar un seqüenciador automàtic ABI PRISM 373XL Upgrade (Perkin Elmer), amb el Big Dye Terminator Mix (PE Applied Biosystems).

Per seqüenciar productes de PCR, primerament s'han de purificar, per treure tots els nucleòtids no marcats excedent de la reacció de PCR. La purificació de productes de PCR es va fer amb el PCR Purification Kit (QIAGEN), seguint les instruccions del fabricant.

Per seqüenciar DNA de plasmidi, la preparació del DNA ha d'estar lliure de sals, que podrien interferir en la posterior reacció de PCR i són suficients per la reacció

300 ng de DNA. Les condicions de PCR de seqüència, amb un total de 28 cicles, són:

96°C 1 min	X28
96°C 30 s	
52°C 30 s	
60°C 4 min	

El producte de PCR de seqüència, s'ha de purificar, amb columnes de Sephadex G-50, equilibrat amb aigua. S'elueix de la columna i es concentra a l'speed-vac. Es guarda a -20°C fins al moment de preparar les mostres, just abans de carregar el gel de seqüència.

8.- PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA

Per purificar productes de PCR i bandes de DNA en gels d'agarosa s'ha utilitzat el kit comercial QIAquick™ Gel Extraction Kit (QUIAGEN nº cat. 28706) i QIAquick™ PCR Purification Kit (QUIAGEN nº cat. 28106) seguint les indicacions del fabricant.

9.- CLONATGE DE FRAGMENTS DE DNA EN PLASMIDIS

Tots els fragments de cDNAs, tant els provinents de la RACE, com els provinents del crivellatge de genoteques, com els del clonatge *in silico* de RT-PCR es van subclonar en plasmidis. S'han utilitzat dues estratègies diferents, el subclonatge dirigit, mitjançant l'ús d'enzims de restricció, i el subclonatge a l'atzar.

El subclonatge a l'atzar, es basa en la característica de moltes polimerases d'afegir nucleòtids extres quan acaben un cicle de PCR, generalment adenines, tot i que depèn del primer utilitzat en la reacció. Per preparar el vector, es digereix amb un enzim de restricció i es fa una reacció amb una polimerasa en una solució que només contingui timidines. El vector així preparat s'anomena T-vector. S'han

utilitzat T-vectors de preparació pròpia i comercials (pGEM-T Easy, Promega nº cat. A1360).

Els vectors plasmídics utilitzats, van ser pBluescript SK (Stratagene), pCDNA-3-HA (Lee et al., 1998).

9.1.- DIGESTIONS

Maxipreparacions de DNA de plasmidis, es van digerir amb els mateixos enzims de restricció les dianes dels quals estaven incloses en els oligonucleòtids amb els que es va fer la RT-PCR. En el cas de *KCNE1* (producte *KCNE1-1/KCNE1-2*), *KCNE2* (producte *KCNE2-1/KCNE2-2*), *KCNE3* (producte *KCNE3-1/KCNE3-2*), com a DNAs a subclonar i pCDNA-3-HA com a vector (Fig. 7). Es va digerir en un volum final de 50 µl contenint 5 µg DNA, 5 µl Tampó 10X (proporcionat per la casa comercial de l'enzim), 5 U BamHI, 5 U NotI. La digestió té lloc a 37°C durant dues hores.

El producte de la digestió es corre en un gel d'agarosa de baix punt de fusió, al percentatge necessari per separar bé les bandes que s'han de tallar. Per tallar les bandes corresponents a *KCNE1*, *KCNE2* i *KCNE3*, es va utilitzar un gel d'agarosa al'1%, mentre que per tallar les bandes corresponents als vectors es van utilitzar gels del 0.7%. Les bandes tallades, es pesen i es purifiquen, segons els protocols descrits anteriorment.

9.2.- DEFOSFORILACIÓ DEL VECTOR

Als productes de la digestió del vector, s'hi afegeix 0.1 U de fosfatasa alcalina d'intestí de vedella (Roche), i es deixa desfosforilar els extrems del vector a 37°C durant 30 min. El DNA es purifica amb fenol: cloroform (50:50), es precipita amb etanol absolut i es resuspèn en aigua.

9.3 GENERACIÓ DE MUTANTS DE GLICOSILACIÓ

9.3.1.- Generació de KCNE2 N6Q

Es va dissenyar un encebador que introduïa el canvi de codó (en negreta), i en l'extrem 5' contenia la diana de restricció de BamHI.

5'NQ : 5'GGATCCATGTCTACTTTATCC**CAG**TT
BamHI M Q

Es va fer una PCR sobre KCNE2, amb els encebadors 5'NQ i KCNE2-2. Es va clonar en T-vector i es van seqüenciar alguns clons. Un dels clons que contenien la mutació es va subclonar direccionalment (fragment BamHI-XhoI) en el vector d'expressió pCDNA3-HA.

9.3.2.- Generació de KCNE2 N29Q

Es va dissenyar un encebador que introduïa la mutació (en negreta), i tenia la diana de l'enzim de restricció NarI.

3'NQ : 5'GGCGCCAG**CAG**ACAACAGCT
NarI Q

Es va fer una PCR sobre KCNE2, amb els encebadors 3'NQ i KCNE2-2. Es va clonar en T-vector i es van seqüenciar alguns clons. El cló que contenia la mutació es va digerir amb NarI i XhoI. El fragment resultant es va subclonar en el vector d'expressió pCDNA3-HA-KCNE2, prèviament digerit amb els mateixos enzims.

9.4 CLONATGE DELS SEGMENTS P DE LES SUBUNITATS β

Es van dissenyar encebadors de les diferents subunitats β , per tal d'amplificar per PCR els segments P de *HERG*, *KCNQ1*, *KCNQ2* i *KCNQ3*.

Els encebadors utilitats van ser: *HERG-D/HERG-R*, *KCNQ1-D/KCNQ1-R*, *KCNQ2-D/KCNQ2-R*, *KCNQ3-D/KCNQ3-R*. La PCR es va sobre cDNA de cor i de cervell fetal. Els fragments amplificats es van clonar inicialment en T-vector i es va comprovar la seva seqüència.

9.5.- LLIGACIONS

Per lligar els DNAs s'ha mantingut la relació 1:3, entre les molècules del vector i les de l'insert a lligar. Les reaccions es van fer amb 50 ng de vector en un volum final de 10 μ l i amb 3 U de T4 DNA lligasa (Roche n^o cat. 481220), en el tampó proporcionat per la casa comercial.

La reacció té lloc a 4°C durant tota la nit, o 2 h a temperatura ambient.

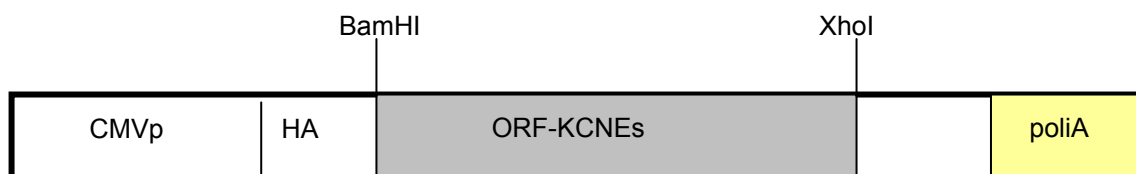


Figura 7. Esquemes dels vectors d'expressió, pels diferents KCNEs en pCDNA3-HA. CMVp: promotor de citomegalovirus; HA: tag HA; poliA: senyal de poliadenilació de SV40.

9.6.- TRANSFORMACIÓ

Per transformar els productes de la lligació es va utilitzar la soca d'*E. coli* XL1Blue F', que conté una deleció en el gen *lacZ*, permetent la complementació amb el vector per a la producció de β -galactosidasa. S'ha utilitzat un mètode ràpid de preparació de cèl·lules competents.

1. Preparar un cultiu d'*E. coli* XL1Blue F', a partir d'una colònia aïllada, en 20 ml de medi LB. Deixar-lo créixer tota la nit a 37°C amb agitació suau.
2. Inocular 20 ml de medi LB amb 200 µl del cultiu nocturn, i incubar-lo fins que arribi a una fase de creixement exponencial, a una $OD_{600nm}=0.3$.
3. Centrifugar a 500 g durant 5 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 1 ml de TSB. Després de 10 min en gel, les cèl·lules ja són competents. L'eficiència de les cèl·lules després de 4 h en gel, baixa molt, i ja no són útils, per transformar.
5. En un tub tipus eppendorf s'afegeixen 100 µl de cèl·lules competents, i 3 µl de la lligació i es deixen 30 min en gel.
6. S'afegeixen 900 µl de TSB i 18 µl de sacarosa al 25% i es posen a créixer a 37°C durant 60 min.
7. La transformació es plaqueja en plaques de LB-agar, que contenen antibiòtic, 0.5 mM IPTG i 0.1 mg/ml X-Gal (només en el cas de que el vector permeti la selecció per color). Incubar a 37°C tota la nit.

Solució TSB : 10% (w/v) PEG 3000, 5% (w/v) DMSO, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$, en LB. Cal preparar-la fresca cada vegada.

10.- MAPATGE PER HÍBRIDS DE RADIACIÓ

El mapatge cromosòmic de *KCNE3* es va fer mitjançant el pannel d'híbrids de radiació Stanford G3.

Les línies positives i negatives es van determinar per PCR, amb els encebadors KCNE3-1 i KCNE3-2 , segons les condicions:

94°C	1 min		
94°C	30 s		
68°C	30 s		X35
74°C	30 s		
74°C	10 min		

El resultat es va analitzar al Stanford Human Genome Center (<http://www-shgc.stanford.edu>).

11.- SSCP's

L'acrònim SSCP prové de l'expressió anglesa *Single Strand Conformation Polymorphism*, tècnica que es basa en la diferent conformació o estructura que adopta una cadena senzilla de DNA depenent de la seva seqüència, en condicions no desnaturalitzants. Les diferents conformacions se separen en un gel d'acrilamida en condicions no desnaturalitzants, obtenint un patró de bandes característic per cada seqüència de DNA. La sensibilitat de la tècnica és alta, doncs un únic canvi en un nucleòtid, dóna lloc a un patró de bandes diferent. Aquesta tècnica s'utilitza per buscar mutacions o polimorfismes entre un grup de DNAs. Si el patró de bandes és diferent en algun dels DNAs, se seqüència per identificar on hi ha el canvi de nucleòtid.

11.1.- AMPLIFICACIÓ DELS FRAGMENTS DE DNA

Es van dissenyar encebadors per poder amplificar per PCR tota la seqüència codificant i part de genòmica de *KCNE2* i *KCNE3* (*KCNE2-3-KCNE2-4*, *KCNE3-2-KCNE3-4*).

Les condicions de PCR per *KCNE2* són:

94°C	1 min	
94°C	30 s	X35
64°C	30 s	
74°C	30 s	
74°C	10 min	

Les condicions de PCR per *KCNE3* són:

94°C	1 min	
94°C	30 s	X35
68°C	30 s	
74°C	30 s	
74°C	10 min	

11.2.- PREPARACIÓ DEL GEL

Les mostres amplificades per PCR, es comproven primerament en un gel d'agarosa.

S'utilitzen dues condicions de concentració d'acrilamida, doncs a vegades canvis que es veuen en una condició no es veuen en una altra. Es van utilitzar gels del 10% d'acrilamida Clean Gel DNA Analysis Kit (Pharmacia Biotech nº cat. 71-7188-00) i del 12% d'acrilamida Excel Gel^R DNA Analysis Kit (Pharmacia Biotech nº cat. 71-7196-00). Els gels del 10% s'han de rehidratar, afegint 25 ml de Gel Buffer, proporcionat per la casa comercial amb agitació contínua i suau durant 60 min. Els gels del 12%, ja estan rehidratats.

11.3.- PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

1. En una placa d'ELISA de 96 pous es posa la següent barreja en cada pou:
 - 6 μ l Solució d'aturada
 - 3 μ l Producte de PCR
 - 3 μ l H₂O
2. Denaturalitzar les mostres a 98°C durant 2 min. Posar-les en gel.

Solució d'aturada: 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% blau de bromofenol, 0.05% xilen cianol, 10 mM NaOH

11.4.- PREPARACIÓ DE L'ELECTROFORESI

1. Es col·loca el gel en la cubeta d'electroforesi i es col·loquen els electrodes en els extrems del gel. En el cas dels electrodes del gel de 10%, cal rehidratar-los abans amb 20 ml de tampó d'elèctrode durant 10 min a temperatura ambient amb agitació suau i contínua.
2. Es carreguen 6 μ l de les mostres.
3. Les condicions d'electroforesi pels KCNEs són:

Gels del 10%

100 mV	23 mA	5 W	15 min
600 mV	30 mA	18 W	105 min

Gels del 12%

100 mV	23 mA	10 W	15 min
600 mV	30 mA	30 W	150 min

11.5.- TINCIÓ DEL GEL

La tinció dels gels es va fer amb el Kit de tinció de gels, Silver Staining Kit DNA (Pharmacia Biotech nº cat 17-1198-01), seguint les recomanacions del fabricant.

12.- CULTIUS CEL·LULARS DE MAMÍFER

12.1.- CÈL·LULES

Les cèl·lules utilitzades pels experiments funcionals, han estat les COS-7, cèl·lules de ronyó de mico verd africà transformades per SV40 (ATCC CRL 1651) (Gluzman, 1981).

Les cèl·lules COS-7, s'han fet créixer en medi DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium; GibCo BRL nº cat 41966-029) suplementat amb 5% sèrum fetal (Linus nº cat SO1805), i antibiòtics (penicil·lina i estreptomina, GibCo BRL nº cat 15140-114).

12.2.- TRIPSINITZACIÓ

1. Aspirar el medi de cultiu amb una pipeta pasteur de vidre estèril.
2. Afegir 2 ml de tripsina-EDTA (GibCo BRL nº cat. 35400-027) i aspirar el medi amb una pipeta pasteur de vidre estèril.
3. Repetir els rentats de tripsina dues vegades, controlant el procés de tripsinització al microscopi. Quan les cèl·lules comencen a estar refringents, s'aspira el medi amb una pipeta pasteur de vidre estèril deixant-ne una goteta.
4. Picar la placa per desenganxar les cèl·lules i afegir medi de cultiu i escombrar bé la placa amb una pipeta de 10 ml estèril.
5. Les cèl·lules ja estan preparades per sembrar en una placa nova, a la dilució desitjada.

12.3.- CONSERVACIÓ DE CÈL·LULES

Les cèl·lules eucariotes es guarden congelades en nitrogen líquid, en sèrum fetal (SF) al 10% de DMSO.

1. Tripsinitzar les cèl·lules que tot just acaben d'arribar a la confluència, i resuspendre-les en 1 ml de SF (5×10^6 cèl·lules/ml).
2. Afegir a les cèl·lules 1 volum d'una solució 20% DMSO en SF i repartir-les en vials de criopreservació, degudament rotulats (2.5×10^6 cèl·lules/vial).
3. Mantenir 24 h a -80°C abans de ser transferides a nitrogen líquid.

Així com el procés de congelació de les cèl·lules ha de ser lent, per tal de no danyar-les, el procés de descongelació ha de ser ràpid.

1. Es treuen els vials del nitrogen líquid i es posen directament al bany de 37°C , sense deixar d'agitar-les.
2. Les cèl·lules descongelades es traspassen a un tub cònic amb 5-6 ml de medi DMEM+10% SF i se centrifuguen a 2000 g durant 2-3 min.
3. Aspirar el sobrenedant amb una pipeta pasteur estèril i moure les cèl·lules, perquè sigui més fàcil resuspendre-les. Aquest pas és necessari per treure tot el DMSO amb el que estaven congelades.
4. Resuspendre les cèl·lules en el medi de cultiu necessari i traspassar-les a una p100.

12.4.- TRACTAMENTS

Per mirar si el DNA transfectat expressa una proteïna que es glicosila, es va fer un tractament a les cèl·lules transfectades amb un inhibidor de la *N*-glicosilació, la tunicamicina.

La tunicamicina és un antibiòtic natural que bloqueja el primer pas de la biosíntesi de *N*-oligosacàrids en cèl·lules. El tractament de cèl·lules en cultiu amb inhibidors de la *N*-glicosilació, resulta en la producció de cadenes de glicoproteïnes alterades. El marge de concentracions efectives de la tunicamicina és entre 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$. En experiments previs es van provar diferents concentracions i es va

observar que una concentració de 10 µg/ml inhibia la N-glicosilació però no afectava la supervivència de les cèl·lules.

Les cèl·lules van ser incubades durant 24 h amb tunicamicina (Boehringer Mannheim n° cat. 1243080) a una concentració final de 10 µg/ml, prèviament al seu processament.

13.- TRANSFERÈNCIA DE DNA A CÈL·LULES DE MAMÍFER

Pels experiments d'expressió transitòria s'ha utilitzat la tècnica de transfecció amb lípids catiónics. S'ha utilitzat el producte comercial Lipofectina (GibCo BRL n° cat. 18292-011). Les transfeccions es van realitzar en cèl·lules COS-7 sembrades a una densitat de 5×10^5 cèl·lules/p60, amb 5 µg de DNA i 10 µl de lipofectina seguint el protocol recomanat per la casa comercial. Les cèl·lules es van processar a les 60 h post-transfecció.

14.- ANÀLISI DE PROTEÏNES

14.1.- TRADUCCIÓ *IN VITRO*

Per a la traducció *in vitro* dels putatius gens clonats, es va utilitzar el sistema TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate (Promega n° cat. 25020), doncs ofereix l'avantatge respecte als lisats de reticulòcits de conill estàndards, de poder fer tots els passos en un únic tub. El DNA a traduir *in vitro* ha d'estar adjacent a una seqüència promotora reconeguda per la RNA polimerasa dels fags T3, T7 o SP6, que estan presents en la reacció.

El protocol que es va seguir és el recomanat per Promega, utilitzant la RNA polimerasa del fag T7 i 0.5 µg de DNA.

Les mostres es van analitzar en gels d'acrilamida de concentració adient. Els gels es van fixar amb una solució 10% d'àcid acètic-25% d'isopropanol durant 20 min amb agitació suau, i es varen assecat a sobre de paper whatman 3MM a 80°C durant 2 h, en un assecador de gels al buit. Els gels secs es van exposar amb una pel·lícula sensible al ^{35}S , BIOMAX™ MR (KODAK n° cat 8941114), amb exposicions apropiades.

14.2.- PREPARACIÓ D'EXTRACTES PROTEICS

Els extractes proteics de les cèl·lules transfectades es van preparar segons el següent protocol:

1. Aspirar el medi de cultiu i rentar la placa amb 10 ml de PBS per plaques de 100 mm de diàmetre (p100) i 3 ml de PBS per plaques de 60 mm de diàmetre (p60). Aspirar i repetir el rentat dues vegades més.
2. Recollir les cèl·lules per rascat de la placa en 2 ml de PBS per p100 o 1 ml de PBS per p60 i transferir-les a un tub tipus eppendorf i sedimentar les cèl·lules per centrifugació a 1000 g durant 1 min.
3. Descartar el sobrenedant i resuspendre el pellet de cèl·lules amb 60 μl de TNN (p60) o 200 μl (p100). Deixar en gel 15 min.

PBS: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 . Ajustar a pH 7.4 amb HCl.

TNN: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40.

14.3.- GELS D'ACRILAMIDA

Els gels d'acrilamida són utilitzats per separar proteïnes d'una barreja heterogènia, segons el seu pes molecular. En aquest mètode la separació de proteïnes en un camp elèctric indueix el seu desplaçament a través de la matriu

d'acrilamida. L'efecte de les diferents càrregues elèctriques de les proteïnes es minimitza degut a l'associació amb l'SDS, així doncs la separació és deguda principalment per les diferències de pes de les diferents proteïnes.

14.3.1.- Preparació del gel

Per separar diferents mides de proteïnes s'han utilitzat diferents concentracions d'acrilamida en el gel separador. En la taula 8 s'especifica les concentracions utilitzades:

	7.5%	8%	10%	12.5%	14%	15%
30% A/B 0.8%	2.5 ml	2.7 ml	3.3 ml	4.2 ml	4.7 ml	5.0 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
H₂O	4.8 ml	4.6 ml	4.0 ml	3.4 ml	3.1 ml	2.3 ml
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
VOLUM TOTAL	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Taula 8. Taula resum per a la preparació de gels d'acrilamida de diferents concentracions. (A/B: acrilamida: bis-acrilamida)

Un cop polimeritzat el gel de separació, es prepara el gel de compactació on es clava la pinta.

Gel de compactació: 0.65 ml A/B 30%, 1.25 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 50 µl 10% SDS, 3 ml H₂O, 50 µl 10% APS, 10 µl TEMED.

14.3.2.- Electroforesi

Es preparen les mostres, afegint-hi el mateix volum de tampó de càrrega 2X i es bullen durant 5 min.

Es corre el gel a 80 V fins que les mostres han entrat al gel de resolució. Després es pot córrer a 120-130 V.

Tampó d'electroforesi 10X: 60.6 g Tris base, 288.4 g glicina, 20 g SDS.

Tampó de càrrega 2X: 2% SDS, 10% glicerol, 0.1 M Tris pH 6.8, 0.1% blau de bromofenol, 10% β -mercaptoetanol.

14.4.- WESTERN BLOT

La tècnica del western blot permet detectar proteïnes en membranes de nitrocel·lulosa/niló mitjançant l'ús d'anticossos específics.

14.4.1.- Transferència

S'equilibra el gel, la membrana de nitrocel·lulosa, Hybond C (Amersham nº cat. RPN 203W) i 4 papers whatman 3MM amb el tampó de transferència-20% metanol. Es munta la transferència, segons l'ordre següent: esponja, 2 papers whatman 3MM, membrana, gel, 2 papers whatman 3MM, esponja. Es posa dins de l'aparell de transferència, amb la solució de transferència, amb el gel en el pol negatiu i la membrana en el pol positiu.

La transferència té lloc durant 1 h a 0.4 A, a 4°C, amb agitació contínua de la solució de transferència.

Un cop transferit el gel, es tenyeix la membrana amb Ponceau S (Sigma nº cat. P-3504) durant uns minuts, es rentar amb aigua fins que les mostres es vegin amb claredat i es fa una fotografia o una fotocòpia de la membrana. Finalment es destenyeix del tot la membrana amb PBS.

Tampó de transferència 10X: 121.2 g Tris base, 576,8 g glicina. Ajustar a pH 8.3.

14.4.2.- Incubació d'anticossos

1. Bloquejar la membrana amb 10% llet desnatada en pols (LDP) en PBS-0.1% Tween 20, durant tota la nit a 4°C, amb agitació contínua.
2. Incubar la membrana amb el primer anticòs durant 1 h, a temperatura ambient i agitació contínua en PBS-5% LDP-0.1% Tween 20.
3. Rentats amb PBS-0.1% Tween 20: 2 rentats ràpids, 1 rentat de 15 min i 2 rentats de 5 min.
4. Incubar amb el segon anticòs conjugat amb la peroxidasa durant 45 min, a temperatura ambient i agitació contínua en PBS-5% LDP-0.1% Tween 20.
5. Rentats amb PBS-0.1% Tween 20-PBS: 2 rentats ràpids, 1 rentat de 15 min i 2 rentats de 5 min
6. Revelar la membrana amb el mètode de quimioluminescència (SuperSignal^R West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce nº cat. 34080). Exposar la membrana amb una pel·lícula AGFA ORTHO, durant diferents temps fins aconseguir una exposició adient.

L' anticòs primari utilitzat ha estat l'anticòs monoclonal anti-HA HA.11 (BabCo), utilitzat a una dilució final de 1:1000. L'anticòs secundari utilitzat ha estat un anticòs de cabra anti-IgG de ratolí, conjugat a peroxidasa (Dako) a una dilució final de 1:4000

14.5.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Les cèl·lules es fan créixer a sobre de cobreobjectes de 12 mm de diàmetre.

1. Treure els cobreobjectes de la placa de cultiu, vigilant l'orientació, i posar-los a sobre d'una esponja humida, amb les cèl·lules en la cara de dalt, que ens farà de cambra humida. Tots els tractaments es van fer a temperatura ambient. En cap moment poden quedar secs, així que hi afegim 100 μ l PBS-1% SF. Rentar amb PBS i treure l'excés de líquid posant el cobreobjectes a sobre de cel·lulosa.
2. Fixar les cèl·lules amb 100 μ l de 4% paraformaldehid en PBS durant 15 min. Rentar amb PBS i treure l'excés de líquid.
3. Permeabilitzar les cèl·lules amb 100 μ l de 0.1% Triton-X100, durant 10 min. Rentar amb PBS i PBS-1% SF i treure l'excés de líquid.
4. Bloquejar amb 100 μ l de PBS-10% SF durant 30 min. Rentar amb PBS-1% SF i treure l'excés de líquid.
5. Incubar amb 100 μ l de la solució amb el primer anticòs diluït en PBS-1% SF durant 30 min. Rentar amb PBS-1% SF tres vegades.
6. Incubar amb 100 μ l de la solució del segon anticòs, diluït en PBS-10% SF, durant 30 min. Rentar amb PBS-1% SF tres vegades.
7. Muntar en Citifluor. Guardar a 4°C aïllat de la llum.

Les preparacions es van observar amb un microscopi de fluorescència Olympus BX60, i un filtre per la fluoresceïna.

Com a primer anticòs es va utilitzar el monoclonal anti-HA HA.11 (1:1000). Com a anticòs secundari es va utilitzar un anticòs de cabra anti-IgG de ratolí conjugat amb isotiocianat de fluorescència (FITC) (Amersham, 1:200)

15.- MOSTRES DE DNA

Les mostres de DNA utilitzades per a la cerca de mutacions en pacients de sordesa no sindròmica, es van obtenir del banc de mostres del Grup de Sordesa del CGMM-IRO. En tots els casos es va obtenir el consentiment informat seguint les normes del Comitè d'Ètica de la Institució.

16.- LLISTAT D'ENCEBADORS UTILITZATS

Encebador	Seqüència	Posició	clo
KCNE2-1	5'GGATCCATGTCTACTTTATCCA	141-157	AF302095
KCNE2-2	5'CTCGAGTCAGGGGGACAT	501-512	AF302095
KCNE2-3	5' TATATGGACAATTGGCGCCAGAAC	204-227	AF302095
KCNE2-4	5' TGGTGGCCTTCGATTCTTCTAGAT	445-468	AF302095
KCNE2-5	5'CTAACCTTGTTCGCCTATTTTAT	80129-80191	AP000052
KCNE2-6	5'TGGCATCTCTTCATGTCTGGA	546-566	AF302095
5'NQ	5'GGATCCATGTCTACTTTATCCCAGTT	141-160	AF302095
3'NQ	5'GGCGCCAGCAGACAACAGCT	217-236	AF302095
KCNE1-1	5'GGATCCATGATCCTGTCTAAC	59358-59372	AP000053
KCNE1-2	5'CTCGAGTCATGGGGAAGGCT	58983-58996	AP000053
KCNE3-1	5'GGATCCATGGAGACTACCAATGGA	306-323	AF302494
KCNE3-2	5'CTCGAGTGTCTTGGTCTTCCACC	635-651	AF302494
KCNE3-3	5'AGCTTCTACCGAGTCTTCCCCCA	266-288	AF302494
KCNE3-4	5'AGGTCGTCACTGGGGTGGGA	749-768	AF302494
HERG-D	5'GAATTCAAGGACAAGTATGTGA	2429-2444	AB009057
HERG-R	5'TCTAGACTGCCGCTGGATGA	2671-2684	AB009057
KCNQ1-D	5'GAATTCTTCGGCAGCTACGCA	688-704	1669858
KCNQ1-R	5'TCTAGACTTCAGGGCAAACCC	847-864	1669858
KCNQ2-D	5'GAATTCTTTGACACCTACGCGG	827-842	Y150565
KCNQ2-R	5' TCTAGACTTCAGGGCAAACCC	989-1003	Y150565
KCNQ3-D	5'GAATTCTTTGAGACCTATGCAGAT	5659-5675	AF071478
KCNQ3-R	5'TCTAGACTTGAGGGCCAGCCC	8261-8275	AF071478

La posició dels primers ve donada d'acord a la seqüència continguda en els números d'accés de Genbank indicats.

1.- CONTIG DE COSMIDIS I MAPA TRANSCRIPCIONAL DE TRES REGIONS DE 21q22

L'objectiu final d'aquest treball era l'aïllament i identificació de nous gens del HSA21. Com a pas previ, i dintre del projecte europeu del HSA21, es va construir el mapa físic i transcripcional d'una part de la regió crítica per a la SD, una part distal i una part proximal.

El resultat d'aquest treball queda reflectit en l' article: "*Cosmid contig and transcriptional map of three regions of human chromosome 21q22: Identification of 37 novel transcripts by direct selection*", J. Guimerà, C. Pucharcós, A. Domènech, K. Casas, A. Solans, T. Gallardo, J. Ashley, M. Lovett, X. Estivill, M. Pritchard. *Genomics* 45, 59-67 (1997). La participació de la doctorant en aquest treball es resumeix a continuació.

1.1.- CONTIG DE COSMIDIS

Es van seleccionar YACs de tres regions diferents del HSA21. Al voltant d'*AML1* es va escollir el YAC 72H9, de 450 kb. Al voltant del marcador *D21S55*, i ocupant 1 Mb, els YACs 336G11, 238B1 i 221B9. Finalment, al voltant del marcador *D21S53*, un YAC de 375 kb, el 552A3. Els YACs varen ser subministrats pel CEPH/Généthon (Centre d'Etude du Polymorphysme Humain, París, França) i han estat descrits per Chumakov i col·laboradors (Chumakov et al., 1992)

De cada un dels YACs es va construir una llibreria de cosmidis, en el vector SuperCos1 (Stratagene), utilitzant la diana BamHI (treball realitzat per M. Pritchard i J. Guimerà), i es van ordenar en contigs. La doctorant va participar en la construcció dels contigs dels YACs 238B1, 72H9 i 552A3. A continuació es detallarà el treball realitzat amb el YAC 238B1 com a exemple.

El primer pas va ser la selecció dels clons de la llibreria provinent del subclonatge del YAC 238B1 en cosmidis, que contenien seqüència humana, amb una sonda

ALU i se'n van obtenir 44 en un primer crivellatge. Aquests 44 clons es van sotmetre a un segon crivellatge i se'n van descartar 12, quedant finalment 32 clons humans. El segon pas va ser ordenar els cosmidis. Per aquest motiu, es va obtenir DNA d'aquests i es van fixar en filtres de niló, que els contenien tots. Es van generar sondes dels dos extrems de cada un dels 32 clons, i aquestes 64 sondes es van hibridar amb els filtres que contenien tots els clons. D'aquesta manera es podia veure quins clons tenien els extrems solapats. Per la generació de sondes es van utilitzar dos mètodes: a) PCR radioactiva amb un únic encebador i b) transcripció amb la T3/T7 RNA polimerasa.

En el cas de l'extrem T7 del cosmidi 238-12, la hibridació no va indicar el solapament amb cap dels cosmidis presents en el filtre, llavors es va hibridar la llibreria de cosmidis del YAC 238B1, amb la ribosonda generada amb l'extrem T7 del cosmidi 238-12. El crivellatge va obtenir un clo positiu, 238-R8. En altres YACs, els forats entre els cosmidis no es van poder reomplir d'aquesta manera i es va haver de recórrer al crivellatge de llibreries de PACs (proporcionats pel HGMP Resource Centre, Regne Unit). En el cas del YAC 221B9, el forat no va poder ser tapat.

L'ordre dels cosmidis es va reconfirmar per la presència de marcadors polimòrfics. En particular, pel YAC 238B1 els marcadors utilitzats van ser el *D21S337* i el *D21S233*. En el cas del YAC 221B9, l'ordre establert pel nostre grup no corresponia amb l'ordre publicat per altres grups (Shimizu et al., 1994). L'alliberament de part de la seqüència del HSA21 va demostrar que l'ordre que proposàvem nosaltres era el correcte.

Es va generar també un mapa de restricció d'enzims de tall poc freqüent, tant de cada un dels YACs com dels cosmidis, per determinar-ne el solapament. Els enzims utilitzats varen ser NotI, NruI, SacII, Sall, MluI i EagI. La doctorant va ser la responsable de la construcció del mapa de restricció dels extrems dels YACs. Primerament es va obtenir DNA de cada un dels YACs i es va encapsular en boletes d'agarosa, es va digerir amb cada un dels enzims i es van separar els fragments mitjançant una electroforesi de camp polsant. Es va transferir a una

membrana i es va hibridar amb sondes generades amb els dos braços del vector. D'aquesta manera es va poder calcular la mida aproximada de cada un dels fragments generats amb els diferents enzims. La doctorant va participar també en la construcció del mapa de restricció dels cosmidis dels YACs 238B1, 72H9 i 552A3. El resultat és el mapa de restricció que es pot veure en la Fig. 8, reconfirmant l'ordre establert dels cosmidis.

1.2.- SELECCIÓ DE cDNAs I EL SEU MAPATGE

Per a localitzar en els YACs analitzats regions expressades, es va utilitzar la tècnica de la selecció de cDNAs, en la que el cDNA sintetitzat se selecciona per hibridació amb la seqüència genòmica que s'analitza (Lovett et al., 1991; Morgan et al., 1992). Per sintetitzar el cDNA es va partir de RNA de cervell fetal humà.

Un primer experiment de selecció de cDNA es va realitzar amb el YAC 221B9, (portat a terme per M. Pritchard), on la doctorant va participar en la construcció dels mapes, en la seqüenciació i en l'anàlisi dels 150 clons seleccionats. Només un dels clons, el B5-1.1, va mapar en els cosmidis d'aquest YAC (Fig. 8). Un 60% contenien seqüències ribosomals, doncs les preparacions de cosmidis no es van purificar amb gradients de CsCl₂. La resta de clons, van resultar ser artefactes.

En un segon experiment, es van utilitzar un total de 502 cosmidis generats dels 5 YACs. Es van recuperar 576 clons de cDNAs putatius, que es van posar en membranes de niló. Els clons que contenien seqüències ribosomals o repetitives es van detectar mitjançant la hibridació amb sondes ribosomals o repetitives, d'aquesta manera 456 clons varen ser eliminats. Els 120 clons restants, es van mapar al HSA21 i van ser assignats als diferents YACs, per hibridació amb els filtres de niló que contenien el DNA dels cosmidis (treball realitzat per C. Pucharcós). Per tal d'evitar la redundància, cada un dels clons es va hibridar contra els filtres que contenien els 576 clons inicials. El resultat final es pot veure en la Fig. 8, on només es mostren els clons no-redundants.

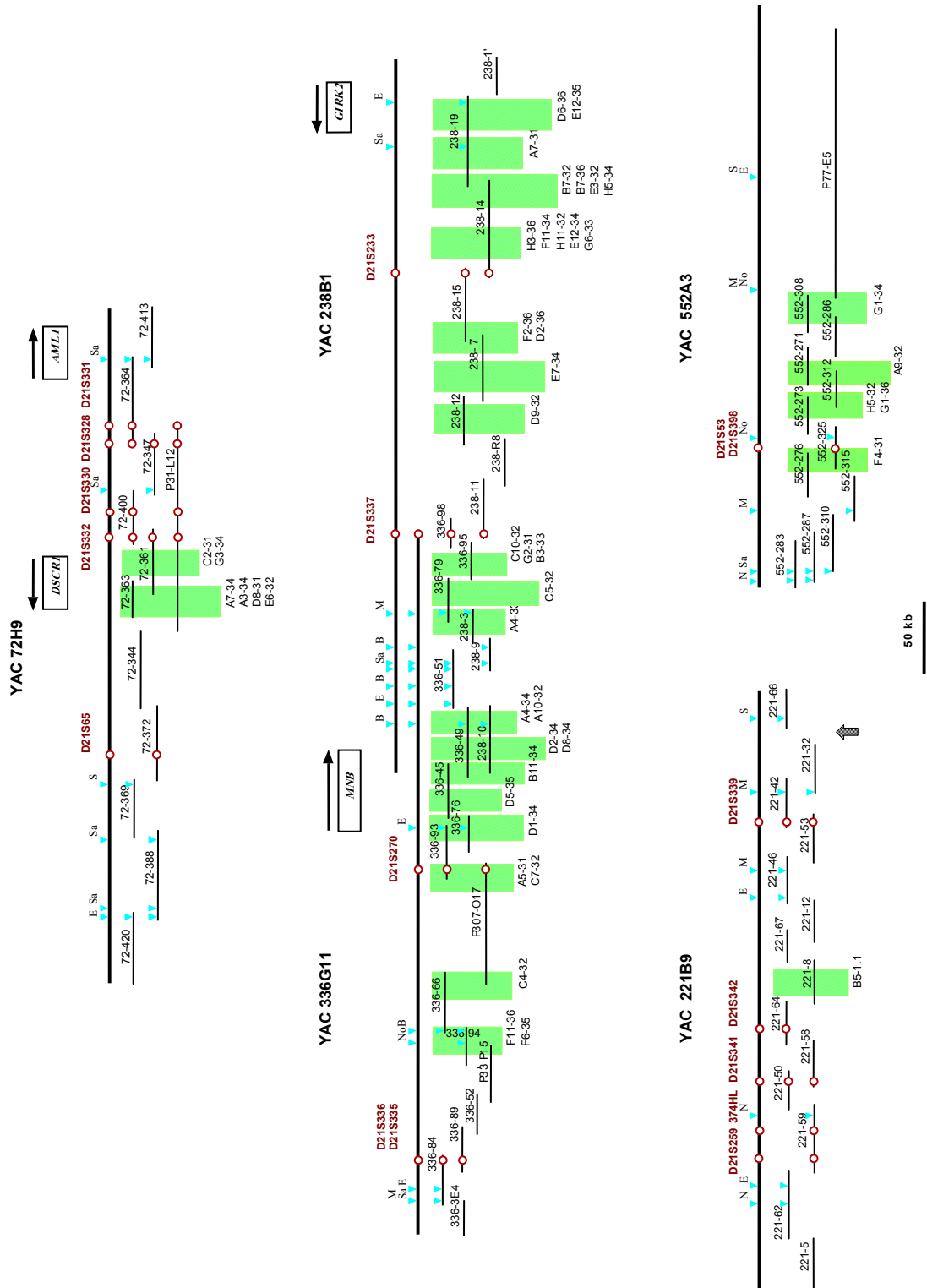


Figura 8. Mapa dels YACs, cosmids i cDNAs de 3 regions del HSA21. El contig mínim de cosmids està dibuixat a sota de cada YAC, mantenint la numeració inicial de la llibreria. Els PACs estan representats amb una P. També s'indica la posició de les dianes de restricció i dels STSs. El forat restant en el YAC 221B9, es marca amb una fletxa. Les caixes indiquen la posició dels cDNAs. Finalment s'indica l'escala del mapa.

1.3.- SEQÜENCIACIÓ DELS cDNAs I RECERCA DE SIMILITUDS

Cada cDNA putatiu es va seqüenciar i la seqüència es va comparar amb les bases de dades amb el programa BLAST-N i BLAST-X. En total es van aïllar 45 cDNAs parcials no redundants, els quals es van mapar en el contig de cosmidis, construint així el mapa transcripcional d'aquestes regions (Fig. 8). Quatre dels cDNAs, corresponien a gens descrits, concretament 3 a *DSCR1* (Fuentes et al., 1995) i un a *GIRK2* (Ferrer et al., 1995; Patil et al., 1995). Tres cDNAs tenien una similitud molt elevada amb el gen de rata *Dyrk*, resultant ser un nou gen humà, *DYRK1A/MNB* (Guimerà et al., 1996), l'homòleg del gen *minibrain* de *Drosophila* (Tejedor et al., 1995). De la resta, 12 seqüències corresponien a seqüències de les bases de dades, EST o STS. Les 25 restants no mostraven similitud amb cap seqüència de les bases de dades. Així doncs, es van identificar 37 putatives unitats de transcripció noves. Les seqüències es van dipositar al GenBank, amb números d'accés des del U81187 fins al U81231.

1.4.- ESTUDIS D'EXPRESSIÓ

Per comprovar que els cDNA representaven seqüències expressades, la doctorant va portar a terme RT-PCRs, per a cada un d'ells, utilitzant encebadors específics. El resultat va ser que tots s'expressaven en una barreja de RNA poliA⁺ de cervell, pulmó, fetge i ronyó fetals (Fig. 9).

També es va fer, per algun cDNA, experiments de Northern, en els que membranes que contenien RNA poliA⁺ aïllat de diferents teixits humans es van hibridar amb els clons aïllats usats com a sondes.

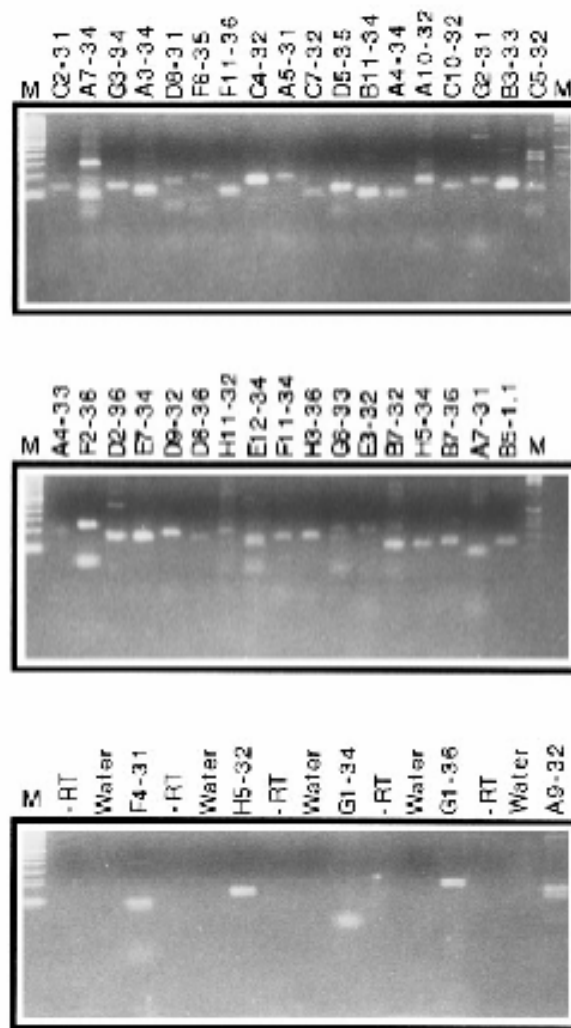


Figura 9. RT-PCR de 40 clons no-redundants. Per cada un dels clons, es van efectuar els controls de la reacció sense transcriptasa reversa i contenint aigua en lloc de DNA. Tots els controls van ser negatius.

1.5.- CARACTERITZACIÓ DELS CLONS AÏLLATS PER SELECCIÓ DE cDNA

Els clons representants de putatius nous gens del HSA21, es van intentar estendre per tal d'aïllar els cDNAs sencers.

Els clons utilitzats varen ser els que corresponien a les seqüències dipositades amb els següents números d'accés: U81205, U81206, U81207, U81208, U81209,

U81210, U81211, U81212, U81213 i U81226. En primer lloc, es van fer experiments de RACE 5' i 3' amb diferents RNAs provinents de teixits humans, adults i fetals (cervell, cor, ronyó, fetge, pulmó, pàncrees). Els productes de PCR obtinguts se subclonaven i se seqüenciaven. El resultat va ser, en algun dels casos, l'extensió d'aquests clons, però quan es van comparar amb la seqüència genòmica, varen resultar ser seqüència contínua.

En segon lloc, es van crivellar genoteques de cDNA de diferents teixits fetals (cervell, cor, fetge, ronyó), utilitzant cada un dels clons com a sonda. No es va obtenir cap clo positiu.

També es van hibridar filtres de genoteques en graelles de cDNA de diferents teixits, però quan es van seqüenciar els clons positius, només petits fragments de seqüència corresponien a part del clo, suggerint que es tractava de clons quimèrics o bé eren artefactes de la hibridació.

Finalment, es va passar la seqüència genòmica que contenia aquests clons, per programes de predicció de zones codificants, com el GRAIL o el GENSCAN. Aquests programes trobaven algunes zones codificants, però de tots els clons només reconeixien com a zona codificant els clons U81210 i U81211, que eren reconeguts formant part de la mateixa unitat transcripcional. Els intents que es van fer per RT-PCR, amb encebadors corresponents a cada un dels clons, per demostrar que realment eren integrants de la mateixa unitat transcripcional varen resultar infructuosos.

En el moment de l'escriptura d'aquesta tesi, els clons de la selecció de cDNA analitzats per la doctorant (U81205, U81206, U81208, U81209, U81210, U81211- U81212, U81213) encara no estan representats en les bases de dades d' ESTs. El cló U81207, que mapa entre *DYRK1A* i *KCNJ6*, té un altre representant a les bases de dades, tractant-se d'un EST que estén pocs pb la seqüència dipositada pel nostre grup. El cló U81226 conté un element repetitiu tipus L1 que és idèntic a altres ESTs presents en la base de dades.

2.- CARACTERITZACIÓ DEL GEN *KCNE2*

2.1.- CLONATGE DEL GEN *KCNE2*

Amb l'objectiu de trobar nous gens codificats en el HSA21, es va portar a terme una anàlisi computacional de la seqüència genòmica present en les bases de dades públiques. Es van escollir les seqüències AP000052 i AP000053, dipositades per Hattori i col·laboradors de la Kitasato University. Aquestes seqüències es van passar primer per un filtre de zones repetitives i es van utilitzar com a seqüència problema en cerques amb el programa BLAST-N per buscar ESTs humans idèntics a la seqüència genòmica i corresponents, per tant a seqüències expressades i després amb el programa BLAST-X, per buscar similituds amb seqüències codificants presents en les bases de dades. Els ESTs resultants de la cerca que tenien una major puntuació es van considerar per prosseguir l'estudi.

L'estudi va prosseguir amb l'EST nº AI246239 ja que tenia una similitud molt elevada amb el gen *KCNE1* (Murai et al., 1989) i perquè existia un EST de rata amb una gran similitud, suggerint conservació en altres espècies.

Es van realitzar altres comprovacions, com passar la zona genòmica per programes de predicció de zones codificants com el GENSCAN i el GRAIL. Tots dos programes reconeixien l'EST com a putativa zona codificant.

El primer pas va ser dissenyar encebadors dels extrems 5' i 3' (*KCNE2-1* i *KCNE2-2*), per aïllar un fragment de DNA per RT-PCR. Com que l'EST contenia un ORF (de l'anglès *open reading frame*, fase de lectura oberta) complet, el disseny es va fer de manera que el producte amplificat es pogués clonar direccionalment en el vector d'expressió en cèl·lules de mamífer pcDNA3-HA, de manera que el producte proteic s'expressés com a proteïna de fusió amb el tag HA en l'extrem amino terminal.

La RT-PCR a partir de RNA poliA⁺ de cor humà adult va donar un fragment de DNA d'uns 400 pb, que es va clonar inicialment en T-Vector. Es van seqüenciar diferents clons per tal de comprovar que no hi havia errors introduïts per la Taq polimerasa.

Per tal d'obtenir la seqüència sencera de *KCNE2*, es van dissenyar encebadors en els extrems 5' i 3' (*KCNE2-3* i *KCNE2-4*) per utilitzar en un experiment de RACE sobre cDNA de cor fetal (Fig. 10).

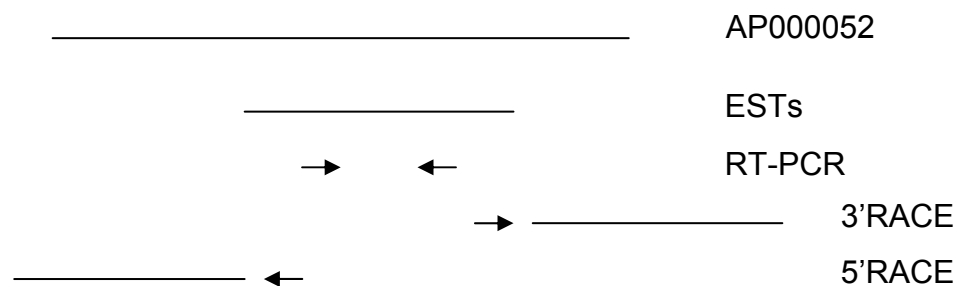


Figura 10. Estratègia de clonatge de *KCNE2*

L'ensemblatge de les seqüències dels fragments obtinguts per RT-PCR i 5' i 3' RACE, va donar lloc a un cDNA de 850 pb (Fig. 11), contenint una pauta de lectura oberta de 123 aminoàcids.

```

GTAAGGTGAAGGTGCCAGCAGGCTGAGGCTTGTGTGCAACCCAGAAGAGAGCTCGCTAA 60
CGCCAGCAAGAAGGTTTCAGAACAGCCTGGCTTTGGAAAGGAATTTTCATCCTGCCACACA 120
CTGCATTAGCAGGAGGGAAGCATGTCTACTTTATCCAATTTACACACAGACGCTGGAAGACG 180
           M S T L S N F T Q T L E D 13
TCTTCCGAAGGATTTTTATTACTTATATGGACAATTGGCGCCAGAACACAACAGCTGAGC 240
V F R R I F I T Y M D N W R Q N T T A E 33
AAGAGGCCCTCCAAGCCAAAGTTGATGCTGAGAACTTCTACTATGTCATCCTGTACCTCA 300
Q E A L Q A K V D A E N F Y Y V I L Y L 53
TGGTGATGATTGGAATGTTCTCTTTTCATCATCGTGGCCATCCTGGTGAGCACTGTGAAAT 360
M V M I G M F S F I I V A I L V S T V K 73
CCAAGAGACGGGAACACTCCAATGACCCCTACCACCAGTACATTGTAGAGGACTGGCAGG 420
S K R R E H S N D P Y H Q Y I V E D W Q 93
AAAAGTACAAGAGCCAAATCTTGAATCTAGAAGAATCGAAGGCCACCATCCATGAGAACA 480
E K Y K S Q I L N L E E S K A T I H E N 113
TTGGTGCGGCTGGGTTCAAATGTCCCCCTGATAAGGGAGAAAGGCACCAAGCTAACATC 540
I G A A G F K M S P * 123
TGACGTCCAGACATGAAGAGATGCCAGTGCCACGAGGCAAATCCAAATTGTCTTTGCTTA 600
GAAGAAAGTGAGTTCCTTGCTCTCTGTTGAGAATTTTCATGGAGATTATGTGGTTGGCCA 660
ATAAAGATAGATGACATTTCAATCTCAGTGATTTATGCTTGCTTGTGGAGCAATATTTTG 720
TGCTGAAGACCTCTTTTACTTTCCGGGCAAGTGAATGTCATTTTAATCAATATCAATGAT 780
GAAAATAAAGCCAAATTTGAAGAAAAA 809

```

Figura 11. Seqüència de *KCNE2*. La pauta de lectura oberta (en negreta) és de 123 aminoàcids, el codó d'aturada està marcat amb en negreta, i el senyal de poliadenilació està subratllat.

Amb una sonda que contenia tota la pauta de lectura oberta, es va crivellar una genoteca de cDNA de cor fetal humà. Cap dels clons positius va aportar més seqüència que l'obtinguda amb les RACEs.

El codó per a la metionina iniciadora està en la posició 141, precedit per un codó de terminació en fase. El 3'-UTR (de l'anglès *untranslated region*, regió no

traduïda) de 297 pb conté un senyal consens de poliadenilació AATAAA (Proudfoot, 1991; Colgan i Manley, 1997) i finalitza en una cua de poliA. Considerant l'elevada similitud amb *KCNE1*, al nou gen se li va donar el nom de *KCNE2* (dipositat al Genbank amb nº d'accés AF302095).

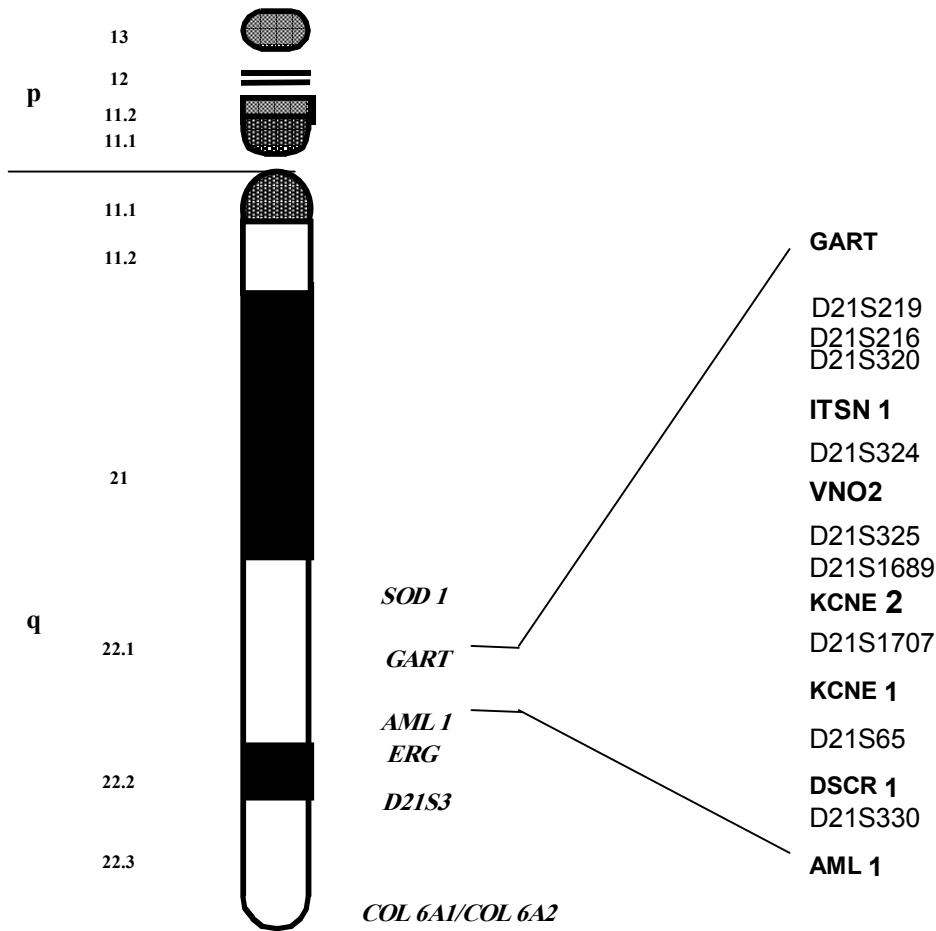
2.2.- ESTRUCTURA GENÒMICA DE *KCNE2*

La seqüència de cDNA es va comparar amb el fragment genòmic AP00052 per determinar l'organització genòmica de *KCNE2*. L'estructura genòmica és similar a la de *KCNE1* (Splawski et al., 1998), amb un únic exó codificant (Taula 9). Les seqüències donadores/acceptores d'splicing, estan conservades (Shapiro i Senapathy, 1987).

Exó	Mida	5'splice	Intró	Mida	3'splice
1	128	ACTGCATAG gta agtctta	1	6253	atggtt gtaag GTGAAGGTG
2	681				

Taula 9. Organització genòmica de *KCNE2*.

KCNE2 mapa a 21q22.1, entre els marcadors D21S1689 i D21S1707, a 78 Kb de *KCNE1*, i es transcriu de centròmer a telòmer, en sentit contrari a *KCNE1* (Fig. 12).



B)

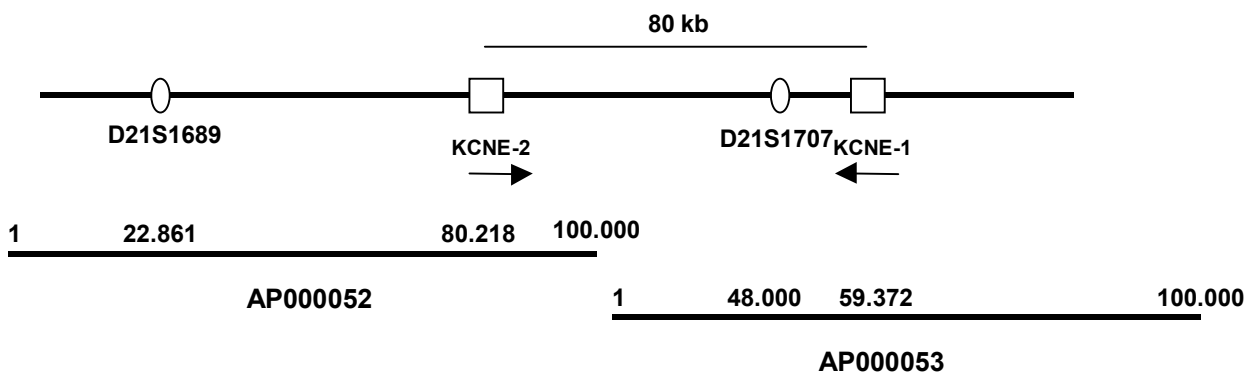


Figura 12. Localització cromosòmica de *KCNE2*. A) *KCNE2* es localitza al HSA21q22.1, entre els marcadors D21S1689 i D21S1707. B) *KCNE2* està situat a 78 kb de *KCNE1*, i es transcriu en sentit contrari de *KCNE1*.

2.3.- CARACTERITZACIÓ DEL PATRÓ D'EXPRESSIONIÓ DE *KCNE2*

Per tal d'analitzar el patró d'expressió de *KCNE2*, es va hibridar una membrana que contenia RNA poliA⁺ de diferents teixits adults humans amb la zona codificant del gen com a sonda. La hibridació es va fer a 65°C en tampó ExpressHyb.

La mateixa membrana es va hibridar amb la zona codificant de *KCNE1*, per tal de descartar la possibilitat de que es pogués donar reactivitat creuada. Les condicions d'hibridació i dels rentats de la membrana van ser les mateixes que per *KCNE2*. Com a control es va utilitzar una sonda de β -actina.

La sonda de *KCNE2* va detectar una banda de 1.35 Kb a cor i a múscul esquelètic (Fig. 13). La intensitat de les bandes no és la mateixa, sent molt més intensa la de cor, indicant una expressió més elevada d'aquest mRNA a cor que a múscul esquelètic. Es detecten unes bandes de mida menor i molt menys intenses a pàncrees i fetge, suggerint l'existència d'splicing alternatiu o punts diferents de poliadenilació, com s'han descrit per *KCNE1* (Zhang et al., 1994).

La sonda de *KCNE1* va detectar una banda de 3.5 Kb a cor i a ronyó (Fig. 13). Igual que en el cas de *KCNE2*, la intensitat de la banda detectada a cor és més gran que la de ronyó.

El control utilitzat de β -actina, ens indica que les diferents intensitats de les bandes són el resultat d'una expressió dels RNAs diferents en cada teixit, i que no és resultat d'una càrrega diferent de cada un dels RNAs del Northern.

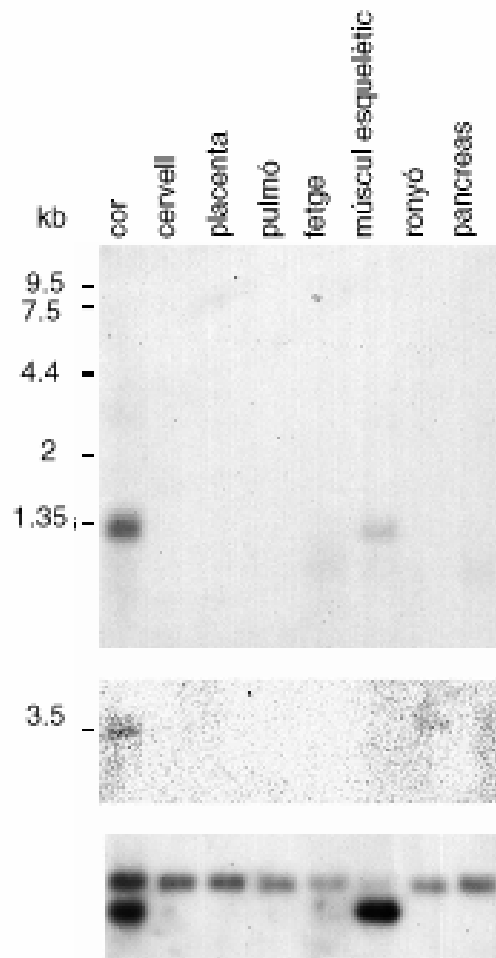
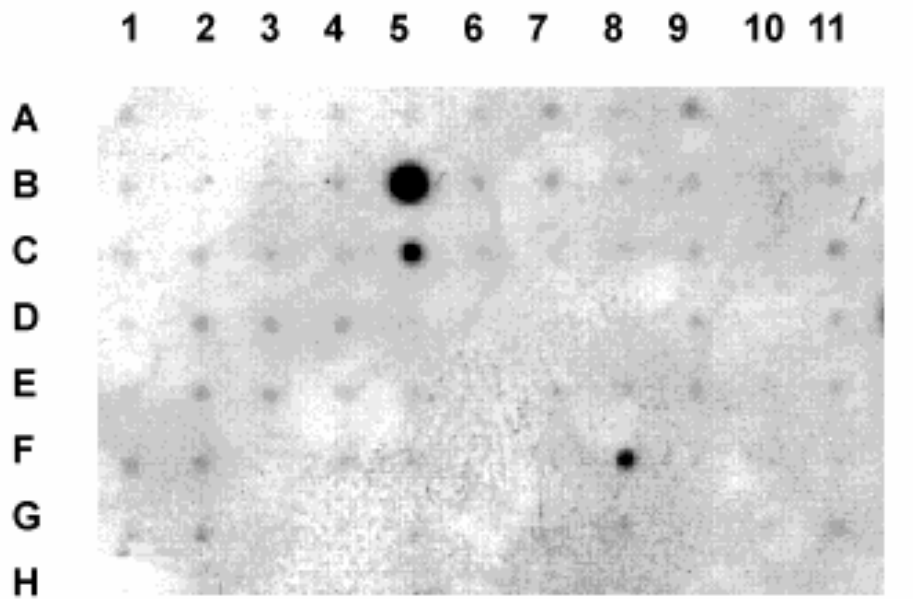


Figura 13. Northern de teixits adults humans hibridat amb sondes específiques de *KCNE2*, *KCNE1* i el control de β -actina.

Aquest experiment de Northern ens dóna informació de la mida del transcript, i si s'expressa o no en un grup de teixits molt reduït. Per tal d'aprofundir en el patró d'expressió de *KCNE2*, es va hibridar una membrana que contenia mRNA poliA⁺ d'un gran nombre de teixits humans adults i fetals (MTE de l'anglès: *Multiple tissue expression*).

A les poques hores d'exposició de la membrana, s'observa un senyal molt intens a estómac, i s'intueix a duodè i a testicles (Fig. 14). Segons l'experiment de

Northern, esperaríem senyal a cor i múscul esquelètic. Quan la membrana s'exposa durant temps llargs, la intensitat del senyal a cor augmenta. Aquestes diferències es poden explicar per la quantitat de RNA poliA⁺ que contenen les dues membranes. Mentre que en el Northern hi ha 2 µg de RNA poliA⁺ per teixit, en el MTE n'hi ha al voltant de 250 ng per teixit, que en l'últim cas podria dificultar la detecció a cor. Per tant, *KCNE2* s'expressa a nivells incomparablement més alts a estómac que a cor o múscul esquelètic. Als mateixos nivells que en teixits adults, es detecta expressió en tots els teixits fetals presents en la membrana, amb una expressió lleugerament més elevada a ronyó i pulmó.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Cervell	Cerebel Esquerra	Substància nigra	Cor	Esòfag	Colon transvers	Ronyó	Pulmó	Fetge	Leucèmia HL-60	Cervell fetal
B	Còrtex cerebral	Cerebel Dret	Nuclí accumbens	Aorta	Estómac	Colon descendent Recte	Múscul Esquelètic	Placenta	Pàncrees	HeLaS3	Cor Fetal
C	Lòbul Frontal	Cos Callós	Tàlem	Aurícula esquerra	Duodè		Melsa	Bufeta	Glàndula Adrenal	Leucèmia K-562	Ronyó Fetal
D	Lòbul Parietal	Amígdala	Glàndula Pituitària	Aurícula Dreta	Ieü		Timus	Úter	Glàndula Tiroides	Leucèmia MOLT-4	Fetge Fetal
E	Lòbul Occipital	Nuclí Caudat	Espina Cordal	Ventricle esquerra	Ileum		Sang Perifèric	Pròstata	Glàndula Salival	Limfoma de Burkitt	Melsa Fetal
F	Lòbul Temporal	Hipocamp		Ventricle Dret	Iloceum		Nòdul Limfàtic	Testicle	Glàndula Mamària	Adenocarcinoma Colorectal	Timus Fetal
G	pg còrtex cerebral	Medulla Oblongada		Septe interventric. ric.	Apèndix		Mollí d'os	Ovari		Carcinoma Pulmó	Pulmó Fetal
H	Pons	Putamen		Àpex	Colon Ascendent		Tràquea				

Figura 14. Membrana de mRNA poliA⁺ de diferents teixits hibridada amb una sonda de *KCNE2*.

2.4.- ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA DE LA PROTEÏNA KCNE2

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de KCNE2 realitzada amb el programa ExPASy, va determinar que el pes molecular esperat de la proteïna era de 14,472 kDa i el punt isoelèctric teòric de 5.75.

El programa PROSITE, identifica dues seqüències consens de N-glicosilació, en les posicions 6 (NFT) i 29 (NTT), dues seqüències consens de llocs de fosforilació per la proteïna quinasa C en les posicions 71 (TVK) i 74 (SKR), quatre llocs de fosforilació per la caseïna quinasa II en les posicions 10 (TLED), 21 (TYMD), 30 (TTAE) i 109 (TIHE). Finalment troba un únic lloc de fosforilació per la tirosin quinasa en la posició 48 (KVCAENFYF).

Finalment, el programa SMART reconeix un segment transmembrana de 21 aminoàcids, entre les posicions 49 i 69 (VILYLMVMIGMFSFIIVAILV).

2.5.- ANÀLISI COMPARATIVA DE KCNE2 EN MAMÍFERS

Utilitzant el programa BLAST-X a la bases de dades d'ESTs d'altres espècies, es van trobar ESTs de ratolí i de rata que podrien correspondre als ortòlegs de *KCNE2* en aquestes espècies. Quan es van comparar amb les pautes de lectura oberta predites, la identitat d'aminoàcids va ser molt elevada, 82% (95% de similitud) de la seqüència de rata i 84% d'identitat (97% de similitud) quan es compara la proteïna humana amb la proteïna inferida a partir dels ESTs de ratolí presents a les bases de dades.

En el fragment transmembrana és on la identitat d'aminoàcids és més elevada, seguit del fragment C-terminal més proper a la regió transmembrana (Fig. 15).

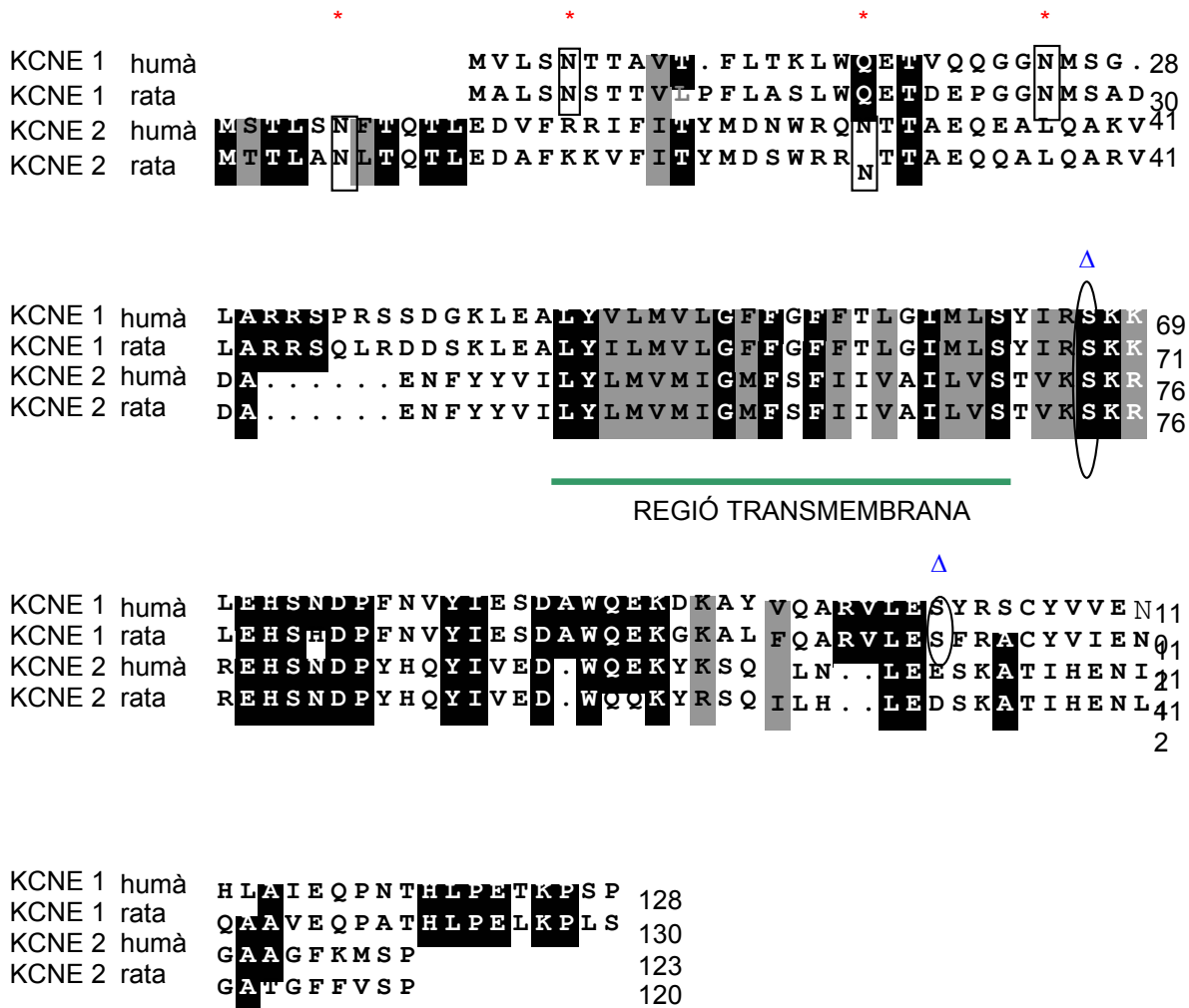


Figura 15. L'alineament múltiple de proteïnes es va portar a terme amb el programa CLUSTALW. Les caixes negres indiquen aminoàcids idèntics. Les caixes grises, aminoàcids similars. Els putatius llocs de glicosilació es marquen amb estrelles, el putatiu lloc de fosforilació per la proteïna quinasa C amb triangles, i la ratlla indica el fragment transmembrana. KCNE1 humà: XP-009745; KCNE1 rata: NP-037105; KCNE2 humà: aquesta tesi; KCNE2 rata: Q9WTW0.

La identitat a nivell d'aminoàcids és del 30% entre KCNE1 i KCNE2 humans, mentre que la identitat entre KCNE1 de rata i KCNE1 humà és del 77% i entre KCNE2 de rata i KCNE2 humà és del 82% (Taula 10).

	KCNE 1 humà	KCNE 1 rata	KCNE 2 humà	KCNE 2 rata
KCNE 1 humà		77%	30%	28%
KCNE 1 rata			28%	33%
KCNE 2 humà				82%
KCNE 2 rata				

Taula 10. Comparació entre les identitats a nivell d'aminoàcids entre KCNE1, KCNE2 humans i els seus ortòlegs de rata.

2.6.- EXPRESSIÓ DE KCNE2: TRADUCCIÓ *IN VITRO*

Per comprovar si el cDNA aïllat codificava una proteïna, la pauta de lectura oberta es va clonar en el plasmidi d'expressió en cèl·lules de mamífer pcDNA3-HA. El clonatge es va fer de manera que la proteïna quedava fusionada en el seu extrem N-terminal amb un pèptid de l'hemaglutinina del virus de la grip (HA-tag) reconegut per anticossos comercials i sota el control del promotor del citomegalovirus. A més a més, en el plasmidi pcDNA3-HA, el cDNA queda sota el control d'un promotor de la RNA polimerasa del fag T7, de manera que es pot utilitzar per fer experiments de transcripció/traducció *in vitro*.

Com a control positiu es va clonar la pauta de lectura oberta de *KCNE1* humà, mitjançant una RT-PCR amb encebadors específics (KCNE1-1 i KCNE1-2) a partir de cDNA de cor fetal. La identitat del fragment amplificat es va comprovar per seqüenciació. La pauta de lectura oberta es va subclonar en el plasmidi pcDNA3-HA de manera similar a KCNE2. Es pot observar que els dos cDNAs s'expressen *in vitro* (Fig. 16).

En els carrils corresponents a KCNE1 i KCNE2, es poden observar dues bandes, de pesos moleculars al voltant del 19 kDa i 22 kDa per KCNE1 i 16 kDa i 20 kDa per KCNE2. Com que l'anàlisi de la seqüència de la proteïna indicava llocs

putatiu de N-glicosilació, es pot suggerir que les bandes de pesos moleculars més alts, podrien correspondre a les proteïnes glicosilades.

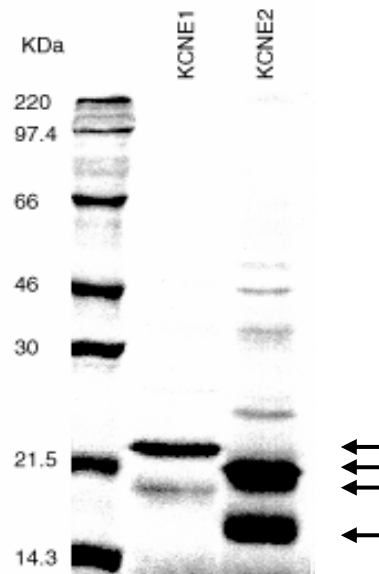


Figura 16. pcDNA3-HA-KCNE1 i pcDNA3-HA-KCNE2, van ser utilitzats en experiments de transcripció/traducció *in vitro* en presència de ^{35}S -Metionina. Les mostres es van separar en un gel d'acrilamida-SDS al 7%. S'indica el pes molecular dels marcadors utilitzats en kDa així com la posició dels productes obtinguts.

2.7.- EXPRESSIÓ DE KCNE2 EN CÈL·LULES DE MAMÍFER: ESTUDI DE LA GLICOSILACIÓ DE LA PROTEÏNA

Per comprovar si la proteïna KCNE2 s'expressava en cèl·lules de mamífer, es van transfectar cèl·lules COS-7 amb els vectors d'expressió pCDNA3-KCNE2 i pCDNA3-KCNE1. L'expressió d'ambdues proteïnes pot ser detectada amb un anticòs dirigit contra el pèptid HA.

En experiments de western amb extractes de cèl·lules transfectades, l'anticòs detecta tres bandes, essent la més petita la del pes molecular esperat (Fig. 17). Per comprovar si les bandes de pes molecular més gran corresponien a la proteïna glicosilada, les cèl·lules transfectades es van tractar amb tunicamicina,

un inhibidor de la N-glicosilació i els extractes cel·lulars es van analitzar per western blot. El resultat va ser la desaparició de les bandes més altes, amb el consegüent augment de les bandes de menor pes molecular (Fig. 17). Aquest fet suggereix que les bandes de menor mobilitat són producte de la N-glicosilació.

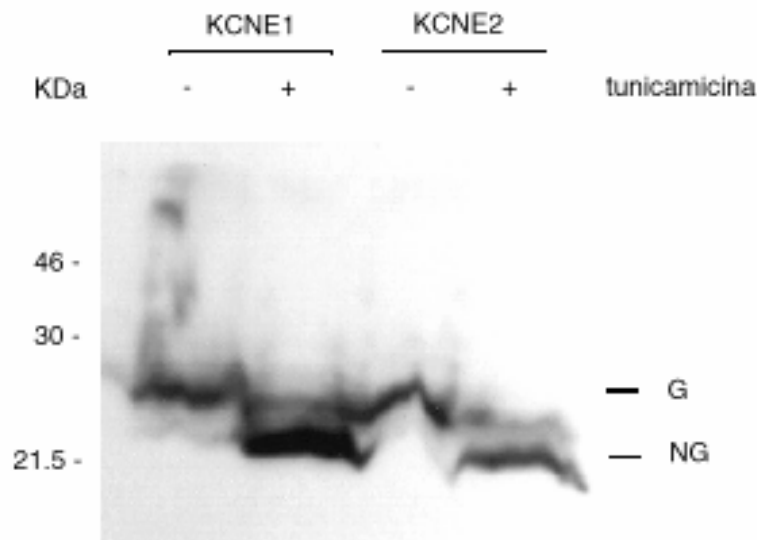


Figura 17. Cèl·lules COS-7 es van transfectar amb pCDNA3-KCNE2 i pCDNA3-KCNE1 amb lipofectina. 24 h abans de preparar els extractes, les cèl·lules es van tractar amb tunicamicina (10 µg/ml). Els extractes es van separar en un gel d'acrilamida-SDS al 15%, van ser transferits a una membrana de nitrocel·lulosa, i les proteïnes es van revelar amb l'anticòs monoclonal anti-HA, HA11. Els signes +/- indiquen la presència o absència de tunicamicina en el cultiu. S'indiquen els pesos moleculars dels marcadors utilitzats en kDa, així com els productes obtinguts. G: glicosilat; NG: no glicosilat.

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de KCNE2, mostrava dos llocs putatius de N-glicosilació en les posicions 6 i 29. Per comprovar si aquestes seqüències consens eren realment llocs glicosilables es van generar mutants en els quals es canviava l'aminoàcid que es glicosila, asparagina (N) per glutamina (Q). Es van generar dos mutants, N6Q i N29Q. El primer té mutat el primer lloc de N-glicosilació, l'aminoàcid 6, el segon té mutat el segon lloc de N-glicosilació, l'aminoàcid 29.

Per comprovar l'expressió de les proteïnes mutades, es van transfectar a cèl·lules COS-7, amb els vectors que contenien les diferents mutacions i es van preparar extractes proteics de cèl·lules no tractades i tractades amb tunicamicina.

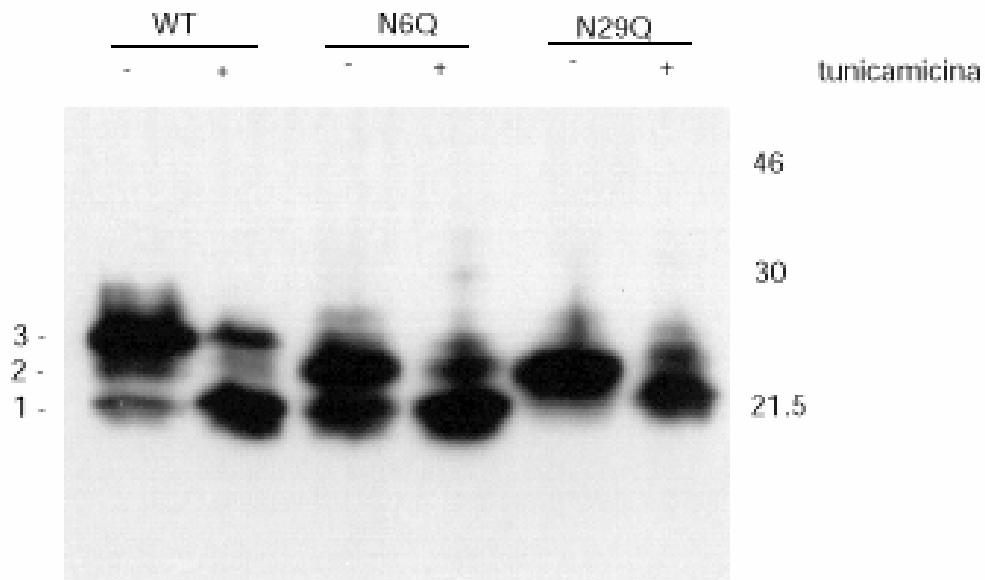


Figura 18. Cèl·lules COS-7 es van transfectar amb pCDNA3-KCNE2 N6Q i pCDNA3-KCNE2 N29Q amb lipofectina. 24 h abans de preparar els extractes, les cèl·lules es van tractar amb tunicamicina (10 μ g/ml). Els extractes es van separar en un gel d'acrilamida-SDS al 15%, van ser transferits a una membrana de nitrocel·lulosa, i les proteïnes es van revelar amb l'anticòs anti-HA, HA11. Els signes +/- indiquen la presència o absència de tunicamicina en el cultiu. S'indiquen els pesos moleculars dels marcadors utilitzats en kDa, així com els productes obtinguts, marcadors de major a menor mobilitat electroforètica com a 1,2,3.

En l'extracte procedent de la transfecció amb el cDNA salvatge, s'observen tres bandes de proteïnes, sent la banda de menor pes (anomenada 1 en la Fig. 18) la corresponent al pes molecular estimat. En els extractes procedents de transfeccions amb cDNAs amb un lloc de glicosilació mutat, ja sigui en la posició N6 o N29, s'observa que desapareix la banda de pes molecular més alt (anomenada 3 en la Fig. 18). En els extractes tractats amb tunicamicina, les bandes d'alt pes molecular (bandes 2 i 3 de la Fig. 18), disminueixen d'intensitat

amb un augment equivalent d'intensitat en la banda de menor pes molecular. Aquests resultats es podrien explicar si la banda de pes molecular més gran correspongués a la proteïna doblement glicosilada, donat que desapareix quan es muten qualsevol dels llocs de glicosilació. La banda intermèdia (2 en la Fig. 18) podria correspondre a la proteïna glicosilada només en un lloc (N6 o N29), i finalment la banda de pes molecular més baix correspondria a la proteïna no glicosilada. Aquesta banda es pot observar com una banda doble. Es pot suggerir que aquest canvi de mobilitat podria ser el resultat de la fosforilació per alguna quinasa, incloent la proteïna quinasa C en el seu lloc consens (S74).

2.8.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE KCNE2

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de KCNE2, predeia una regió transmembrana, a l'igual que KCNE1. De fet, s'ha demostrat que KCNE1 es localitza a la membrana plasmàtica, amb l'extrem N-terminal cap al medi extracel·lular (Busch i Suessbrich, 1997). Per confirmar si KCNE2 traslocava a la membrana cel·lular, amb la mateixa topologia que KCNE1, es van transfectar cèl·lules COS-7, amb pCDNA3-KCNE2 i pCDNA3-KCNE1, i es va analitzar l'expressió d'ambdues proteïnes mitjançant immunofluorescència indirecta de cèl·lules fixades i permeabilitzades amb un anticòs dirigit contra el pèptid HA.

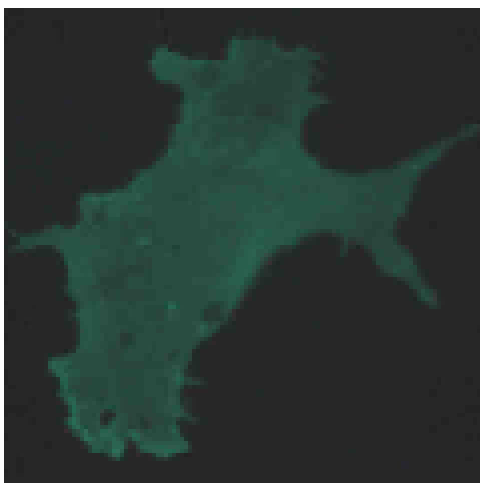
Com s'ha explicat anteriorment, tant KCNE1 com KCNE2 es van subclonar de manera que quedessin fusionades per l'extrem N-terminal amb el pèptid HA. Si com passava per KCNE1, KCNE2 tenia l'extrem N-terminal extracel·lular, el senyal específic se seguiria observant quan les cèl·lules no es permeabilitzessin.

En les cèl·lules transfectades fixades i permeabilitzades s'observa senyal específic localitzat asimètricament en la cèl·lula (Fig. 19 B), amb una gran concentració de la proteïna amb un patró perinuclear, indicador típic de localització en l'aparell de Golgi, on tindria lloc l'addició dels sucres. De fet s'observa una concentració de la tinció en estructures que podrien correspondre a l'aparell de Golgi quan les cèl·lules són tractades amb tunicamicina (Fig. 19C). Quan les cèl·lules no són permeabilitzades, es detecta senyal en tota la superfície

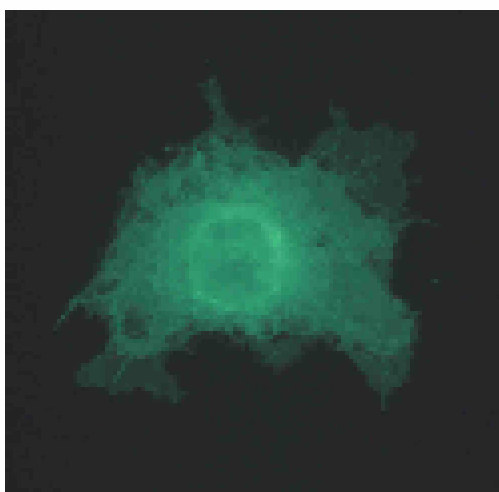
de la cèl·lula (Fig. 19 A), indicant que KCNE2 s'insereix en la membrana amb el seu extrem N-terminal cap al medi extracel·lular.

Figura 19. Cèl·lules COS-7 es van transfectar amb pcDNA3-KCNE2 amb lipofectina. Les cèl·lules es van fixar amb 4% paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.1% Triton X-100, en els casos indicats. A: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE2 i no permeabilitzades. B: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE2 i permeabilitzades C: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE2, tractades amb tunicamicina 10 µg/ml durant 24 h i permeabilitzades.

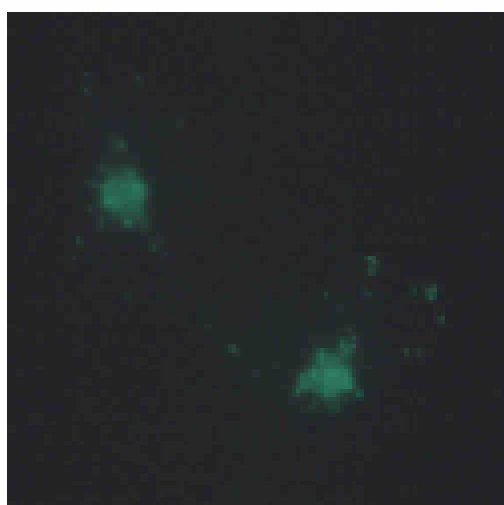
A



B

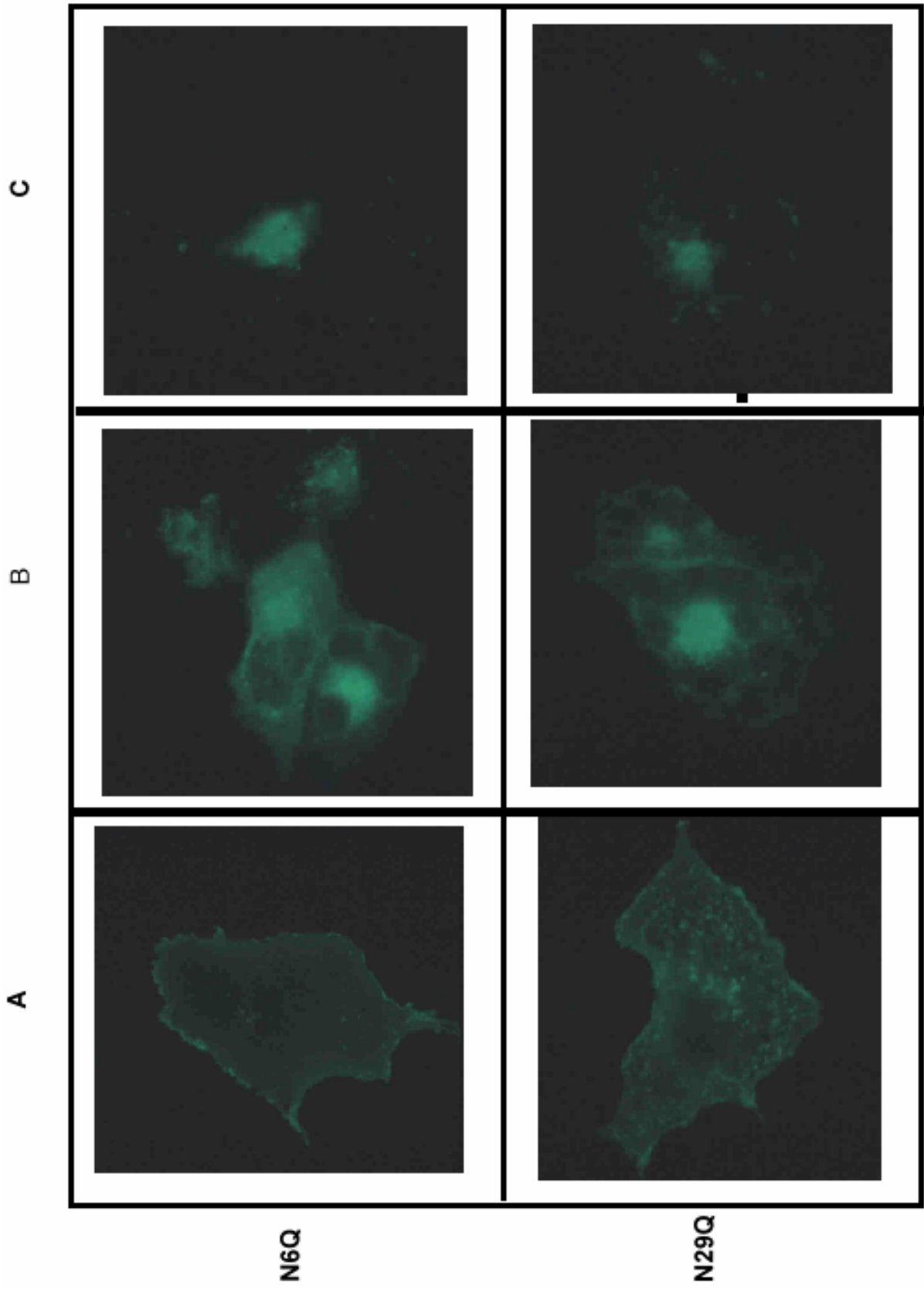


C



Per comprovar l'efecte de la glicosilació sobre la localització subcel·lular, es va analitzar la localització subcel·lular dels diferents mutants de glicosilació que s'havien generat. Els resultats de la immunofluorescència es mostren a la Fig. 20.

Figura 20. Cèl·lules COS-7 es van transfectar amb pcDNA3-KCNE2 N6Q i pcDNA3-KCNE2 N29Q amb lipofectina. Les cèl·lules es van fixar amb 4% paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.1% Triton X-100, en els casos indicats. A: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE2 N6Q o N29Q i no permeabilitzades. B: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE2 N6Q o pcDNA3-KCNE2 N29Q permeabilitzades. C: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE2 N6Q o pcDNA3-KCNE2 N29Q, tractades amb tunicamicina. Les fotografies a A estan exposades el triple de temps que les presentades a la Fig. 19A



Quan les cèl·lules no es permeabilitzen, tant en N6Q com en N29Q, s'observa una marcada disminució de la fluorescència, si es compara amb els resultats de la transfecció de la proteïna salvatge (Fig. 19), suggerint la necessitat de la glicosilació per a la integració a la membrana. L'existència però, de certa quantitat de proteïna en la membrana indica que amb un únic residu glicosilat n'hi ha prou per integrar-s'hi, amb l'extrem N-terminal dirigit cap a l'exterior de la cèl·lula. Estudis amb el doble mutant de glicosilació clarificarien la importància de la N-glicosilació en KCNE2. Quan les cèl·lules es permeabilitzen, s'observa un patró de distribució perinuclear, com passava amb la proteïna salvatge, indicant que les proteïnes mutades se sintetitzarien correctament i passarien a l'aparell de Golgi on tindria lloc l'addició de sucres.

2.9.- SOBREEXPRESSIÓ EN LA SÍNDROME DE DOWN

KCNE2, mapa en la regió crítica de la SD. Per veure si aquest gen està sobreexpressat en la SD, com seria d'esperar en tenir-ne tres còpies, es va intentar un Northern comparatiu entre teixits provinents de fetus amb SD i teixits provinents de fetus controls no-SD. Per disponibilitat i com que s'havia detectat expressió de RNA en cor adult, es va purificar RNA de cor de fetus amb SD i control. Els Northern es van hibridar amb sondes específiques per *KCNE1* i *KCNE2*. No obstant, no es van poder detectar bandes específiques per *KCNE1* ni per *KCNE2*, ni en teixits controls ni en SD (dades que no es mostren).

Aquest resultat podria estar suggerint una expressió molt baixa en cor fetal, i per tant es va intentar una altra estratègia, una RT-PCR semiquantitativa. Utilitzant com a motlle RNA poliA⁺ es va preparar un cDNA amb oligo dT com a encebador i posteriorment això va ser utilitzat com a motlle i els encebadors *KCNE1-5*, *KCNE1-6*, *KCNE2-5* i *KCNE2-6* per fer una PCR, utilitzant com a control intern els encebadors del gen gliceraldehid 3-fosfat-deshidrogenasa (*GADPH*). Prèviament es van realitzar tots els controls apropiats per tal d'assegurar que s'estava amplificant mRNA i no el possible DNA genòmic contaminant (Fig. 21). Quan es van quantificar les bandes obtingudes, amb un densitòmetre (programa

Phoretix), i es van comparar, normalitzant-les segons els controls de la *GADPH*, es va observar que l'expressió de *KCNE1* i de *KCNE2* era lleugerament menor en els teixits SD que en els teixits controls. Els resultats suggereixen que no hi ha sobre-expressió en cor fetal SD ni de *KCNE1* ni de *KCNE2*, tot i que s'hauria de reproduir l'experiment utilitzant un nombre de mostres més gran. També és possible que la sobre-expressió només tingui lloc en alguns teixits en particular o en alguna etapa concreta.

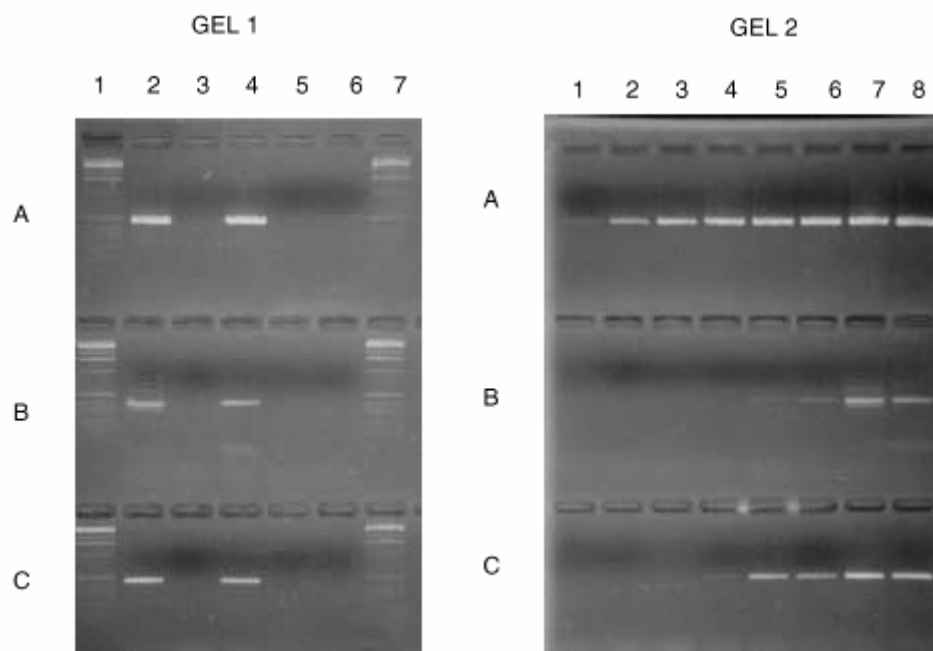


Figura 21. RT-PCR de teixits de pacients Síndrome de Down (SD) i de pacients controls (CTRL). Gel 1; Carril 1 i 7: marcador. Carril 2: CTRL amb RT. Carril 3: CTRLsense RT. Carril 4: SD amb RT. Carril 5: SD sense RT. Carril 6: RT-PCR sense RNA. Gel 2; Carril 1: CTRL-25 cicles. Carril 2: SD-25 cicles. Carril 3: CTRL-30 cicles. Carril 4: SD-30 cicles. Carril 5: CTRL-35 cicles. Carril 6: SD-35 cicles. Carril 7: CTRL-40 cicles. Carril 8: SD-40 cicles. A: encebadors de la *GADPH*. B: encebadors de *KCNE1*. C: encebadors de *KCNE2*.

2.10.- CERCA DE MUTACIONS EN PACIENTS DE SORDESA

L'any 1996, D. E. Vetter i col·laboradors van publicar que ratolins deficients en *kcne1* tenien defectes en l'oïda interna (Vetter et al., 1996). De fet, *KCNE1* està mutat en pacients amb síndrome JLN (Tyson et al, 1997) que cursa amb sordesa. Considerant l'homologia a nivell de seqüència, es va plantejar com hipòtesi la possible implicació de *KCNE2* en sordeses congènites no sindròmiques.

El grup d'estudi de sordesa del CGMM-IRO disposava d'un centenar de mostres de DNA de pacients de sordesa pels quals havien estat descartades les mutacions més habituals, la A1555G del DNA mitocondrial (Estivill et al., 1998a) i la 35delG del gen *GJB2* (gen que codifica la connexina-26) (Estivill et al., 1998b). En aquest grup de pacients es van buscar mutacions a *KCNE2* amb el mètode de SSCP.

El primer pas va ser buscar les condicions apropiades per amplificar per PCR, amb els encebadors KCNE2-5 i KCNE2-6, la zona codificant del gen a partir de DNA extret de sang de controls. Com que *KCNE2* té una zona codificant de menys de 400 bp, aquest pas es va poder fer en una sola ronda. Amb les condicions descrites en l'apartat de Materials i Mètodes es van analitzar els DNAs de 112 pacients. Dos d'aquests (P65 i P100) presentaven bandes diferents quan es corria el gel de SSCPs (Fig. 22A). Els productes amplificats es van seqüenciar i es va trobar un canvi de nucleòtid A-G en heterozigosi, en la posició 22, que dona lloc a un canvi d'aminoàcid T-A, (Fig. 22B). Aquest canvi afectaria el punt de glicosilació, doncs la seqüència consens de glicosilació és N X T/S. En el cas del P65 no es va fer anàlisi de mostres de familiars, doncs corresponia a un nen adoptat. Pel P100 es va analitzar el DNA d'una germana del pacient no afectada, en la qual no es va trobar la mutació.

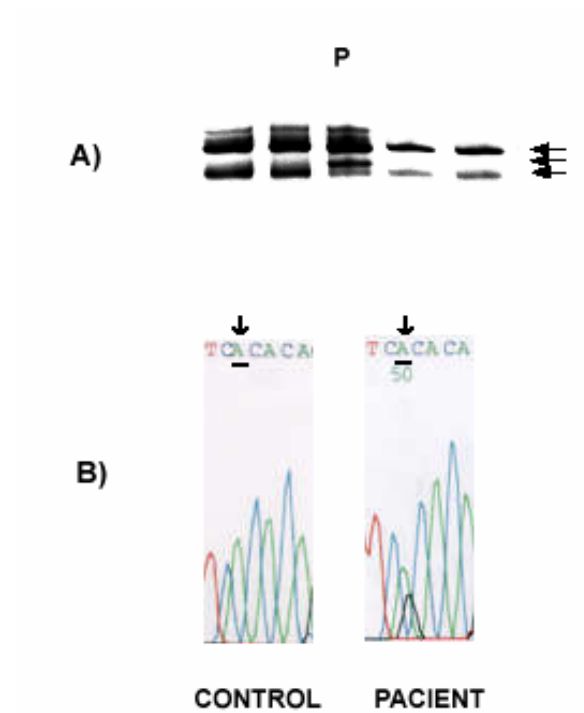


Figura 22. A) gel d'acrilamida al 12% on s'observa un patró de mobilitat de bandes diferent en el carril P. B) anàlisi del cromatograma de la seqüència de *KCNE2* on es pot observar el canvi de nucleòtid A-G en la posició 22.

3.- CARACTERITZACIÓ DEL GEN *KCNE3*

3.1.- CLONATGE DE *KCNE3*

Considerant que *KCNE1* i *KCNE2* semblaven formar part d'una família de gens codificants de subunitats β de canals de potassi activats per voltatge, es va decidir comprovar si aquesta nova família de proteïnes tenia més representants en humans.

L'aproximació experimental seguida en aquestes cerques va ser la següent: la seqüència de nucleòtids de *KCNE1* i *KCNE2* es van utilitzar com a seqüència problema en les cerques amb el programa tBLAST-X contra les bases de dades públiques d'ESTs. ESTs resultants de la cerca que tenien una major puntuació es van considerar per prosseguir l'estudi.

L'estudi va prosseguir amb 8 EST ja que tenien una similitud molt elevada amb *KCNE1* i *KCNE2*. La cerca en la base de dades d'ESTs d'altres organismes va identificar ESTs de ratolí i de rata amb una gran similitud, suggerint conservació en altres espècies. Quan es va passar la seqüència consens per programes de predicció de zones codificants com el GENSCAN i el GRAIL, tots dos programes reconeixien una putativa zona codificant.

Per l'aïllament del nou gen putatiu, es van dissenyar encebadors dels extrems 5' i 3' de la seqüència consens (*KCNE3-1* i *KCNE3-2*), per aïllar un fragment de DNA per RT-PCR. Com que la seqüència consens contenia un ORF complet, a l'igual que *KCNE2*, el disseny es va fer de manera que el producte amplificat es pogués clonar direccionalment en el vector d'expressió en cèl·lules de mamífer pcDNA3-HA. La RT-PCR de colon humà adult va donar una banda d'uns 400 bp, que es va clonar inicialment en T-Vector. Es van seqüenciar diferents clons per comprovar que la Taq polimerasa no hagués introduït errors.

Per tal d'obtenir la seqüència sencera de *KCNE3*, es van dissenyar encebadors en els extrems 5' i 3' (*KCNE3-3* i *KCNE3-4*) per utilitzar en un experiment de RACE sobre cDNA de colon adult humà (Fig. 23).

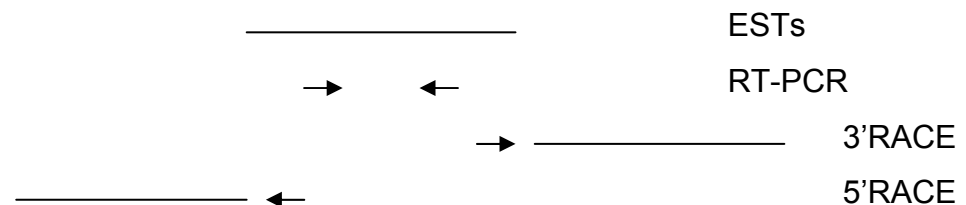


Figura 23. Estratègia de clonatge de *KCNE3*.

Després de dues rondes de RACE, l'ensamblatge de les seqüències dels fragments obtinguts, va donar lloc a un cDNA de 1633 pb (Fig. 24) contenint una pauta de lectura oberta de 103 aminoàcids

El codó per a la metionina iniciadora es troba en la posició 293, precedit per un codó de terminació en fase. El 3'UTR és de 1030 pb, en el que no es distingeix cap senyal consens de poliadenilació. La seqüència continguda entre els residus 1557-1635 presenta similitud a elements repetitius tipus MER22. Considerant l'elevada similitud amb *KCNE1* i *KCNE2*, al nou gen se li va donar el nom de *KCNE3* (dipositat al Genbank amb el nº d'accés AF302494)

```

CGGCTGGTGAATGCACAGGGTTCGACAGCGCTTGGGCCACCCTCGGTCAGAGGGCGCCGTG 60
TCCAGCGAGCAAACGGGGCGCCCCGGAGCCTTGCTGAGGCAGCTCTGGGCTTTCCCAGCTC 120
CGAAGTCAATACTGAGATCCCAGATGTGTCCAGAGACATCCTGAAGCCAGGCTCGGGGGT 180
GGAGGAGTTAGTGTGTGTCCACAAAGGGACTCCTGAAACTGACTGAGAGCCAGTGGATTT 240
GCCAGCAGTCTGAGCTTCTACCGAGTCTTCCCCCACCTCAATCCCTGTTGCTATGGAGAC 300
                                                                 M E T      3
TACCAATGGAACGGAGACCTGGTATGAGAGCCTGCATGCCGTGCTGAAGGCTCTAAATGC 360
T N G T E T W Y E S L H A V L K A L N A      23
CACTCTTCACAGCAATTTGCTCTGCCGGCCAGGGCCAGGGCTGGGGCCAGACAACCAGAC 420
T L H S N L L C R P G P G L G P D N Q T      43
TGAAGAGAGGGCGGGCCAGCCTACCTGGCCGTGATGACAACTCCTACATGTACATTCTCTT 480
E E R R A S L P G R D D N S Y M Y I L F      63
TGTCATGTTTCTATTTGCTGTAAGTGTGGGCAGCCTCATCCTGGGATAACCCCGCTCCCG 540
V M F L F A V T V G S L I L G Y T R S R      83
CAAAGTGGACAAGCGTAGTGACCCCTATCATGTGTATATCAAGAACCGTGTGTCTATGAT 600
K V D K R S D P Y H V Y I K N R V S M I      103
CTAACACGAGAGGGCTGGGACGGTGAAGACCAAGACACCTGGGGATTGCGTCTGGGGCC 660
TCCAGAACTCTGCTGTGGACTGCATCAGGTCTCAGTGTCCCTATCTGTAAGATCAACAAG 720
AAACACGGTTAAGGGAGGTTCGTCACCTGGGGTGGGAGAAGAGGGGCTGGTAGACCGAAGCC 780
TTGTGCATAAGGATTTTTTTCCCAGGAAAAGATAGACTTTATAAACAGTGGGAGCCCATGA 840
ACAAACATATAAAAAGTAGCAACAGATAATGACCAATAACTGGTTCAGTTGCTGGAGTATT 900
AGGGGCCTGGGGATTGGAGAACGGAGAAGAAGTTGTAGCAGAGGGAAATGAGACAGGAAG 960
ATGCTCTGGGGACACATTTTTTATGTGTTATCTTCAGCCATGAGAAGCAGTGATGACTAT 1020
CCCATATCACAGATATGATTTACCACCACCACCCTGCCCCCGCTCCCGTGAAGAAAGCAG 1080
GGCAAGTGTGCTGTGCTGCCCATTTGGGCCTGCATAGTGCCATGATTGGAACCCAGGAATC 1140
TGGTCTCCTTGCCTAGTGCTTTTTCAAACTCTGTGCTACACAGGAGTGGATCCAGGCCTG 1200
AAGGTCATACAATTCTGGGGACTCTCTTTAAGAAAAAGAATTCTAAAATATCTTACTTTT 1260
GCAAACATTATGAAAATATACTGCCACATTAATATGTTGCTAGGGCCCCTGCTAGGACCT 1320
TAAGAAGGAGCTCATGTGAGTCAGGACCCTGAATGTTAGGGCTCGTTAGCTCTATGGTTC 1380
ATATGCTTCTTGAACCAAGTCACAGGGCACTTCCCAGCCACATTGCCAGGCAACAGGACT 1440
AAACTACCTCCAAAGCAAGCAGTCTTTTCAGTTTTTGACTGAGTGATGTGAGAACTTCTT 1500
TTCTTTTCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTGAGGCAGTCTCCCTATGTCACCCAGGCTGTGTTG 1560
AGTGAGCCAAGATCACACCCTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGCAAGGCTCTGTCTCA 1620
AAAGAAAACAAAAA 1633

```

Figura 24. Seqüència de *KCNE3*. La pauta de lectura oberta (en negreta) és de 103 aminoàcids i el codó d'aturada està marcat en negreta.

3.2.- ESTRUCTURA GENÒMICA I MAPATGE DE *KCNE3*

Per determinar l'organització genòmica de *KCNE3* es va comparar la seqüència del cDNA amb el segment genòmic de les bases de dades públiques AP000440 (dipositada per Hattori i col·laboradors de la Kitasato University) on estava contingut. L'estructura genòmica és similar a la de *KCNE1* i *KCNE2*, amb un únic exó codificant. La seqüència obtinguda només permet identificar l'existència d'un únic exó 5'UTR.

Exó	Mida	5'splice	Intró	Mida	3'splice
1	100	GCTGAGGCAG g taaggcacc	1	5305	tgctttct ag CTCTGGGCTT
2	153	AGCAGTCTG g tgtagtctt	2	4346	gccacc ag AGCTTCTACC
3	1481				

Taula 11. Organització genòmica de *KCNE3*.

KCNE3 es va mapar en el cromosoma 11 (Fig. 25), a la regió 11q13-14 entre els marcadors *D11S944* i *D11S2056*, utilitzant el pannel d'híbrids de radiació G3 d'Stanford, amb els encebadors *KCNE3-1* i *KCNE3-2*.

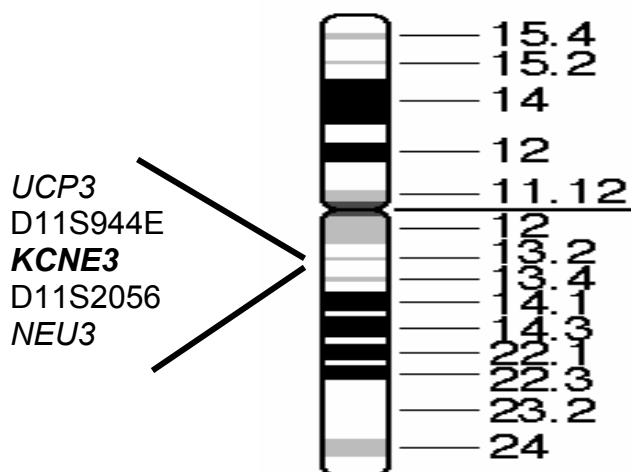


Figura 25. Localització cromosòmica de *KCNE3*. *KCNE3* es localitza a la regió 11q13-14 entre els marcadors *D11S944* i *D11S2056* i s'indica també els gens adjacents.

3.3.- CARACTERITZACIÓ DEL PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE *KCNE3*

Per tal d'analitzar el patró d'expressió de *KCNE3*, es va hibridar una membrana que contenia RNA poliA⁺ de diferents teixits adults humans, amb la regió codificant del cDNA com a sonda. La hibridació es va fer a 65°C en tampó ExpressHyb. Com a control es va utilitzar una sonda per la β -actina.

La sonda de *KCNE3* detecta una banda de 3 Kb a colon, intestí prim, ovari i a sang perifèrica (Fig. 26). La intensitat de les bandes no és la mateixa, essent més intensa la d'intestí prim, indicant una expressió més elevada de *KCNE3* en aquest teixit. La banda de sang perifèrica té una mobilitat lleugerament diferent, indicant la possible presència de transcrits alternatius o amb cues de poliA de diferents mides. També es detecten, encara molt dèbilment, bandes al voltant de 2 kb.

Aquests resultats concorden amb els resultats d'una cerca *in silico* del patró d'expressió d'aquest cDNA en les bases de dades d'ESTs humans.

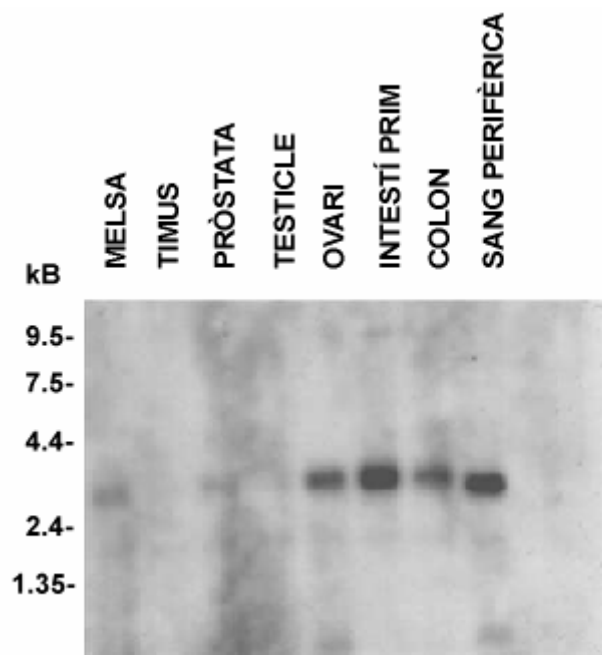


Figura 26. Northern de teixits adults humans hibridat amb la sonda específica de *KCNE3*.

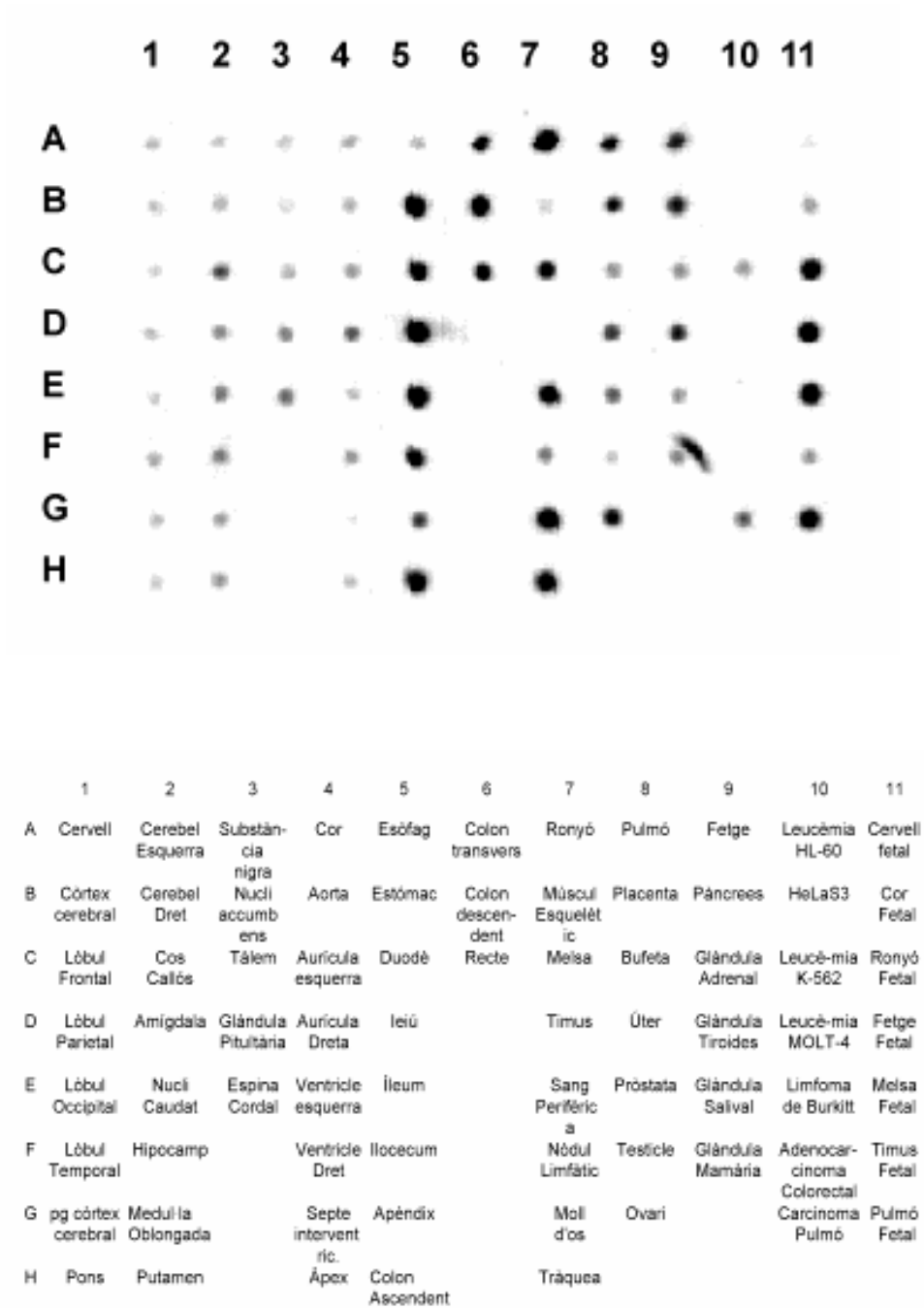


Figura 27. Membrana de mRNA poliA+ de diferents teixits humans, hibridada amb una sonda específica de *KCNE3*.

Per tal d'aprofundir en el patró d'expressió de *KCNE3*, es va hibridar una membrana que contenia RNA poliA⁺, de 72 teixits diferents humans, adults i fetals (Fig. 27).

KCNE3 s'expressa majoritàriament a tot el tub digestiu, des de l'estómac fins el recte. També s'expressa a ronyó, melsa, sang perifèrica, moll de l'os i tràquea. En etapa fetal s'expressa en els mateixos teixits en què ho fa en etapa adulta. En menor proporció s'expressa a pulmó, placenta, úter, ovari, fetge, pàncrees i tiroïdes.

3.4.- ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA DE LA PROTEÏNA KCNE3

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de *KCNE3*, realitzada amb el programa eXPASy, va determinar que el pes molecular esperat de la proteïna era de 11710 Da i el punt isoelèctric teòric 8.82.

El programa PROSITE, identifica tres seqüències consens de N-glicosilació, en les posicions 5 (NGT), 22 (NAT) i 41 (NQT), una seqüència consens de lloc de fosforilació per la proteïna quinasa C en la posició 82 (SRK), un lloc de fosforilació per la caseïna quinasa II en posició 9 (TWYE), i un lloc de fosforilació per la proteïna quinasa dependent de cAMP i cGMP en la posició 49 (RRAS).

Finalment, un segment transmembrana de 21 aminoàcids, entre les posicions 58 i 78 (YMYILFVMFLFAVTVGSLILG) és reconegut pel programa SMART.

3.5.- ANÀLISI COMPARATIVA DE KCNE3 EN MAMÍFERS

Utilitzant el programa BLAST-X a la bases de dades d'ESTs d'altres espècies, es va trobar un ESTs de rata i de ratolí que podrien correspondre als l'ortòlegs de *KCNE3* en aquestes espècies (Fig. 28). Quan es van comparar amb la pauta de lectura oberta predita, la identitat d'aminoàcids va ser molt elevada (Taula 12).

En el fragment transmembrana és on la identitat d'aminoàcids és més elevada, seguit del fragment C-terminal més proper a la regió transmembrana (Fig. 28).

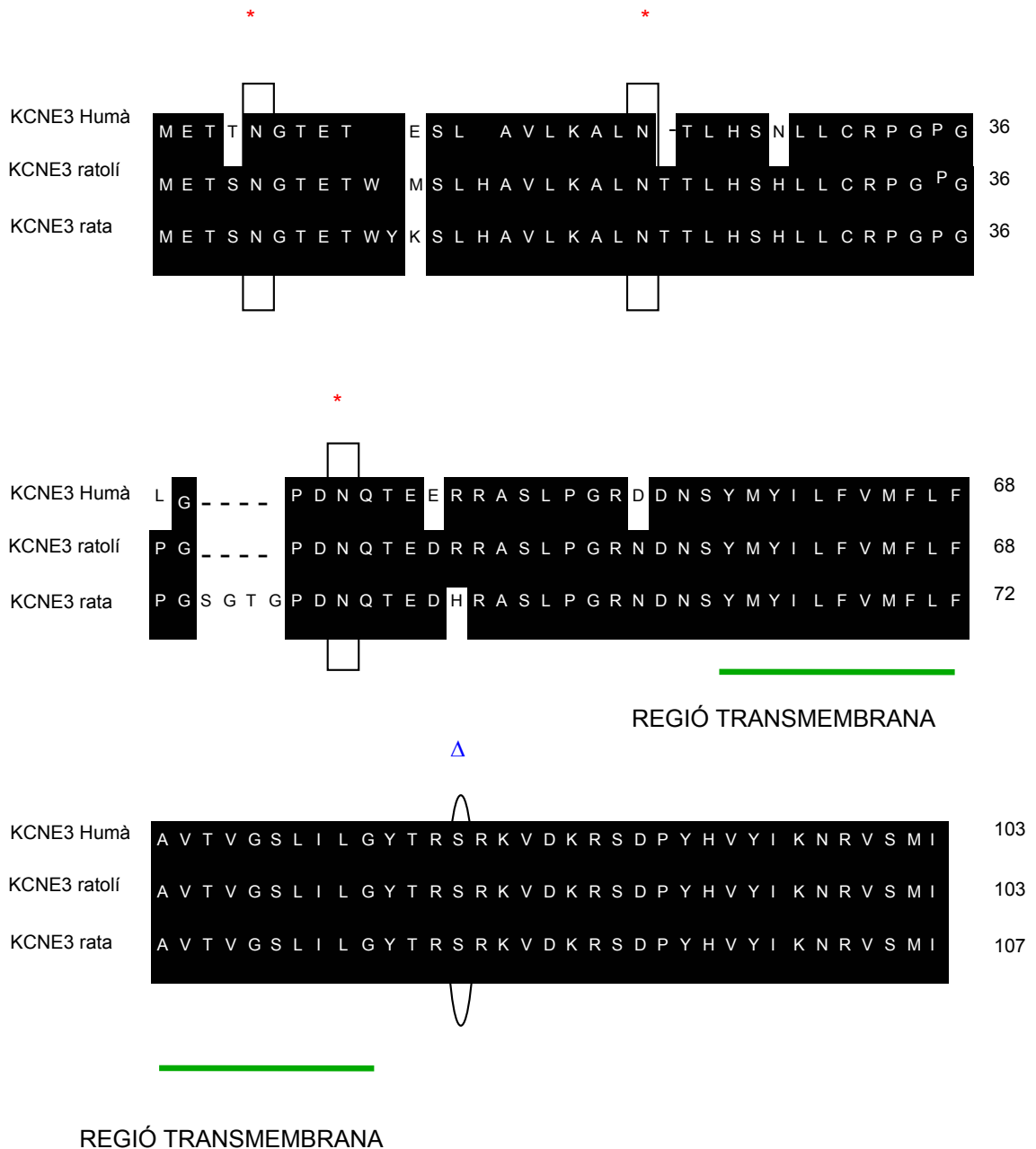


Figura 28. L'alineament múltiple de proteïnes es va portar a terme amb el programa CLUSTALW. Les caixes negres indiquen els aa idèntics. Els putatius llocs de glicosilació es marquen amb estrelles, el putatiu lloc de fosforilació per la proteïna quinasa C amb triangles, i la ratlla indica el fragment transmembrana.

La identitat a nivell d'aminoàcids és del 93% entre KCNE3 ratolí i KCNE3 humà 94% entre KCNE3 de ratolí i KCNE3 de rata i del 88% entre KCNE3 de rata i KCNE3 humà (Taula 12), utilitzant el programa BLAST per comparar dues seqüències, amb la matriu BLOSUM62.

	KCNE 3 humà	KCNE 3 rata	KCNE 3 ratolí
KCNE 3 humà		88%	93%
KCNE 3 rata			94%
KCNE 3 ratolí			
KCNE1 humà	32%		

Taula 12. Comparació entre les identitats a nivell d'aminoàcids entre KCNE3, humà i els seus ortòlegs de rata i ratolí.

3.6.- EXPRESSIÓ DE KCNE3 EN CÈL·LULES DE MAMÍFER: ESTUDI DE LA GLICOSILACIÓ DE LA PROTEÏNA

Per comprovar si la proteïna KCNE3 s'expressava en cèl·lules de mamífer, es van transfectar cèl·lules COS-7 amb el vector d'expressió pCDNA3-KCNE3. L'expressió de la proteïna pot ser detectada amb un anticòs dirigit contra el pèptid HA

L'anticòs detecta dues bandes, essent la més petita la del pes molecular esperat (Fig. 29). L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de KCNE3, mostrava tres llocs putatius de N-glicosilació. Per comprovar si la banda de pes molecular més gran corresponia a la proteïna glicosilada, les cèl·lules transfectades es van tractar amb tunicamicina. El resultat va ser la desaparició de les bandes més altes, amb el conseqüent augment de les bandes de menor pes molecular. Aquest fet suggereix que les bandes de menor mobilitat són producte de la N-glicosilació. La detecció

de dues bande producte de la N-glicosilació suggereix que com a mínim dues de les asparagines de l'extrem amino-terminal es glicosilen.

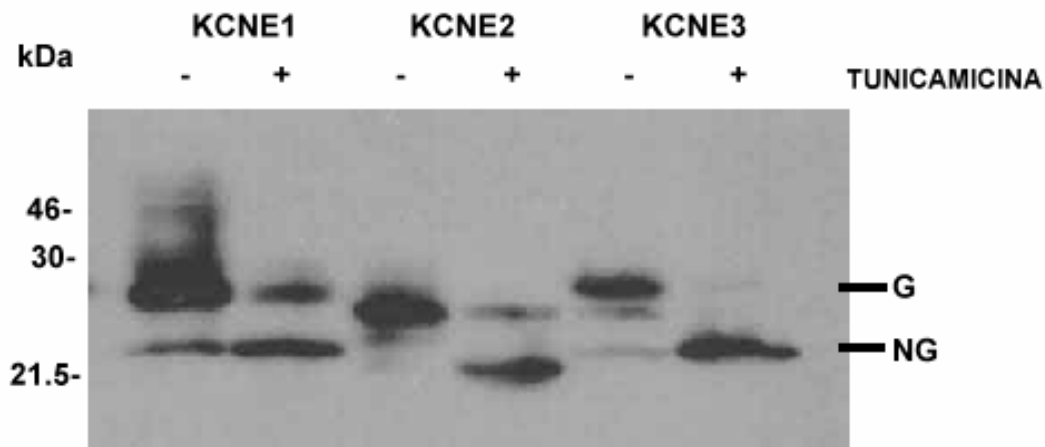


Figura 29. Cèl·lules COS-7 es van transfectar amb pCDNA3-KCNE3, pCDNA3-KCNE2 i pCDNA3-KCNE1 amb lipofectina. 24 h abans de preparar els extractes, les cèl·lules es van tractar amb tunicamicina (10 µg/ml). Els extractes es van separar en un gel d'acrilamida-SDS al 15%, van ser transferits a una membrana de nitrocel·lulosa, i les proteïnes es van revelar amb l'anticòs anti-HA, HA11. Els signes +/- indiquen la presència o absència de tunicamicina en el cultiu. S'indiquen els pesos moleculars dels marcadors utilitzats en kDa, així com els productes obtinguts. G: indica els productes glicosilats. NG: indica els productes no-glicosilats.

3.7.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de KCNE3, predeia una regió transmembrana, a l'igual que KCNE1 i KCNE2. Per confirmar si aquest domini podia translocar la proteïna a la membrana cel·lular, a l'igual que passava amb els altres membres de la família, es van transfectar, cèl·lules COS-7, amb pCDNA3-KCNE3, i es va analitzar l'expressió de la proteïna mitjançant immunofluorescència indirecta amb un anticòs dirigit contra el pèptid HA, després de fixar i permeabilitzar les cèl·lules transfectades.

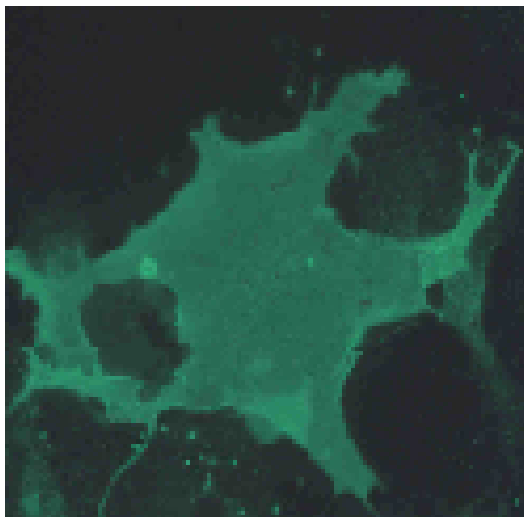
Si com passava per KCNE1 i KCNE2, KCNE3 tenia l'extrem N-terminal extracel·lular, quan les cèl·lules no es permeabilitzessin se seguiria observant senyal específic extracel·lular.

Quan les cèl·lules es permeabilitzen s'observa senyal específic localitzat asimètricament en la cèl·lula, amb una gran concentració de la proteïna en un patró perinuclear, indicador típic de localització en l'aparell de Golgi, on tindria lloc l'addició dels sucres (Fig. 30 B), de fet aquesta acumulació es fa més evident quan les cèl·lules es tracten amb tunicamicina (Fig. 30 C).

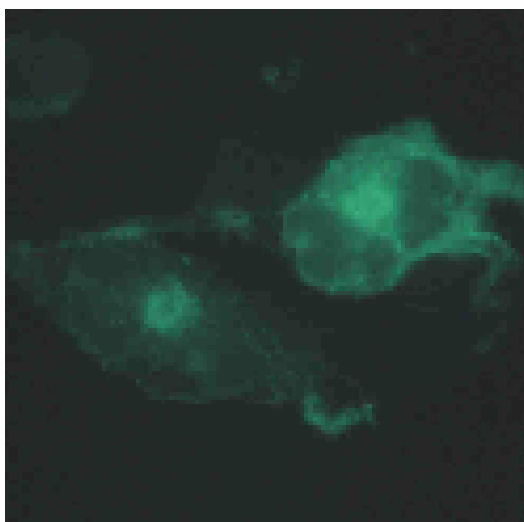
El senyal específic obtingut indica que l'extrem N-terminal és extracel·lular, doncs quan les cèl·lules no es permeabilitzen seguim observant senyal específic en tota la superfície de la membrana (Fig. 30 A).

Figura 30. Cèl·lules COS-7 es van transfectar amb pCDNA3-KCNE3 amb lipofectina. Les cèl·lules es van fixar amb 4% paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.1% Triton X-100, en els casos indicats. A: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE3 i no permeabilitzades. B: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE3 i permeabilitzades. C: cèl·lules transfectades amb pcDNA3-KCNE3, tractades amb tunicamicina 10 µg/ml durant 24 h i permeabilitzades.

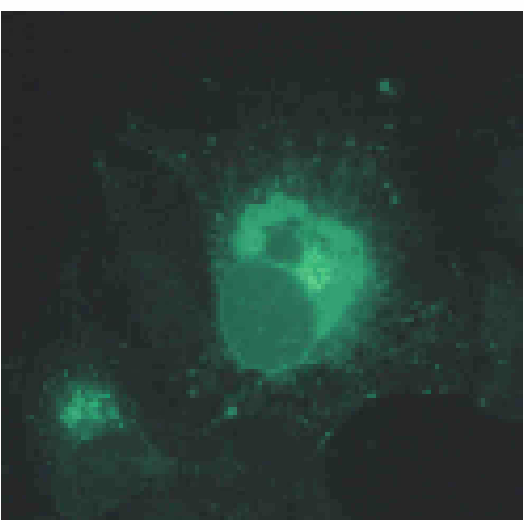
A



B



C



3.8.- MUTACIONS EN PACIENTS DE SORDESA. SSCPS

Igual que es va fer per *KCNE2*, es van buscar mutacions en *KCNE3* en pacients de sordesa, amb el mètode de SSCPS.

Com en *KCNE2*, el primer pas va ser determinar les condicions d'amplificació per PCR, amb els encebadors *KCNE3-1* i *KCNE3-2* de la zona codificant del gen a partir de DNA extret de sang de controls. També en aquest cas i com que *KCNE3* té una zona codificant de menys de 400 pb, aquest pas es va poder fer en una sola ronda.

Es van analitzar els DNAs de 112 pacients analitzats també per *KCNE2*. Així com per *KCNE2* els canvis són molt infreqüents, a *KCNE3* es va observar un canvi molt freqüent en la població, quan es corria el gel de SSCPS (Fig. 31 A). Els productes amplificats es van seqüenciar i es va identificar el canvi de nucleòtid T-C en la posició 198, provocant un canvi d'aminoàcid F-L, en posició 66, trobant-se tant en homozigosi com en heterozigosi. L'anàlisi de controls va indicar que aquest canvi és un polimorfisme present en la població general amb una freqüència del 15%.

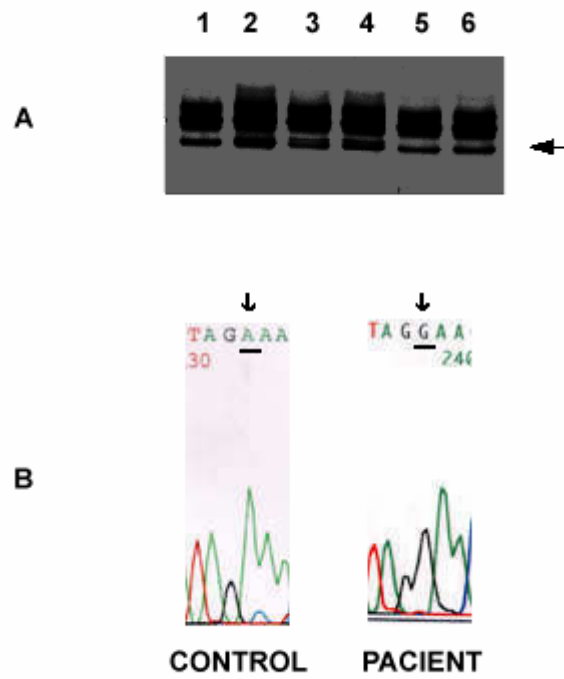


Figura 31. A) gel d'acrilamida al 12% on s'observa un patró de mobilitat de bandes diferent en els carrils 3 i 4. B) anàlisi del cromatograma de la seqüència de KCNE3 corresponent al carril 3 de l'apartat A, on es pot observar el canvi de nucleòtid A-G, en homozigosi, en la posició 198.

4.- APARELLAMENT ENTRE SUBUNITATS α (KCNQs-HERG) I SUBUNITATS β (KCNEs)

Els polipèptids de la família KCNE, malgrat tenir un domini transmembrana, no són capaços de funcionar com a canals per si mateixos, sinó que necessiten associar-se amb altres subunitats formadores de porus, formant complexos mixtes i participant en propietats dels canals com la dependència de voltatge, la cinètica d'obertura o la seva regulació.

Fins al moment, s'ha descrit que KCNE1 es pot acomplexar amb KCNQ1 (Sanguinetti et al., 1996), HERG (McDonald et al., 1997) i heterodímers KCNQ2/KCNQ3 (Wang et al., 1998), que KCNE2 forma canals amb HERG (Abbot et al., 1999) i heterodímers KCNQ2/KCNQ3 (Tinel et al., 2000) i que KCNE3 pot interaccionar amb KCNQ1 (Schroeder et al., 2000a). Aquestes interaccions físiques només seran possibles en condicions fisiològiques si les dues proteïnes de la parella s'expressen en la mateixa cèl·lula.

Així doncs, per tal d'establir l'aparellament possible entre les subunitats α i les subunitats β , es va plantejar estudiar el patró d'expressió de les subunitats *HERG*, *KCNQ1*, *KCNQ2*, *KCNQ3* i *KCNQ4*. Per aquest motiu es van aïllar cDNAs específics de cada gen, per RT-PCR. Els intents de preparar una sonda de *KCNQ4* mitjançant RT-PCR a partir de RNA de diferents teixits, varen ser negatius, fet que estaria d'acord amb que aquest gen té una expressió molt restringida a còclea (Kubisch et al., 1999). Els fragments de DNA aïllats i clonats es varen seqüenciar per tal de comprovar la seva identitat, que en tots els casos va resultar ser correcte.

El patró d'expressió es va determinar per hibridació d'una membrana que contenia mRNA de diferents teixits humans, tant adults com fetals amb cada una de les sondes (Fig. 32).

KCNQ1 s'expressa sobretot a cor i sistema digestiu, però on hi ha una expressió màxima és a nivell glandular, pàncrees, glàndula adrenal, tiroides i glàndula salival.

Està descrit que *KCNQ2* i *KCNQ3* estan implicats en la generació del corrent M (Schroeder et al., 1998), així el patró d'expressió obtingut concorda amb el que seria d'esperar, que s'expressessin majoritàriament a cervell. *KCNQ2* i *KCNQ3* s'expressen quasi exclusivament a sistema nerviós, tant adult com fetal, amb patrons que no són exactament equivalents, ja que l'expressió de *KCNQ3* és més baixa a cerebel i pituitària. *KCNQ2* també s'expressa a testicles (Fig. 32).

L'expressió d'*HERG* és més ubíqua, si es compara amb *KCNQ2*. Està present a totes les parts del cervell, de cor i en menor intensitat a tot el del tub digestiu. Es detecta també a moll de l'os, pulmó, placenta, bufeta, úter, pròstata, testicles i glàndula adrenal. A nivell de línies cel·lulars, està present a la línia K-562 de leucèmia. En etapa fetal s'expressa a cervell, cor, ronyó i fetge (Fig. 32).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Cervell	Cerebel Esquerra	Substància nigra	Cor	Esòfag	Colon transvers	Ronyó	Pulmó	Fetge	Leucèmia HL-60	Cervell fetal
B	Còrtex cerebral Dret	Cerebel Dret	Nucli accumbens	Aorta	Estómac	Colon descendent	Múscul Esquelètic	Placenta	Pàncrees	HeLa53	Cor Fetal
C	Lòbul Frontal	Cos Callós	Tàlem	Aurícula esquerra	Duodè	Recte	Melsa	Bufeta	Glàndula Adrenal	Leucèmia K-562	Ronyó Fetal
D	Lòbul Parietal	Amígdala	Glàndula Pituitària	Aurícula Dreta	Ileü		Timus	Úter	Glàndula Tiroides	Leucèmia MOLT-4	Fetge Fetal
E	Lòbul Occipital	Nucli Caudat	Espina Cordal	Ventriple esquerra	Ileum		Sang Perifèric	Pròstata	Glàndula Salival	Linfoma de Burkitt	Melsa Fetal
F	Lòbul Temporal	Hipocamp		Ventriple Dret	Ilocecum		Nòdul Limfàtic	Testicle	Glàndula Mamària	Adenocarcinoma Colorectal	Timus Fetal
G	pg còrtex cerebral	Medulla Oblongada		Septe interventric.	Apèndix		Moll d'os	Ovari		Carcinoma Pulmó	Pulmó Fetal
H	Pons	Putamen		Àpex	Colon Ascendent		Tràquea				

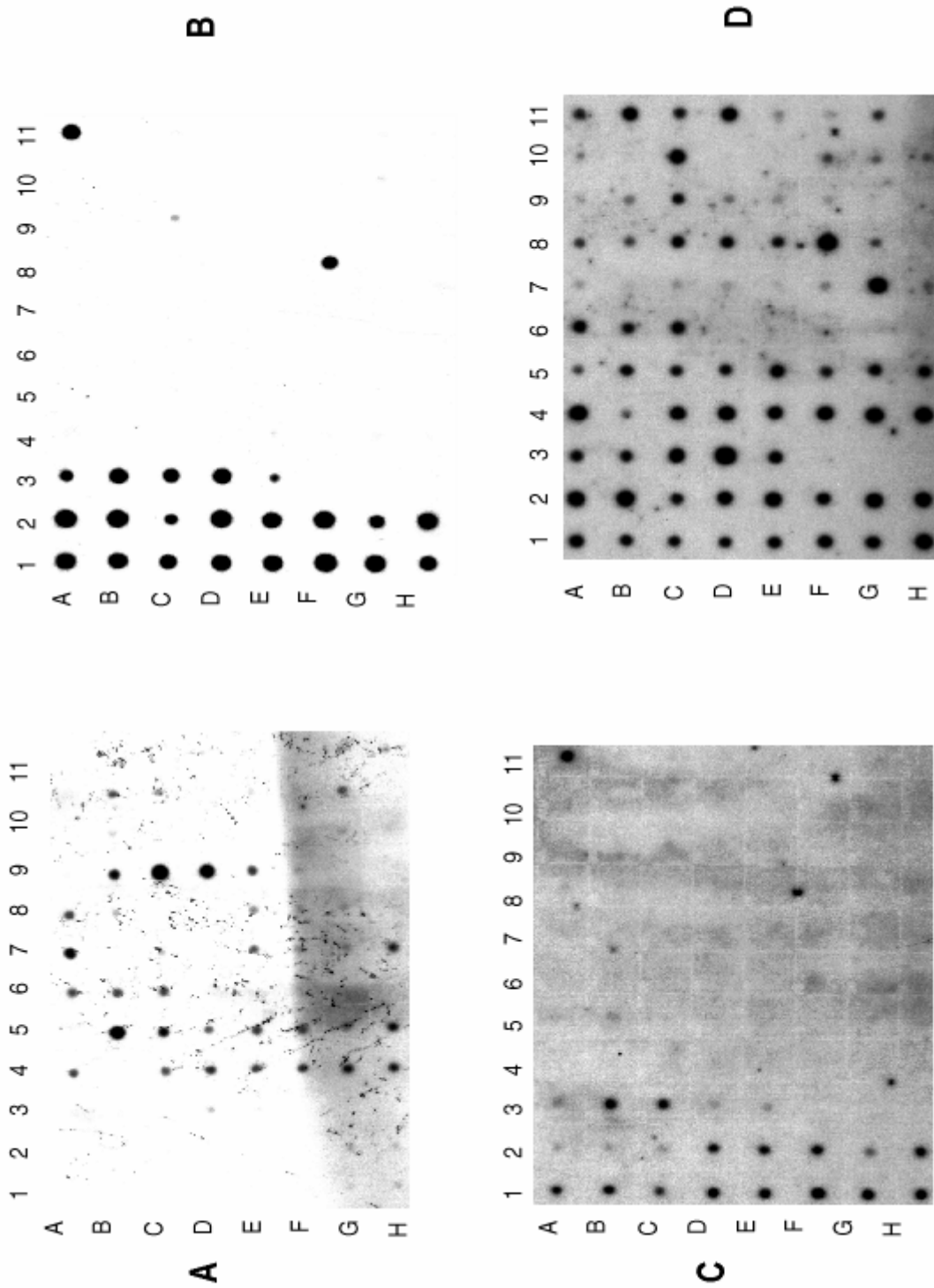


Figura 32. Membrana de RNA poliA+ de diferents teixits hibridada amb A: sonda específica de *KCNQ1*. B: sonda específica de *KCNQ2*. C: sonda específica de *KCNQ3*. D: sonda específica d'*HERG*.

1.- CONTIG DE COSMIDIS I MAPA TRANSCRIPCIONAL

1.1.- IMPORTÀNCIA DELS MAPES FÍSICS

L'any 1995, quan es va començar la construcció del mapa físic de la regió crítica de la SD que es presenta en aquesta tesi, aquests tipus de mapes eren imprescindibles per portar a terme projectes més ambiciosos com la seqüència de tot el cromosoma. L'any 1995, ja existia un mapa físic de YACs solapats que cobria tot el HSA21, amb algun petit forat, i amb cert grau de quimerisme (Nizetic et al., 1991).

Treballar amb YACs suposa alguns problemes, com per exemple la seva mida, doncs poden arribar a tenir inserts de 2 Mb, l'existència de quimerisme, freqüències de recombinació elevades en llevats, creixement lent, entre altres. Per aquests motius es va decidir construir un mapa físic amb cosmidis, vectors per als quals els problemes descrits anteriorment no existeixen. Després d'estudiar el quimerisme de YACs de la DSCR, es van subclonar en cosmidis 3 YACs no quimèrics al voltant del marcador *D21S55*. Amb aquests es va construir un contig de cosmidis solapats, que es van utilitzar per crear un mapa transcripcional detallat, pas essencial per identificar els gens importants en l'etiologia de les malalties associades al HSA21, alhora que en aquell moment constituïen el material ideal per seqüenciar el DNA genòmic.

Com que es qüestionava el concepte de DSCR, a més a més del contig dintre d'aquesta regió, es va construir el primer contig de cosmidis fora de la DSCR.

1.2.- SELECCIÓ DE cDNA CERCA DE GENS

Per tal d'elaborar un mapa transcripcional de la zona que definien els 5 YACs, es va optar per realitzar experiments de selecció de cDNA. Tal i com queda reflexat en la secció de resultats, un primer experiment amb el YAC 221B9, únicament va identificar un cDNA en aquest YAC. La raó de l'aïllament d'un únic cDNA utilitzant

el YAC 221B9 és desconeguda. Podria ser que aquesta regió fos pobra en gens, o que aquests no s'expressessin en cervell fetal, mRNA del qual va ser utilitzat en la selecció. Altres estudis, també efectuats en cervell fetal, tampoc van mapar cap cDNA en aquesta regió (Peterson et al., 1994; Cheng et al., 1994).

Les seqüències de DNAs aïllats mitjançant el segon experiment de selecció de cDNA i mapats en els diferents cosmidis es van utilitzar com a punt inicial per identificar nous gens en el HSA21, objectiu final d'aquesta tesi i del treball del grup de recerca en el qual s'emmarca.

Es van seguir diverses estratègies per aconseguir aïllar els cDNAs complets a partir dels DNAs aïllats, incloent el crivellatge de genoteques de cDNAs de diferents teixits, cervell, fetge i cor, principalment; experiments de 5' i 3' RACE amb cDNAs de cervell, fetge, ronyó, cor i altres teixits; i experiments de RT-PCR combinant els encebadors de diferents cDNAs que per la seva proximitat podrien formar part de la mateixa unitat transcripcional. Els resultats obtinguts no van portar a la identificació de cap nou gen. Encara que alguns dels DNAs provinents de la selecció de cDNA poden ser considerats com seqüències expressades, ja que poden ser amplificats en experiments de RT-PCR i quan són utilitzats com a sondes detecten bandes específiques en experiments de Northern blot, no s'ha pogut demostrar que formin part d'una unitat transcripcional.

Alguns arguments que explicarien, perquè no s'han aïllat gens a partir d'aquests cDNAs serien que o bé no s'ha buscat en els teixits adients, o en l'etapa correcta, o per altra banda que l'expressió és molt baixa i estan poc representats en les genoteques utilitzades, aquests cDNAs corresponen a trànscripats il·legítims i les bandes dels Northern no són específiques, per tant no correspondrien a nous gens. Si la genoteca a partir de la qual es va portar a terme la selecció de cDNA, hagués estat contaminada amb clons genòmics en una proporció molt elevada, podria explicar-se els resultats obtinguts. De fet tots els clons aïllats són continus en la seqüència genòmica. Es van seleccionar alguns gens ja identificats, com per exemple *DSCR1* i *GIRK2*, i es va identificar un nou gen, *DYRK1A/MNB* (Guimerà et al., 1996), però la resta de clons correspondrien a seqüències úniques

genòmiques, que mapen exclusivament en el contig però que no corresponen a zones codificants. Per aquest motiu, en els crivellatges de genoteques no es van obtenir clons positius, encara que en els experiments de RACE, com que és un mètode basat en la PCR, s'aconseguia amplificar el clo, però degut a la petita contaminació genòmica existent en la RACE, o per la possible transcripció il·legítima en el procés d'obtenció del cDNA de la RACE.

Dels 10 cDNAs que la doctorant ha analitzat, 8 d'ells segueixen sense mostrar similitud amb cap EST present en les bases de dades (març de 2001), ni han estat predits com a gens putatius pel Consorci de Seqüenciació del Cromosoma 21 (Hattori et al., 2000). Per a un d'ells, el clo B3-33 (U81207), existeix un EST aïllat de genoteques de cervell fetal (F11685) que no estén la seqüència obtinguda inicialment. Finalment el clo B5-1.1 (U81226), conté una seqüència homòloga a una transcriptasa reversa, amb una similitud molt elevada a altres seqüències presents en altres cromosomes, fet pel qual es podria tractar d'un retrotrasposó que s'expressa a nivell de mRNA..

Dels altres 29 clons analitzats per altres membres del grup de recerca, actualment només estan representats a les bases de dades d'ESTs tres d'ells corresponents a elements repetitius, amb 1 o 2 ESTs. En tots els casos excepte per al cló F4-3.1 (U81227), les seqüències exteses són contínues en el DNA genòmic fet pel qual resulta molt difícil afirmar que corresponen a seqüències expressades.

2.- NOVES ESTRATÈGIES

Com que l'objectiu final era la identificació de nous gens, aprofitant que en els darrers anys ha augmentat la qualitat i la varietat dels programes biocomputacionals i les bases de dades d'ESTs públiques han augmentat exponencialment la quantitat d'informació més accessibles, es va començar la cerca *in silico* de gens en el HSA21.

El resultat d'aquesta cerca *in silico* és la identificació de *KCNE2* en el HSA21 i *KCNE3*, en el HSA11, com a gen paràleg.

3.- *KCNE2*

KCNE2 és una proteïna de 123 aminoàcids. L'anàlisi de la seva seqüència indica l'existència de 2 llocs consens de N-glicosilació i de 2 llocs de fosforilació per proteïna quinasa C. El gen s'expressa, com a únic mRNA, al voltant de 1 kb, majoritàriament a estómac i duodè encara que també es detecta expressió a cor i a múscul esquelètic. S'han detectat isoformes per splicing alternatiu, ja que existeixen 2 ESTs humans (nº accés B6208163 i B6221966) amb 5'UTRs diferents a la seqüència obtinguda en aquesta tesi. En aquests ESTs la seqüència és diferent a partir del nucleòtid 127, extenent-se cap a l'interior de l'intró. Es podria hipotetitzar que 5'UTR diferents podrien regular l'expressió del gen a nivell post-transcripcional.

KCNE2 mapa a la regió 21q22.1, a 78 Kb de *KCNE1*, el seu gen paràleg, però ambdós gens es transcriuen en direcció oposada. L'estructura genòmica de tots dos consisteix en un únic exó codificant. Per a *KCNE1* s'han descrit dos exons 5'UTR (Splawski et al., 1998), mentre que per a *KCNE2* la seqüència del cDNA obtinguda només permet identificar un únic exó 5'UTR. La mida de l'intró que separa l'exó 5'UTR i l'exó codificant és molt similar per ambdós gens 937 pb i 6253 pb, respectivament. A més a més comparteixen un 30% d'identitat a nivell d'aminoàcids (45% de similitud), que augmenta fins al 45% (75% de similitud) quan només es comparen el segment transmembrana i la regió adjacent. Tots aquests fets suggereixen que els dos gens són el resultat d'una duplicació gènica i una evolució divergent, i que podrien ser considerats paràlegs.

A més a més de la similitud d'aminoàcids, els dos membres de la família comparteixen l'existència d'un segment transmembrana a la mitat carboxi-terminal, on s'acumulen gran part de les mutacions descrites tant a *KCNE1* com en *KCNE2* (veure apartat 5), i la presència de dues asparagines susceptibles de

ser glicosilades (seqüència concens NXT/S) a l'extrem amino-terminal, de les quals la més amino-terminal (N5 a KCNE1, N6 a KCNE2) ha de ser important per a la funcionalitat dels canals que es generen, ja que la T del lloc concens s'ha descrit mutada tant a KCNE1 com a KCNE2 en pacients amb problemes d'arítmies (Duggal et al., 1998; Abbot et al., 1999). No obstant, la S-102 a KCNE1, que és fosforilada per PKC, resultant en una disminució de l'amplitud del corrent (Zhang et al., 1994) no té un equivalent a KCNE2. Si que existeix conservació en un altre S, susceptible de ser fosforilada per PKC (S-67 a KCNE1, S-74 a KCNE2) per a la qual no s'ha descrit cap funcionalitat.

L'anàlisi de la seqüència de la proteïna, predeïa una regió transmembrana. La localització en la membrana cel·lular ha estat confirmada pels estudis d'immunofluorescència. Aquests estudis també han demostrat que la proteïna, possiblement localitza amb l'extrem N-terminal cap al medi extracel·lular, de manera similar a com ho fa KCNE1. Els resultats d'inhibició amb tunicamicina i els resultats de la immunofluorescència van indicar que KCNE2 és transportat a la membrana com a proteïna glicosilada. El patró de localització intracel·lular és perinuclear, típic de localització en l'aparell de Golgi, on tindria lloc la glicosilació.

L'elevada homologia amb KCNE1 a nivell d'aminoàcids predeïa que KCNE2 es comportaria com una subunitat β de canals de potassi induïts per voltatge. Per a la comprovació d'aquesta hipòtesi es va establir una col·laboració amb el Dr. Thomas McDonald de la Secció de Cardiologia Molecular del Departament de Medicina i Farmacologia Molecular de l'Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA, amb experiència en l'estudi electrofisiològic de canals de potassi. El grup del Dr. McDonald va determinar que KCNE2 podia interaccionar amb HERG, física i funcionalment en estudis electrofisiològics, i que per tant es comportava com a una subunitat β de canal de potassi depenent de voltatge. No obstant, aquests resultats no han estat publicats, perquè durant la realització d'aquest treball, el gen *KCNE2* va ser identificat com codificant per una subunitat β de canals de potassi a la que se li va donar el nom de MirP1 (*Mink-related peptide 1*) pel grup del Dr. Steve A.N. Goldstein del Departament de Pediatria i

fisiologia Molecular i cel·lular de la Facultat de Medicina de Yale (Abbot et al., 1999).

Abbot i col·laboradors varen descriure que KCNE2 s'uneix a HERG alterant les seves propietats com a canal dependent de voltatge. A diferència dels canals formats únicament per HERG, els complexos heteromèrics s'assemblen als canals cardíacs I_{Kr} en la seva obertura, conductància unitària, regulació per potassi i la distintiva inhibició bifàsica pels antiarítmics de classe III com l'E-4031. Més recentment, s'ha demostrat que KCNE2 pot interaccionar també amb KCNQ1, transformant el corrent que es genera de voltatge dependent a un corrent independent de voltatge (Tinel et al., 2000a) i que es pot associar amb heterodímers KCNQ2+KCNQ3 alterant les propietats del canal (Tinel et al., 2000b).

El grup de S.Goldstein va valorar el paper potencial de KCNE2 en el ritme cardíac, estudiant 250 pacients (20 amb arítmia induïda per fàrmacs, 230 amb arítmia esporàdica o familiar) que no tenien cap mutació en *KCNQ1*, *HERG*, *SCN5A* ni *KCNE1*. Es van trobar 3 mutacions i un polimorfisme. Els canals formats per mutants de KCNE2 i HERG (Fig. 35), semblaven tenir una activació més lenta, una desactivació més ràpida i una major sensibilitat als fàrmacs. Els autors recolzen la idea que l'arítmia adquirida podria ser deguda a reduccions en el corrent de potassi, de base genètica, que es mantenen clínicament asimptomàtiques fins que es combinen amb factors d'estrès. Aquests estudis recolzen la teoria que recorre a la superimposició de factors genètics i de factors ambientals actuant conjuntament, disminueixen progressivament la capacitat dels canals iònics cardíacs per determinar cada potencial d'acció de manera normal.

3.1.- ESTUDI DE LA GLICOSILACIÓ DE KCNE2

KCNE2 té dos llocs susceptibles de N-glicosilació. Per comprovar si els dos llocs eren glicosilats i si aquest procés afectava a la traslocació de la proteïna a la membrana cel·lular, es van generar mutants de glicosilació en els dos llocs.

Estudis de western, indicaren que quan es mutava cada un dels llocs independentment, desapareixent la banda de pes molecular més elevat (corresponent a la doble glicosilació), suggerint que els dos llocs eren susceptibles de glicosilació en la línia cel·lular utilitzada. La proporció relativa de les diferents bandes també va indicar que el producte majoritari en la línia cel·lular utilitzada, és la proteïna doblement glicosilada (Fig. 18)

Quan es va comprovar la localització subcel·lular dels mutants, es va observar que la proteïna seguia essent transportada a la membrana, fet que significava que només amb un dels llocs mutats ja n'hi ha prou perquè la proteïna s'integri a la membrana, donant lloc a una proteïna funcional, pel que fa referència a aquest fenotip. No obstant, quan les cèl·lules eren pre-tractades amb tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilació, es va obtenir com a resultat una disminució de la proteïna a la membrana cel·lular, suggerint que per a KCNE2 la glicosilació en les dues asparagines era necessària per a la seva correcta localització a la membrana plasmàtica.

En el cas de KCNE1, s'ha demostrat que la falta de glicosilació afecta a l'obertura i a la sensibilitat al pH de canals resultat de l'heterodimerització amb KCNE1 (Freman et al., 2000). S'ha suggerit que l'addició post-traducciona de carbohidrats àcids a proteïnes formadores de canals podria tenir un paper funcional important en augmentar la càrrega negativa externa del canal. Així, per exemple, la N-glicosilació d'HERG és necessària per a la seva correcta expressió a la membrana (Petrecca et al., 1999) i altera la probabilitat d'obertura del canal ROMK1 (Schwalbe et al., 1995).

També és possible que l'augment de proteïna intracel·lular davant de la proteïna a membrana que semblen indicar els experiments d'immunofluorescència (Fig. 20) resultés en el segrestament de subunitats α en el citosol, disminuint la concentració efectiva de canals funcionals a la membrana.

L'efecte d'aquestes mutacions sobre la capacitat modificadora de les propietats dels canals generats per HERG està essent estudiada pel Dr. McDonald. L'estudi de la mutació N6Q és de particular interès ja que podria ser funcionalment equivalent al polimorfisme T8A (Abbot et al., 1999; Sesti et al., 2000), donat que ambdós canvis afecten al lloc consens de N-glicosilació, present en el domini extracel·lular de la subunitat del canal. L'absència de les cadenes de sucres podria afectar a la unió del fàrmac, alterant així les propietats del canal i explicant-ne el mal funcionament.

3.2.- KCNE2 I SÍNDROME DE DOWN

No s'ha pogut demostrar sobre-expressió a nivell de mRNA dels gens *KCNE1* i *KCNE2* a cor fetal de SD comparat amb controls. A falta de confirmar aquestes dades en teixits adults, això podria estar d'acord amb el fet que no s'ha descrit un augment d'arítmies i problemes relacionats en la població SD (J. Florez, comunicació personal).

No obstant, no es pot descartar que existeixi sobre-expressió en altres teixits i que aquesta tingui conseqüències negatives per a les persones amb SD. Considerant altres patologies associades al mal funcionament d'aquests gens i els seus teixits diana, com la seva relació en sordesa o la seva associació amb *KCNQ2/KCNQ3* i per tant la seva implicació en el corrent M neuronal (Tinel et al., 2000), se suggereix que *KCNE1* i *KCNE2* siguin gens d'interès en l'estudi de la SD. En aquest sentit, cal recordar que les persones amb SD pateixen amb més freqüència que la població normal epilèpsia (Stafstrom, 1993; Stafstrom i Konkol, 1994) i espasmes infantils que podrien estar relacionats amb alteracions del corrent M.

De fet, els defectes funcionals associats a mutacions en els gens *KCNQs* o *KCNEs* descrits fins al moment, poden ser considerats com el resultat de canvis en la dosi gènica. Per exemple, mutacions a *KCNQ1* que redueixen el corrent per sota del 50% del normal, causen arítmia cardíaca però no sordesa (Priori et al.,

1998). Estudi *in vitro* han demostrat que una reducció del 25% de corrents tipus M poden causar epilèpsia (Schroeder et al., 1998).

3.3.- CERCA DE MUTACIONS EN PACIENTS AMB SORDESA

Hi ha publicades mutacions per *KCNE1* (Tyson et al., 1997, Schulze-Bahr 1997, Splawski et al., 1997) en pacients amb la síndrome JLN i LQT i per *KCNE2* (Abbot et al., 1999), en pacients amb arítmia cardíaca. Per altra banda el *knockout* de *KCNE1* té greus defectes en l'oïda interna (Vetter et al., 1996). Per aquestes raons es va decidir buscar mutacions en *KCNE2* i en *KCNE3* en pacients de sordesa no sindròmica pels quals s'havien descartat les mutacions més freqüents.

El resultat de l'anàlisi de la regió codificant de *KCNE2* de 112 mostres només va detectar el canvi T8A en dues mostres. Aquest canvi ha estat descrit com a un polimorfisme per Abbot i col·laboradors (Abbot et al., 1999), ja que es va trobar en 16 dels 1010 individus controls analitzats.

No obstant, posteriorment, Sesti i col·laboradors (Sesti et al., 2000) varen ampliar l'estudi, trobant el mateix polimorfisme en un pacient d'entre 98 pacients amb arítmia induïda per fàrmacs, arribant a la conclusió que aquest polimorfisme proporcionava una sensibilitat diferent a certs fàrmacs, com el sulfametoxazol, utilitzat en el tractament d'infeccions bacterianes. Així, el canal T8A-KCNE2, en presència d'aquest fàrmac, arriba al pic de corrent més ràpidament, però la desactivació també és més ràpida. Aquests estudis demostren que variacions de seqüència poden ser clínicament asimptomàtiques abans d'estar exposades a certes condicions ambientals, augmentant el risc dels seus efectes.

Per tant, no es pot descartar que el polimorfisme detectat en els pacients amb sordesa, pot haver contribuït al desenvolupament d'aquesta. L'estudi de les famílies dels afectats no ha donat més pistes ja que en un cas no s'han pogut analitzar més membres de la família i en l'altre no hi havia més membres afectats. Per obtenir una evidència de la implicació més directa dels canals *KCNE2* en la patologia de sordeses seria necessari comprovar que aquest gen s'expressa en

l'oïda. El grup de sordesa del CGMM-IRO estudia l'expressió de gens implicats en sordesa mitjançant hibridació *in situ* en sistema auditiu de ratolí. El gen *kcne2* murí s'inclourà en aquests estudis.

4.- KCNE3

L'existència de famílies amb LQT que no mapaven en cap loci de LQT conegut, suggeria que hi havia més gens responsables de LQT, encara per identificar (Wang et al., 1998). Així doncs, seguint la mateixa estratègia que per *KCNE2*, es va clonar *KCNE3*.

KCNE3 codifica per una proteïna de 103 aminoàcids amb una massa molecular de 12 kDa que mostra una identitat del 32% amb *KCNE1* i del 30% amb *KCNE2*, a nivell d'aminoàcids. En la zona transmembrana i en el curt segment següent la identitat augmenta fins al 35%. *KCNE3* mapa a la regió 11q13-14, i la seva estructura genòmica consisteix en un únic exó codificant i un exó 5'UTR, a l'igual que els altres membres de la família. S'han detectat ESTs amb seqüències 5'UTR diferents que s'extenen dintre de l'intró 1, com passava en el cas de *KCNE2*. Aquests fets suggereixen que podria considerar-se com a gens paràlegs.

Anàlisis de Northern mostren l'existència d'un transcrypt majoritari, al voltant de 3 kb, prominent a ronyó, una expressió moderada a intestí prim, colon i ovari. Estudis d'expressió en més teixits indica que el gen s'expressa a nivell fetal, en els teixits analitzats i preferentment a tot el tub digestiu en l'adult, encara que la seva expressió ha pogut ser detectada a tots els tipus de teixits analitzats excepte a timus (Fig. 27).

L'anàlisi de la seqüència de la proteïna predeia una regió transmembrana, fet que ha estat confirmat pels estudis d'immunofluorescència, que també han indicat que l'extrem N-terminal de la proteïna es localitza en l'exterior de la cèl·lula. L'anàlisi de la seqüència proteica també indica la presència de tres llocs consens de N-glicosilació i alguns llocs de fosforilació per diferents quinases. Els resultats dels

estudis amb tunicamicina i els estudis d'immunofluorescència varen mostrar que KCNE3 es transporta a la membrana com a proteïna glicosilada i que aquesta glicosilació és indispensable per la seva integració a la membrana.

En l'estudi de pacients amb sordesa no sindròmica s'ha identificat el polimorfisme T198C que provoca el canvi d'aminoàcid F-L a la posició 66. Aquest polimorfisme és bastant freqüent ja que està present en el 17% de la població analitzada, i podria ser útil en estudis d'associació.

La demostració de que KCNE3 era realment una subunitat β de canals de potassi depenent de voltatge, ha estat realitzada en el laboratori del Dr. McDonald. El seu treball ha demostrat que KCNE3 s'associa funcionalment amb KCNQ1, alterant les cinètiques d'activació i desactivació del canal (Melman et al., 2001).

Durant la realització d'aquest treball, el gen *KCNE3* va ser identificat com codificant d'una subunitat β de canals de potassi per Schroeder i col·laboradors (Schroeder et al., 2000). En aquest treball, els autors descriuen que KCNE3 altera les propietats dels canals formats per KCNQ1, no afecta el corrent dels complexos formats per KCNQ2 i KCNQ3, suprimeix el corrent produït per KCNQ4 i HERG. Els autors suggereixen que per les característiques dels canals formats i per la seva expressió a colon, en particular a les cèl·lules de la cripta, KCNE3 i KCNQ1 podrien formar el canal de potassi activat per cAMP que participa en la secreció intestinal d'ions clorur.

Recentment, el grup del Dr. Goldstein ha descrit que KCNE3 (anomenat també MIRP2) forma part de canals de potassi amb Kv3.4 (o KCNC4) a múscul esquelètic, alterant la conductància del canal i la probabilitat d'obertura (Abbot et al., 2001). Aquesta és la primera vegada que una subunitat β de la família KCNE es descriu que està associada a un membre de la família de canals de potassi depenents de voltatge de tipus *shaw*. En aquest mateix treball, es descriu que una mutació a *KCNE3*, la R83H, està associada a una forma familiar de paràlisi periòdica.

Els resultats d'expressió de KCNE3 presentats en aquesta tesi doctoral, discrepen amb els publicats per Abbot i col·laboradors, tant en el que es refereix a la mida del transcrypt específic que es detecta, 1kb enfront a 3 kb (Fig. 26), com a l'expressió tisular: Abbot i col·laboradors detecten expressió molt forta a múscul esquelètic però no a intestí prim i colon, mentre que les dades que es presenten aquí indiquen una elevada expressió en aquests últims teixits però molt feble a múscul esquelètic. Les raons d'aquesta discrepància són difícils d'explicar, però el patró tisular que s'obté quan s'examinen 59 ESTs humans amb seqüències KCNE3 presents a les bases de dades, és coincident amb els teixits on el senyal del MTE-Array (Fig. 27) és més elevat. No existeix cap EST de KCNE3 de múscul esquelètic.

La col·laboració amb el grup del Dr. McDonald amb el que fa referència a KCNE3, s'ha centrat en identificar les regions específiques de KCNE1 i KCNE3 que controlen les activitats dels canals generats per KCNQ1. El treball ha donat com a resultat que les velocitats d'activació/desactivació dels canals estan determinades per un petit segment de la regió transmembrana: 71-TVG-73 per a KCNE3 i 57-FTL-59 per a KCNE1 (Melman et al., 2001).

5.- COMPARACIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA KCNE

La família KCNE de subunitats β de canals de potassi depenents de voltatge, consta en l'actualitat de 5 membres en mamífers. En humans, existeixen: *KCNE1*, que va ser el primer descrit (Murai et al., 1989); *KCNE2* i *KCNE3* descrits en aquesta Tesi Doctoral i que han estat també identificats respectivament per Abbot i col·laboradors (Abbot et al., 1999) i Schroeder i col·laboradors (Schroeder et al., 2000); *KCNE4* va ser descrit inicialment a ratolí per Abbot i col·laboradors (Abbot et al., 1999), però es pot identificar una seqüència amb una similitud més gran del 90% a nivell d'aminoàcids en les bases de dades de seqüència genòmica humana, un EST humà (n^a d'accés BG330322) i finalment, *KCNE5* (o *KCNE1L*) ha estat identificat com a un dels gens deletats en la síndrome de gens contigus AMME (OMIM 30019) (Piccini et al., 1999), descrita per Jonsson i

col·laboradors (Jonsson et al., 1998), deguda a una deleció a Xq22.3. Els homes afectats tenen un fenotip complex caracteritzat per la síndrome d'Alport (A: Alport), retard mental (M: *mental retardation*), hipoplàsia de la cara central (M: *mideface hypoplasia*) i eliptocitosi (E: *elliptocytosis*). També s'ha descrit anomalies cardíaques lleus i anomalies neurològiques (Piccini et al., 1999).

En la Taula 13 es fa un resum de la localització cromosòmica dels diferents membres de la família.

KCNE	LOCALITZACIÓ CROMOSÒMICA
KCNE1	21q22.1
KCNE2	21q22.1
KCNE3	11q13-14
KCNE4	2q36
KCNE5	Xq22.3

Taula 13. Localització cromosòmica dels diferents membres de la família KCNE.

En tots els casos, la regió codificant està continguda en un únic exó. *KCNE1* (Splawski et al., 1998), *KCNE2* i *KCNE3* (aquest treball), *KCNE4* (l'EST està contingut en les entrades de les bases de dades NT-025650) i *KCNE5*, per comparació del cDNA amb la seqüència genòmica on està contingut (EMBL , nº d'accés AJ012743).

Pels casos que tenen cDNAs més llargs, es distingeixen 1 (*KCNE2*, *KCNE3* i *KCNE4*) o 2 exons (*KCNE1*) 5'UTR. En aquests casos, la mida dels introns és similar, estant sempre el codó d'aturada en fase a l'exó 5'UTR.

Segons aquestes dades, es pot suggerir que tots els membres són gens paràlegs i que van aparèixer per duplicació gènica i evolució posterior. De fet, l'anàlisi filogenètica agrupa els KCNEs de mamífer en subfamílies formades pels ortòlegs de ratolí (o rata, no incloses aquí) (Fig. 33). Aquesta anàlisi col·loca a *KCNE1* i

KCNE2 com els paràlegs més propers, i per tant els duplicats més recentment, i KCNE4 i KCNE5 com els més allunyats.

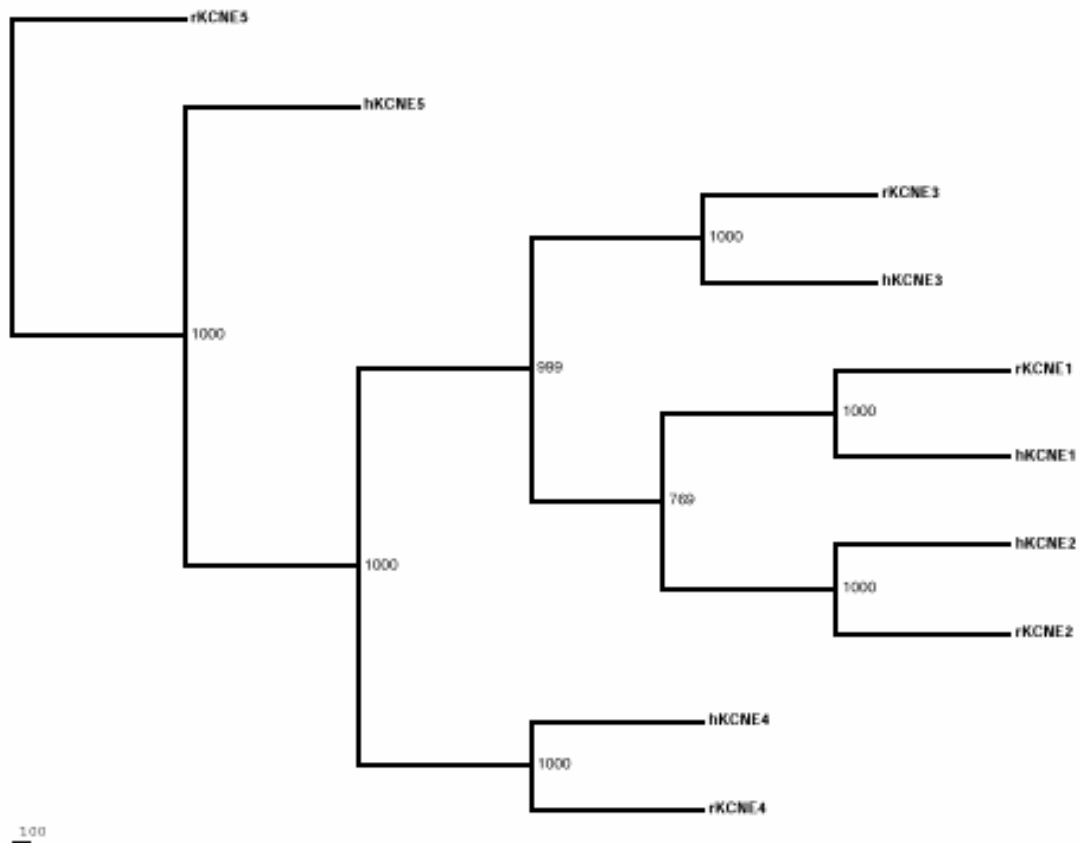


Figura 33. Arbre filogenètic de la família KCNE

Quan es comparen els productes proteics pels quals codifiquen, es pot observar que tots tenen una longitud similar, amb 103 aa el més petit (KCNE3) i 170 aa el més gran (KCNE4), tots estan caracteritzats per una regió transmembrana que deixa extrems N-terminal i C-terminal variables, com es pot veure en la Fig. 34.

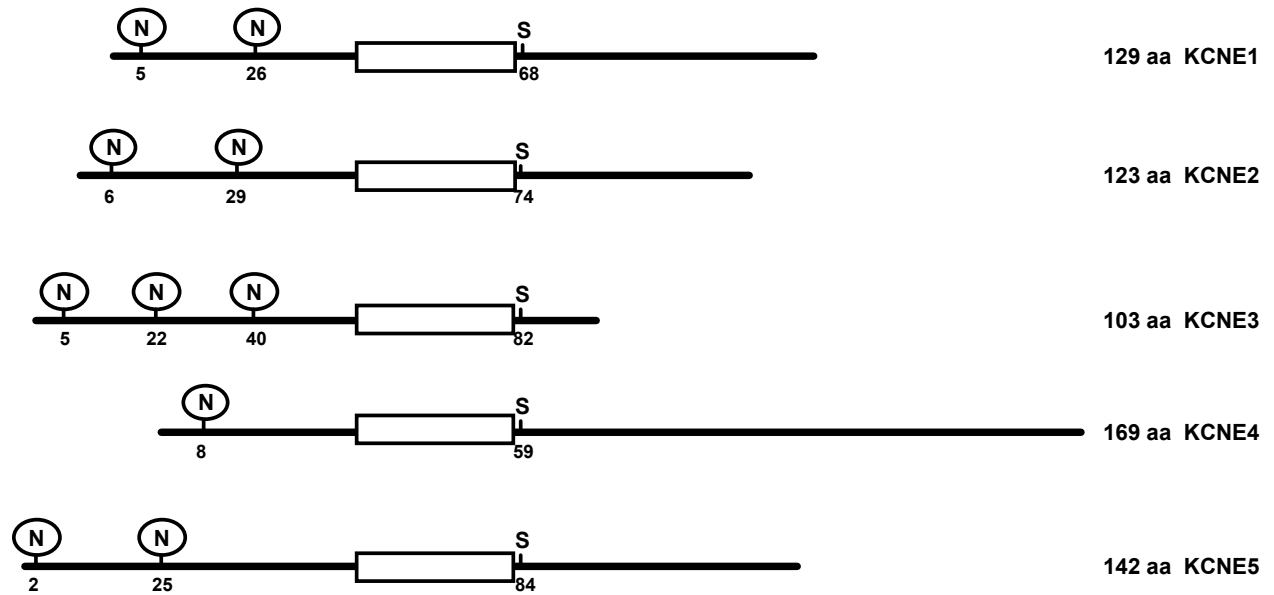


Figura 34. Comparació esquemàtica de l'estructura de tots els membres de la família KCNE.

A l'extrem N-terminal, pels casos en els quals s'ha determinat (KCNE1, Murai et al., 1989; KCNE2 i KCNE3, aquesta tesi), es troba exposat al medi extracel·lular (Fig. 35), i presenta com a mínim un lloc de N-glicosilació, i el situat més a l'extrem N-terminal es troba present en tots els casos (Fig. 34).

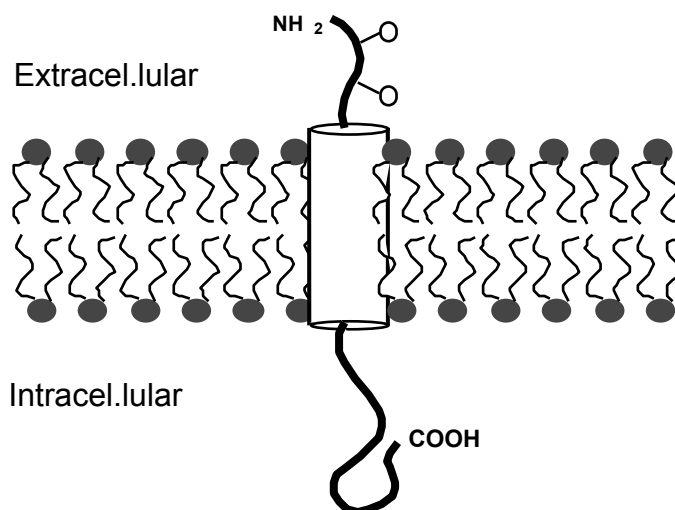


Figura 35. Esquema que il·lustra la possible localització subcel·lular dels membres de la família KCNE.

Tots els membres de la família tenen un lloc de fosforilació per PKC en l'extrem C-terminal intracel·lular, que podria ser clau en la regulació per PKC de certs tipus de corrents iònics (Varnum et al., 1993). Aquesta relació només ha estat demostrada per a KCNE1, quan la S102 és fosforilada (Zhang et al., 1994), no havent-hi lloc de fosforilació equivalent en cap dels altres membres de la família. KCNE3 i KCNE4 tenen llocs consens de fosforilació per PKA (KCNE3, S49; KCNE4, S68), que podrien ser rellevants en la regulació de certs corrents per cAMP.

El grau d'homologia a nivell d'aminoàcids es troba al voltant del 35% de promig, però s'eleva quan es compara el segment transmembrana, més curt a KCNE4, i les regions adjacents (Fig. 36), regions que han estat considerades importants des del punt de vista funcional (Takumi et al., 1991; Romey et al., 1997; Sesti et al., 2000).

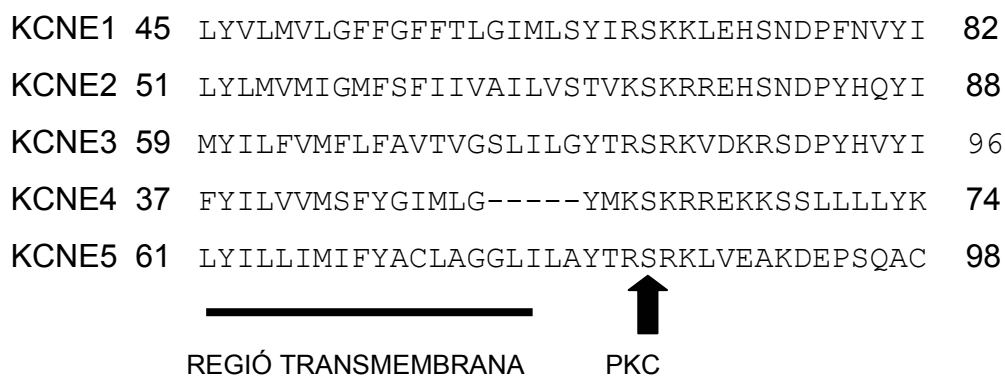


Figura 36. Comparació a nivell d'aa del segment transmembrana de tots els membres de la família KCNE.

El domini transmembrana també s'ha considerat important en la definició funcional de les subunitats KCNE (Tapper i George, 2000; Melman et al., 2001). Aquesta importància queda reflectida en l'espectre de mutacions que s'han detectat a *KCNE1*, *KCNE2* i *KCNE3* (Taula 14).

GEN	MUTACIÓ	REFERÈNCIA
<i>KCNE1</i>	R32H	Splawski et a., 2000
<i>KCNE1</i>	V47F	Splawski et a., 2000
<i>KCNE1</i>	L51H	Splawski et a., 2000
<i>KCNE1</i>	TL58-59	Splawski et a., 2000
<i>KCNE1</i>	T59P	Schulze-Bahr et al., 1997
<i>KCNE1</i>	L60P	Sesti et al., 1998
<i>KCNE1</i>	T7I	Duggal et al., 1998
<i>KCNE1</i>	S74L	Bianchi et al., 1999
<i>KCNE1</i>	D76N	Sesti et al., 1998
<i>KCNE1</i>	W87R	Splawski et a., 2000
<i>KCNE1</i>	R98W	Splawski et a., 2000
<i>KCNE1</i>	P127T	Splawski et a., 2000
<i>KCNE2</i>	Q9E	Abbot et al., 1999
<i>KCNE2</i>	M54T	Abbot et al., 1999
<i>KCNE2</i>	I57T	Abbot et al., 1999
<i>KCNE2</i>	T8A	Abbot et al., 1999
<i>KCNE2</i>	A116V	Sesti et al., 2000
<i>KCNE3</i>	R83H	Abbot et al., 2001

Taula 14. Llista de mutacions descrites en els diferents *KCNE*.

Cal destacar la mutació T8A, que és equivalent a T7I, identificada a *KCNE1* (Duggal et al., 1998), que redueix la I_{KS} alterant l'obertura del canal, i que afectaria el lloc conservat de glicosilació en posició N-terminal.

Pel que fa referència als patrons d'expressió dels membres de la família, es pot concloure que mostren patrons d'expressió completament diferents (Fig. 37).

KCNE1 és el membre d'expressió majoritari a cor, no existint diferències entre cada una de les parts analitzades ja que es detecta la mateixa intensitat als

ventricles com a les aurícules, septe i àpex. També s'observa expressió a la tràquea, ronyó, pulmó, testicles i glàndula mamària. Cal mencionar que en la línia cel·lular provinent d'un carcinoma de pulmó no es detecta expressió. *KCNE1* es comença a expressar a etapes fetals, concretament a cor i a pulmó.

La distribució de *KCNE2* per teixits és la més específica, doncs s'expressa molt intensament a l'estómac i amb molta menys intensitat al duodè i als testicles. És possible que hi hagi expressió a nivell molt baix a cervell i sub-regions del sistema nerviós central, així com en altres teixits.

KCNE3 té el patró d'expressió menys restringit de la família. S'expressa al llarg de tot el tracte digestiu, ronyó, melsa, sang perifèrica, medul·la òssia, tràquea, pulmó, placenta, úter, ovari, fetge, pàncrees i tiroides. A nivell fetal s'expressa a ronyó, fetge, melsa i pulmó. L'expressió a línies cel·lulars és reduïda. Únicament la línia K-562, provinent de leucèmia i a la línia provinent d'un adenocarcinoma colorectal mostren nivells d'expressió detectables.

KCNE4 no ha pogut ser amplificat, però ESTs presents a les bases de dades correponen a llibreries de cDNA de pulmó. Els ESTs de l'ortòleg de ratolí, pertanyen a llibreries de ronyó, melsa i embrions totals, suggerint que aquest membre de la família s'expressa en estadis molt primerencs del desenvolupament.

KCNE5 s'expressa majoritàriament a cervell, placenta, múscul esquelètic i cor (Piccini et al., 1999).

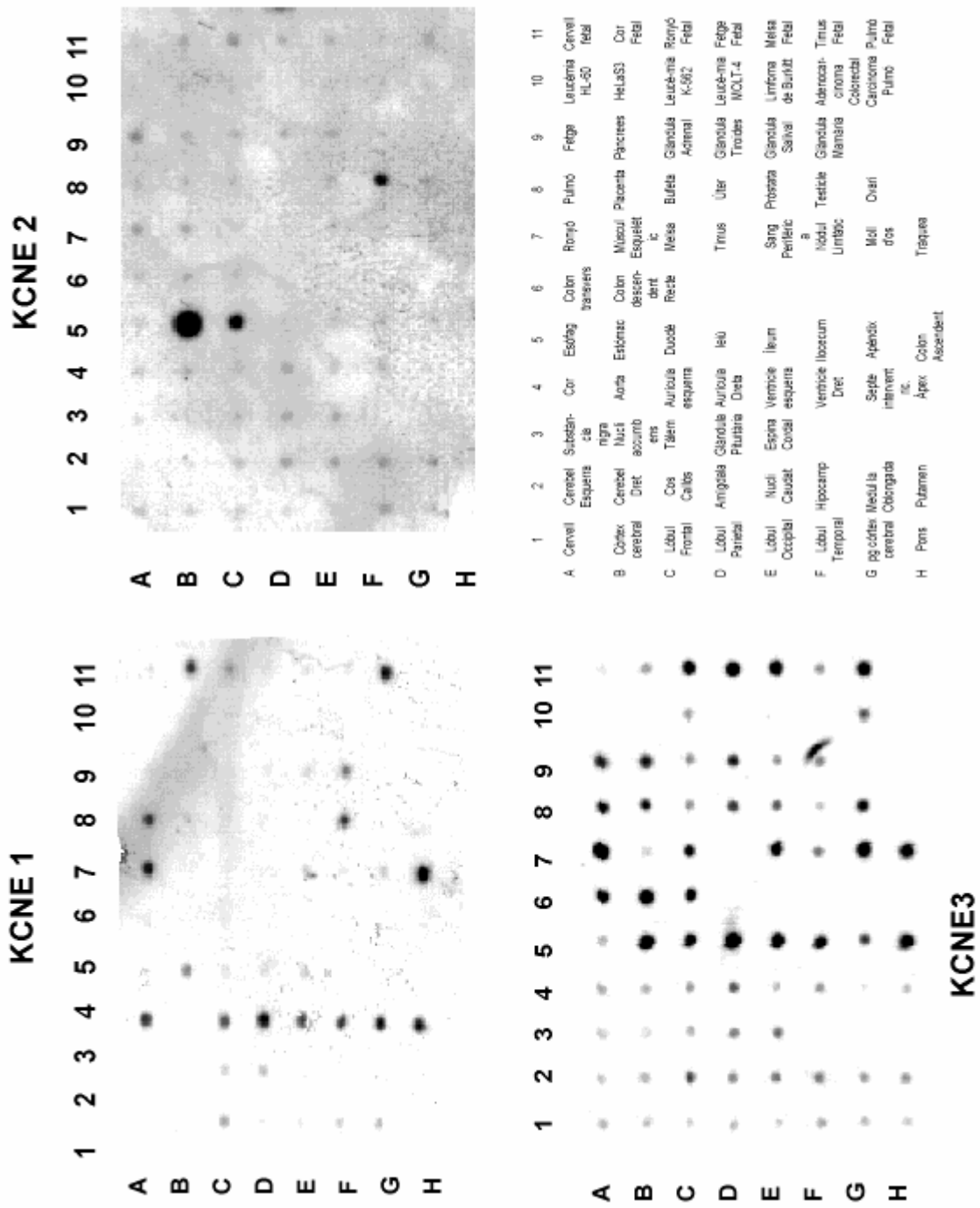


Figura 37. Membrana de mRNA poliA+ de diferents teixits hibridada amb A: sonda específica de *KCNE1*. B: sonda específica de *KCNE2*. C: Sonda específica de *KCNE3*.

Pel que fa a les subunitats α estudiades, *HERG* i *KCNQ1*, són les dues subunitats α més ubíques, expressades en una gran varietat d'epitelis com el ronyó, pàncrees, intestí prim i gruixut i estómac.

A nivell fetal, *KCNQ1* i *HERG*, ocupen llocs lleugerament diferents, abastant tots els teixits estudiats, a excepció del cervell, on faria la funció *KCNQ2* i/o *KCNQ3*. És en aquest teixit on es troba a faltar una subunitat β específica.

Els tres *KCNEs* analitzats tenen un patró d'expressió feble a sistema nerviós central, amb subtils diferències quan es comparen entre ells. Per exemple *KCNE1* és gairebé indetectable a cerebel, però s'expressa a tàlem, on *KCNE2* no es detecta. En el sistema nerviós els *KCNEs* colocalitzarien predominantment amb *KCNQ2* i *KCNQ3*. De fet, *KCNE1* i *KCNE2* poden alterar l'amplitud de corrent d'heterodímers *KCNQ2* i *KCNQ3* (Yang et al., 1998; Tinel et al., 2000), suggerint que aquestes subunitats β podrien ser reguladores de corrents tipus M.

En resum, comparant els patrons d'expressió de les subunitats formadores de porus (Fig. 32) i els *KCNEs* descrits aquí (Fig. 36), es pot concloure, per exemple, que *KCNE1* comparteix expressió a cor amb *KCNQ1* i *HERG*, fet que estaria d'acord amb les interaccions que han estat descrites per aquestes subunitats (Barhanin et al., 1996; McDonald et al., 1997). L'expressió de *KCNE3* és apreciable a sistema nerviós, compartint aquesta característica amb *KCNQ2* i *KCNQ3*. *KCNQ1* i *HERG* tenen una expressió detectable a estómac, on podrien ser la parella de *KCNE2*, on aquest s'expressa majoritàriament, podent formar canals de potassi responsables de la hiperpolarització de les cèl·lules epitelials que indueix la secreció apical d'ions clorur en aquest teixit. De fet, existeixen evidències de corrent de potassi en la membrana basolateral (Demarest i Loo, 1990) i en la membrana luminal (Wolosin et al., 1984) de l'epiteli gàstric. Recentment s'ha descrit que *KCNE2* pot interaccionar amb *KCNQ1* (Tinel et al., 2000) afectant les propietats del canal heterodimèric format. Aquest tipus de corrent de potassi també existeix a l'epiteli secretor de l'intestí i de la tràquea (MacVinish et al., 1998), essent la subunitat β *KCNE3* la més expressada en aquests teixits. Des d'aquest punt de vista, seria interessant buscar l'associació de

mutacions o polimorfismes en gens d'aquesta família en malalties causades per l'excessiva secreció epitelial d'ions clorur, com les úlceres pèptiques, o per la seva falta de secreció.

Només *KCNQ1* s'expressa a ronyó, on podria aparellar-se amb *KCNE3*, fet que concordaria amb l'associació funcional que s'ha demostrat (Melman et al., 2001).

No obstant, no s'ha d'oblidar que la recent descripció de l'associació d'un membre d'una altra família de proteïnes formadores de porus, Kv3.4 (*KCNC4*) amb *KCNE3* (Abbot et al., 2001) amplia les possibilitats d'aparellaments entre les diferents subunitats.

Els efectes descrits pels membres d'aquesta família de subunitats β de canals de potassi sobre les propietats dels canals en els quals intervenen, així com la identificació de mutacions associades a malalties en humans (*KCNE1* i *KCNE2* amb arítmies cardíques i *KCNE3* amb paràlisi periòdica) indiquen que les funcions fisiològiques d'aquesta família de proteïnes són de gran importància pel correcte funcionament de molts tipus cel·lulars. És interessant destacar en aquest punt que *KCNE5* és un dels gens deletats en la síndrome de gens contigus AMME, juntament amb *COL4A5*, *FACL4* i *AMMECR1* (Piccini et al., 1999) i que *KCNE4* mapa a 2q36, on s'han mapat un locus de la forma autosòmica recessiva de la síndrome d'Alport (nefropatia, sordesa i retinopatia) i un locus per a l'epilèpsia generalitzada idiopàtica (EGI).

La identificació de mutacions i de polimorfismes de risc i l'anàlisi de com aquestes afecten al comportament dels canals, podria ajudar al diagnòstic presimptomàtic i al futur disseny de teràpies farmacològiques específiques.

CONTIG DE COSMIDIS I MAPA TRANSCRIPCIONAL

- S'ha participat en la construcció d'un contig de cosmidis de tres regions del HSA21, al voltant d'*AML1*, al voltant del marcador *D21S55* i al voltant del marcador *D21S53*, que cobreix al voltant de 3 Mb
- S'ha participat en la construcció d'un mapa transcripcional d'aquestes tres regions mitjançant una selecció de cDNA. Dels 45 cDNAs parcials no redundants aïllats, tres corresponien a *DSCR1* i un a *GIRK2*, tres tenien similitud amb *Dyrk* de *Drosophila*, 12 corresponien a EST o STS de les bases de dades i les 26 restants no tenien similitud amb cap seqüència coneguda.
- Estudis d'expressió varen demostrar que corresponien a seqüències expressades.
- No es va poder aportar seqüència nova de cDNA pels clons U81205 fins U81213 i U81226

KCNE2

- S'ha clonat i caracteritzat un nou gen del HSA21, *KCNE2*, pel mètode de clonatge *in silico*. El cDNA té 809 pb, amb una pauta de lectura oberta de 123 aa.
- *KCNE2* es troba a 78 kb del seu gen homòleg, *KCNE1*, i es transcriuen en sentits contraris. L'estructura genòmica consta d'un únic exó codificant, i un exó no codificant en posició 5'.
- *KCNE2* es transcriu com a un mRNA d'unes 1.35 kb a cor i més feblement a múscul esquelètic. Els teixits d'expressió majoritària són estómac i duodè.
- L'estructura primària de *KCNE2* prediu un segment transmembrana a l'extrem C-terminal i s'ha demostrat que la proteïna *KCNE2* es localitza a la membrana cel·lular, amb l'extrem N-terminal cap a l'exterior.
- No s'observa sobre-expressió de *KCNE2* a cor fetal SD, comparat amb mostres d'individus no-SD
- S'ha trobat un canvi de nucleòtid A22G que dóna lloc al canvi d'aa T8A, que afectaria un lloc consens de N-glicosilació. Aquest polimorfisme ha estat

descriu com un polimorfisme d'un únic nucleòtid que donaria susceptibilitat a patir arítmia cardíaca després del tractament amb certs fàrmacs. No s'ha pogut demostrar el mateix efecte en pacients amb sordesa.

- S'ha demostrat que la proteïna KCNE2 es glicosila en cèl·lules de mamífer, en les dues asparagines consens susceptibles de N-glicosilació.
- S'ha demostrat que l'eliminació de cada un dels llocs N-glicosilables, no afecta la localització de KCNE2 a la membrana plasmàtica.

KCNE3

- S'ha clonat i caracteritzat un nou gen de la família *KCNE*, *KCNE3*, pel mètode de clonatge *in silico*. El cDNA té 1647 pb, amb una pauta de lectura oberta de 103 aa.
- *KCNE3* mapa a 11q13-14. La seva estructura genòmica consta d'un únic exó codificant, i dos exons no codificants en posició 5'.
- *KCNE3* es transcriu com a un mRNA d'unes 3 kb a intestí prim, ovari, colon i sang perifèrica.
- *KCNE3* és una proteïna glicosilada que es localitza a la membrana plasmàtica de cèl·lules de mamífer, amb l'extrem N-terminal cap a l'exterior.
- S'ha trobat el polimorfisme T198C que dona lloc al canvi d'aa F66L, present en el 15% de la població analitzada.
- S'ha realitzat una anàlisi comparativa de l'expressió dels gens *KCNE1*, *KCNE2* i *KCNE3* que indica que els patrons d'expressió de cada gen són dependents de teixit.
- S'ha realitzat una anàlisi comparativa de l'expressió dels gens *KCNQ1*, *KCNQ2*, *KCNQ3* i *HERG* que indica que els patrons d'expressió de cada gen són dependents de teixit.
- L'elevada homologia de seqüència amb *KCNE1*, el fet de ser proteïnes glicosilades i que localitzen a la membrana plasmàtica amb una topologia similar a *KCNE1*, suggereix que *KCNE2* i *KCNE3* són subunitats β de canals de potassi dependents de voltatge.

- Abbott, G. W., Butler, M. H., Bendahhou, S., Dalakas, M. C., Ptacek, L. J., and Goldstein, S. A. (2001). MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 104, 217-31.
- Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., and Goldstein, S. A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97, 175-87.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.
- Adams, M. M., Erickson, J. D., Layde, P. M., and Oakley, G. P. (1981). Down's syndrome. Recent trends in the United States. *Jama* 246, 758-60.
- Ahlbom, B. E., Goetz, P., and et al. (1996). Molecular analysis of chromosome 21 in a patient with a phenotype of Down syndrome and apparently normal karyotype. *Am J Med Genet* 63, 566-72.
- Andrie, M., Fiedler, W., Rett, A., Ambros, P., and Schweizer, D. (1979). A case of trisomy 22 in *Pongo pygmaeus*. *Cytogenet Cell Genet* 24, 1-6.
- Antonarakis, S. E. (1998). 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 51, 1-16.
- Antonarakis, S. E. (1993). Human chromosome 21: genome mapping and exploration, circa 1993. *Trends Genet* 9, 142-8.
- Antonarakis, S. E. (1991). Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med* 324, 872-6.
- Antonarakis, S. E., Petersen, M. B., McInnis, M. G., Adelsberger, P. A., Schinzel, A. A., Binkert, F., Pangalos, C., Raoul, O., Slaugenhaupt, S. A., Hafez, M., and et al. (1992). The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 50, 544-50.
- Arai, Y., Suzuki, A., Mizuguchi, M., and Takashima, S. (1997). Developmental and aging changes in the expression of amyloid precursor protein in Down syndrome brains. *Brain Dev* 19, 290-4.
- Armstrong, R. A. (1999). Do beta-amyloid (A β) deposits in patients with Alzheimer's disease and Down's syndrome grow according to the log-normal model? *Neurosci Lett* 261, 97-100.
- Aula, P., Leisti, J., and Koskull, H. v. (1973). Partial trisomy 21. *Clin Genet* 4, 241-51.

Avramopoulos, D., Kennerknecht, I., Barbi, G., Eckert, D., Delabar, J. M., Maunoury, C., Hallberg, A., and Petersen, M. B. (1997). A case of apparent trisomy 21 without the Down's syndrome phenotype. *J Med Genet* 34, 597-600.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80.

Becker, L. E., Mito, T., Takashima, S., Onodera, K., and Friend, W. C. (1993). Association of phenotypic abnormalities of Down syndrome with an imbalance of genes on chromosome 21. *APMIS Suppl* 40, 57-70.

Bianchi, L., Shen, Z., Dennis, A. T., Priori, S. G., Napolitano, C., Ronchetti, E., Bryskin, R., Schwartz, P. J., and Brown, A. M. (1999). Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 1499-507.

Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., and Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-6.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-74.

Blouin, J. L., Christie, D. H., Gos, A., Lynn, A., Morris, M. A., Ledbetter, D. H., Chakravarti, A., and Antonarakis, S. E. (1995). A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. *Am J Hum Genet* 57, 388-94.

Bosch, A., Guimera, J., Pereira de Souza, A., and Estivill, X. (1994). The EUROGEN map of human chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 2, 244-5.

Buckler, A. J., Chang, D. D., Graw, S. L., Brook, J. D., Haber, D. A., Sharp, P. A., and Housman, D. E. (1991). Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4005-9.

Cantu, J. M., Hernandez, A., Plascencia, L., Vaca, G., Moller, M., and Rivera, H. (1980). Partial trisomy and monosomy 21 in an infant with an unusual de novo 21/21 translocation. *Ann Genet* 23, 183-6.

Carr, J. (1994). Long-term-outcome for people with Down's syndrome. *J Child Psychol Psychiatry* 35, 425-39.

Casimiro, M. C., Knollmann, B. C., Ebert, S. N., Vary, J. C., Jr., Greene, A. E., Franz, M. R., Grinberg, A., Huang, S. P., and Pfeifer, K. (2001). Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2526-2531.

Catterall, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64, 493-531.

Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., and Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18, 53-5.

Charpentier, F., Merot, J., Riochet, D., Le Marec, H., and Escande, D. (1998). Adult KCNE1-knockout mice exhibit a mild cardiac cellular phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 806-10.

- Chen, H., Chrast, R., Rossier, C., Morris, M. A., Lalioti, M. D., and Antonarakis, S. E. (1996). Cloning of 559 potential exons of genes of human chromosome 21 by exon trapping. *Genome Res* 6, 747-60.
- Cheng, J. F., Boyartchuk, V., and Zhu, Y. (1994). Isolation and mapping of human chromosome 21 cDNA: progress in constructing a chromosome 21 expression map. *Genomics* 23, 75-84.
- Chevillard, C., Attali, B., Lesage, F., Fontes, M., Barhanin, J., Lazdunski, M., and Mattei, M. G. (1993). Localization of a potassium channel gene (KCNE1) to 21q22.1-q22.2 by in situ hybridization and somatic cell hybridization. *Genomics* 15, 243-5.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *Embo J* 16, 5472-9.
- Chumakov, I. M., Le Gall, I., Billault, A., Ougen, P., Soularue, P., Guillou, S., Rigault, P., Bui, H., De Tand, M. F., Barillot, E., and et al. (1992). Isolation of chromosome 21-specific yeast artificial chromosomes from a total human genome library. *Nat Genet* 1, 222-5.
- Colgan, D. F., and Manley, J. L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11, 2755-66.
- Cox, D. R., Smith, S. A., Epstein, L. B., and Epstein, C. J. (1984). Mouse trisomy 16 as an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome): production of viable trisomy 16 diploid mouse chimeras. *Dev Biol* 101, 416-24.
- Cross, P. K., and Hook, E. B. (1987). An analysis of paternal age and 47,+21 in 35,000 new prenatal cytogenetic diagnosis data from the New York State Chromosome Registry: no significant effect. *Hum Genet* 77, 307-16.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., and Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803.
- Cutler, A. T., Benezra-Obeiter, R., and Brink, S. J. (1986). Thyroid function in young children with Down syndrome. *Am J Dis Child* 140, 479-83.
- Daumer-Haas, C., Schuffenhauer, S., Walther, J. U., Schipper, R. D., Porstmann, T., and Korenberg, J. R. (1994). Tetrasomy 21 pter-q22.1 and Down syndrome: molecular definition of the region. *Am J Med Genet* 53, 359-65.
- Davisson, M., Schmidt C, Reeves RH, Irving NG, Akeson EC, Harris BS, Bronson RT. (1993). Segmental trisomy as a model for Down syndrome. In *The phenotypic mapping of Down syndrome and other aneuploid conditions*, E. CJ, ed. (New York: Wiley-Liss), pp. 117-133.
- Davisson, M. T., and Costa, A. C. (1998). Mouse Models of Down Syndrome. *Mouse models of human genetic neurological disease Popkp B New York*.
- Davisson, M. T., Schmidt, C., and Akeson, E. C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360, 263-80.
- Deal, K. K., England, S. K., and Tamkun, M. M. (1996). Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev* 76, 49-67.
- Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1, 114-24.

Demarest, J. R., and Loo, D. D. (1990). Electrophysiology of the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 52, 307-19.

Deol, M. S. (1968). Inherited diseases of the inner ear in man in the light of studies on the mouse. *J Med Genet* 5, 137-58.

Devenny, D. A., Silverman, W. P., Hill, A. L., Jenkins, E., Sersen, E. A., and Wisniewski, K. E. (1996). Normal ageing in adults with Down's syndrome: a longitudinal study. *J Intellect Disabil Res* 40, 208-21.

Dierssen, M., Vallina, I. F., Baamonde, C., Garcia-Calatayud, S., Lumbreras, M. A., and Florez, J. (1997). Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res* 749, 238-44.

Down, J. (1866). Observations of an ethnic classification of idiots. *Clinical Lectures and Reports by the Medical and Surgical Staff of the London Hospital* 3, 259-262.

Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

Doyle, J. L., and Stubbs, L. (1998). Ataxia, arrhythmia and ion-channel gene defects. *Trends Genet* 14, 92-8.

Dufresne-Zacharia, M. C., Dahmane, N., Theophile, D., Orti, R., Chettouh, Z., Sinet, P. M., and Delabar, J. M. (1994). 3.6-Mb genomic and YAC physical map of the Down syndrome chromosome region on chromosome 21. *Genomics* 19, 462-9.

Duggal, P., Vesely, M. R., Wattanasirichaigoon, D., Villafane, J., Kaushik, V., and Beggs, A. H. (1998). Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 97, 142-6.

Duggal, P., Vesely, M. R., Wattanasirichaigoon, D., Villafane, J., Kaushik, V., and Beggs, A. H. (1998). Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 97, 142-6.

Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chisoe, S., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiewich, R., Beare, D. M., Clamp, M., Slink, L. J., Ainscough, R., Almeida, J. P., Babbage, A., Bagguley, C., Bailey, J., Barlow, K., Bates, K. N., Beasley, O., Bird, C. P., Blakey, S., Bridgeman, A. M., Buck, D., Burgess, J., Burrill, W. D., O'Brien, K. P., and et al. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402, 489-95.

Eki, T., Abe, M., Furuya, K., Fujishima, N., Kishida, H., Shiratori, A., Yokoyama, K., Le Paslier, D., Cohen, D., and Murakami, Y. (1996). 1.8-megabases fine physical map encompassing IFNAR and AML1 loci on human chromosome 21q22.1. *DNA Seq* 6, 95-108.

Elson, A., Levanon, D., Weiss, Y., and Groner, Y. (1994). Overexpression of liver-type phosphofructokinase (PFKL) in transgenic-PFKL mice: implication for gene dosage in trisomy 21. *Biochem J* 299, 409-15.

Epstein, C. J. (1995). Epilogue: toward the twenty-first century with Down syndrome: a personal view of how far we have come and of how far we can reasonably expect to go. *Prog Clin Biol Res* 393, 241-6.

- Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C., and Groner, Y. (1987). Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 8044-8.
- Epstein, C. J., Cox, D. R., and Epstein, L. B. (1985). Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann N Y Acad Sci* *450*, 157-68.
- Epstein, C. J., Foster, D. B., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1991). Acceleration of scrapie in trisomy 16: diploid aggregation chimeras. *Ann Neurol* *29*, 95-7.
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., Tobena, A., and Florez, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* *199*, 143-6.
- Escorihuela, R. M., Vallina, I. F., Martinez-Cue, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobena, A., Florez, J., and Fernandez-Teruel, A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett* *247*, 171-4.
- Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S., Rabionet, R., Melchionda, S., D'Agruma, L., Mansfield, E., Rappaport, E., Govea, N., Mila, M., Zelante, L., and Gasparini, P. (1998). Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* *351*, 394-8.
- Estivill, X., Govea, N., Barcelo, E., Badenas, C., Romero, E., Moral, L., Scozzri, R., D'Urbano, L., Zeviani, M., and Torroni, A. (1998). Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* *62*, 27-35.
- Estivill, X., and Williamson, R. (1987). A rapid method to identify cosmids containing rare restriction sites. *Nucleic Acids Res* *15*, 1415-25.
- Ferrer, J., Nichols, C. G., Makhina, E. N., Salkoff, L., Bernstein, J., Gerhard, D., Wasson, J., Ramanadham, S., and Permutt, A. (1995). Pancreatic islet cells express a family of inwardly rectifying K⁺ channel subunits which interact to form G-protein-activated channels. *J Biol Chem* *270*, 26086-91.
- Freeman, L. C., Lippold, J. J., and Mitchell, K. E. (2000). Glycosylation influences gating and pH sensitivity of I_(sK). *J Membr Biol* *177*, 65-79.
- Fuentes, J. J., Pritchard, M. A., Planas, A. M., Bosch, A., Ferrer, I., and Estivill, X. (1995). A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* *4*, 1935-44.
- Fuentes, J. J., Pucharcos, C., Pritchard, M., and Estivill, X. (1997). Alu-splice PCR: a simple method to isolate exon-containing fragments from cloned human genomic DNA. *Hum Genet* *101*, 346-50.
- Gardiner, K. (1990). Physical mapping of the long arm of chromosome 21. *Prog Clin Biol Res* *360*, 1-14.
- Gardiner, K., Graw, S., Ichikawa, H., Ohki, M., Joetham, A., Gervy, P., Chumakov, I., and Patterson, D. (1995). YAC analysis and minimal tiling path construction for chromosome 21q. *Somat Cell Mol Genet* *21*, 399-414.
- Gardiner, K., Ichikawa, H., Ohki, M., Patterson, D., and Cheng, J. F. (1995). Localization of cDNAs to a region poorly represented in the CEPH chromosome 21 YAC contig: candidate genes for genetic diseases mapped to 21q22.3. *Genomics* *30*, 376-9.

Garver, K. L., Law, J. C., and Garver, B. (1985). Hirschsprung disease: a genetic study. *Clin Genet* **28**, 503-8.

Gasic, G. P., and Heinemann, S. (1991). Receptors coupled to ionic channels: the glutamate receptor family. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 20-6.

Gearhart, J., Singer HS, Moran TH, Tiemeyer M, Oster-Granite ML, Coyle J (1986). Mouse chimeras composed of trisomy 16 and normal cells: preliminary studies. *Brain Res Bull* **16**, 815.

Gjertson, C., Sturm, K. S., and Berger, C. N. (1999). Hematopoietic deficiencies and core binding factor expression in murine Ts16, an animal model for Down syndrome. *Clin Immunol* **91**, 50-60.

Goffeau, A., Park, J., Paulsen, I. T., Jonniaux, J. L., Dinh, T., Mordant, P., and Saier, M. H., Jr. (1997). Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* **13**, 43-54.

Graw, S. L., Gardiner, K., Hall-Johnson, K., Hart, I., Joetham, A., Walton, K., Donaldson, D., and Patterson, D. (1995). Molecular analysis and breakpoint definition of a set of human chromosome 21 somatic cell hybrids. *Somat Cell Mol Genet* **21**, 415-28.

Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* **5**, 1305-10.

Guimera, J., Pucharcos, C., Domenech, A., Casas, C., Solans, A., Gallardo, T., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. (1997). Cosmid contig and transcriptional map of three regions of human chromosome 21q22: identification of 37 novel transcripts by direct selection. *Genomics* **45**, 59-67.

Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., and Weissenbach, J. (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* **7**, 246-339.

Harada, T., and Sando, I. (1981). Temporal bone histopathologic findings in Down's syndrome. *Arch Otolaryngol* **107**, 96-103.

Hasle, H., Clemmensen, I. H., and Mikkelsen, M. (2000). Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* **355**, 165-9.

Hatch, M., Kline, J., Levin, B., Hutzler, M., and Warburton, D. (1990). Paternal age and trisomy among spontaneous abortions. *Hum Genet* **85**, 355-61.

Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D. K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., and Schudy, A. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature* **405**, 311-9.

Holland, A. J., Hon, J., Huppert, F. A., and Stevens, F. (2000). Incidence and course of dementia in people with Down's syndrome: findings from a population-based study. *J Intellect Disabil Res* **44**, 138-46.

Holtzman, D. M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D. J., Daniels, S. E., Johnson, R. M., Chen, K., Sun, Y., Carlson, E., Alleva, E., Epstein, C. J., and Mobley, W. C. (1996).

Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13333-8.

Hubert, R. S., Mitchell, S., Chen, X. N., Ekmekji, K., Gadomski, C., Sun, Z., Noya, D., Kim, U. J., Chen, C., Shizuya, H., Simon, M., de Jong, P. J., and Korenberg, J. R. (1997). BAC and PAC contigs covering 3.5 Mb of the Down syndrome congenital heart disease region between D21S55 and MX1 on chromosome 21. *Genomics* 41, 218-26.

Hyde, L. A., Frisone, D. F., and Crnic, L. S. (2001). Ts65Dn mice, a model for Down syndrome, have deficits in context discrimination learning suggesting impaired hippocampal function. *Behav Brain Res* 118, 53-60.

Iannotti, C. A., Dargis, P. G., Christian, E. P., and Aiyar, J. (1998). The expression pattern of KCNQ2 splice variants in neuronal proliferation and differentiation. *Abstr.-Soc. Neurosci.*

Ichikawa, H., Hosoda, F., Arai, Y., Shimizu, K., Ohira, M., and Ohki, M. (1993). A NotI restriction map of the entire long arm of human chromosome 21. *Nat Genet* 4, 361-6.

Itoh, T., Tanaka, T., Nagai, R., Kamiya, T., Sawayama, T., Nakayama, T., Tomoike, H., Sakurada, H., Yazaki, Y., and Nakamura, Y. (1998). Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum Genet* 102, 435-9.

Jacobs, P. A., Baikie, A. G., Court Brown, W. M., and Strong, J. A. (1959). The somatic chromosome in mongolism. *Lancet* 1, 710-711.

Jervell, A. a. L.-N., F (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. *Am. Herat J.* 54, 59-68.

Jiang, C., Atkinson, D., Towbin, J. A., Splawski, I., Lehmann, M. H., Li, H., Timothy, K., Taggart, R. T., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., and et al. (1994). Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat Genet* 8, 141-7.

Kao, F. T., Yu, J., Tong, S., Qi, J., Patanjali, S. R., Weissman, S. M., and Patterson, D. (1994). Isolation and refined regional mapping of expressed sequences from human chromosome 21. *Genomics* 23, 700-3.

Keating, M., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G. M., and Leppert, M. (1991). Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science* 252, 704-6.

Kharkovets, T., Hardelin, J. P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., and Jentsch, T. J. (2000). KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4333-8.

Korenberg, J. R. (1995). Mental modelling. *Nat Genet* 11, 109-11.

Korenberg, J. R., Bradley, C., and Disteché, C. M. (1992). Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet* 50, 294-302.

Korenberg, J. R., Chen, X. N., Mitchell, S., Fannin, S., Gerwehr, S., Cohen, D., and Chumakov, I. (1995). A high-fidelity physical map of human chromosome 21q in yeast artificial chromosomes. *Genome Res* 5, 427-43.

Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C., and et al. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4997-5001.

Korenberg, J. R., Kawashima, H., Pulst, S. M., Allen, L., Magenis, E., and Epstein, C. J. (1990). Down syndrome: toward a molecular definition of the phenotype. *Am J Med Genet Suppl* 7, 91-7.

Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., and Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437-46.

Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Dierssen, M., and Florez, J. (2000). Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain Res* 858, 191-7.

Lafreniere, R. G., de Jong, P. J., and Rouleau, G. A. (1995). A 405-kb cosmid contig and HindIII restriction map of the progressive myoclonus epilepsy type 1 (EPM1) candidate region in 21q22.3. *Genomics* 29, 288-90.

Lai, F., and Williams, R. S. (1989). A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol* 46, 849-53.

Lejeune, J., Gautier, M., and Turpin, R. (1959). Etude des chromosome somatique des neufs enfants mongoliens. *CR Acad Sci Paris*, 1721-1722.

Lerche, C., Scherer, C. R., Seeböhm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E., and Steinmeyer, K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275, 22395-400.

Lesage, F., Attali, B., Lakey, J., Honore, E., Romey, G., Faurobert, E., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1993). Are *Xenopus* oocytes unique in displaying functional *IsK* channel heterologous expression? *Receptors Channels* 1, 143-52.

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996). A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J Biol Chem* 271, 4183-7.

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo J* 15, 1004-11.

Levy, J. (1991). The gastrointestinal tract in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 373, 245-56.

Lovett, M., Kere, J., and Hinton, L. M. (1991). Direct selection: a method for the isolation of cDNAs encoded by large genomic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9628-32.

Lucente, D., Chen, H. M., Shea, D., Samec, S. N., Rutter, M., Chrast, R., Rossier, C., Buckler, A., Antonarakis, S. E., and McCormick, M. K. (1995). Localization of 102 exons to a 2.5 Mb region involved in Down syndrome. *Hum Mol Genet* 4, 1305-11.

MacVinish, L. J., Hickman, M. E., Mufti, D. A., Durrington, H. J., and Cuthbert, A. W. (1998). Importance of basolateral K⁺ conductance in maintaining Cl⁻ secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol* 510, 237-47.

Mann, D. M. (1988). Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Histopathology* 13, 125-37.

Mann, D. M. (1988). The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease. *Mech Ageing Dev* 43, 99-136.

- Marks, A., O'Hanlon, D., Lei, M., Percy, M. E., and Becker, L. E. (1996). Accumulation of S100 beta mRNA and protein in cerebellum during infancy in Down syndrome and control subjects. *Brain Res Mol Brain Res* 36, 343-8.
- Mattei, J. F., Mattei, M. G., Baeteman, M. A., and Giraud, F. (1981). Trisomy 21 for the region 21q223: identification by high-resolution R-banding patterns. *Hum Genet* 56, 409-11.
- Mazzoni, D. S., Ackley, R. S., and Nash, D. J. (1994). Abnormal pinna type and hearing loss correlations in Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 38, 549-60.
- McClure, H. M., Belden, K. H., Pieper, W. A., and Jacobson, C. B. (1969). Autosomal trisomy in a chimpanzee: resemblance to Down's syndrome. *Science* 165, 1010-2.
- McCormick, M. K., Schinzel, A., Petersen, M. B., Stetten, G., Driscoll, D. J., Cantu, E. S., Tranebjaerg, L., Mikkelsen, M., Watkins, P. C., and Antonarakis, S. E. (1989). Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics* 5, 325-31.
- McCormick, M. K., Shero, J. H., Cheung, M. C., Kan, Y. W., Hieter, P. A., and Antonarakis, S. E. (1989). Construction of human chromosome 21-specific yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9991-5.
- McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K. W., Goldstein, S. A., and Fishman, G. I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* 388, 289-92.
- McInnis, M. G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M. B., Sharma, V., Avramopoulos, D., Blouin, J. L., Konig, U., Brahe, C., Matise, T. C., and et al. (1993). A linkage map of human chromosome 21:43 PCR markers at average intervals of 2.5 cM. *Genomics* 16, 562-71.
- McPherson, J. D., Wasmuth, J. J., Chandy, K. G., Swanson, R., Deathlefs, B., Chandy, G., Wymore, R., and Ghanshani, S. (1991). Chromosomal localization of 7 potassium channel genes. *Cytogenet. Cell Genet.* 58, 1979.
- Melman, Y. F., Domenech, A., de la Luna, S., and McDonald, T. V. (2001). Structural determinants of KvLQT1 control by the KCNE family of proteins. *J Biol Chem* 276, 6439-44.
- Milunsky, A., and Fisher, J. H. (1968). Annular pancreas in Down's syndrome. *Lancet* 2, 575.
- Morgan, J. G., Dolganov, G. M., Robbins, S. E., Hinton, L. M., and Lovett, M. (1992). The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids Res* 20, 5173-9.
- Murai, T., Kakizuka, A., Takumi, T., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 176-81.
- Murphy, M., and Epstein, L. B. (1992). Down syndrome (DS) peripheral blood contains phenotypically mature CD3+TCR alpha, beta+ cells but abnormal proportions of TCR alpha, beta+, TCR gamma, delta+, and CD4+ CD45RA+ cells: evidence for an inefficient release of mature T cells by the DS thymus. *Clin Immunol Immunopathol* 62, 245-51.
- Murphy, M., Insoft, R. M., Pike-Nobile, L., and Epstein, L. B. (1995). A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 393, 147-67.

Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., and Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 15, 186-9.

Niebuhr, E. (1974). Down's syndrome. The possibility of a pathogenetic segment on chromosome no. 21. *Humangenetik* 21, 99-101.

Niikawa, N., Deng, H. X., Abe, K., Harada, N., Okada, T., Tsuchiya, H., Akaboshi, I., Matsuda, I., Fukushima, Y., Kaneko, Y., and et al. (1991). Possible mapping of the gene for transient myeloproliferative syndrome at 21q11.2. *Hum Genet* 87, 561-6.

Nizetic, D., Gellen, L., Hamvas, R. M., Mott, R., Grigoriev, A., Vatcheva, R., Zehetner, G., Yaspo, M. L., Dutriaux, A., Lopes, C., and et al. (1994). An integrated YAC-overlap and 'cosmid-pocket' map of the human chromosome 21. *Hum Mol Genet* 3, 759-70.

Nizetic, D., Zehetner, G., Monaco, A. P., Gellen, L., Young, B. D., and Lehrach, H. (1991). Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3233-7.

Ohira, M., Ichikawa, H., Suzuki, E., Iwaki, M., Suzuki, K., Saito-Ohara, F., Ikeuchi, T., Chumakov, I., Tanahashi, H., Tashiro, K., and Sakaki, Y. (1996). A 1.6-Mb P1-based physical map of the Down syndrome region on chromosome 21. *Genomics* 33, 65-74.

Overhauser, J., McMahan, J., and Wasmuth, J. J. (1987). Identification of 28 DNA fragments that detect RFLPs in 13 distinct physical regions of the short arm of chromosome 5. *Nucleic Acids Res* 15, 4617-27.

Oyama, F., Cairns, N. J., Shimada, H., Oyama, R., Titani, K., and Ihara, Y. (1994). Down's syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination. *J Neurochem* 62, 1062-6.

Patil, N., Cox, D. R., Bhat, D., Faham, M., Myers, R. M., and Peterson, A. S. (1995). A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* 11, 126-9.

Patterson, D., Rahmani, Z., Donaldson, D., Gardiner, K., and Jones, C. (1993). Physical mapping of chromosome 21. *Prog Clin Biol Res* 384, 33-50.

Paz-Miguel, J. E., Flores, R., Sanchez-Velasco, P., Ocejo-Vinyals, G., Escribano de Diego, J., Lopez de Rego, J., and Leyva-Cobian, F. (1999). Reactive oxygen intermediates during programmed cell death induced in the thymus of the Ts(1716)65Dn mouse, a murine model for human Down's syndrome. *J Immunol* 163, 5399-410.

Peeters, M., and Poon, A. (1987). Down syndrome and leukemia: unusual clinical aspects and unexpected methotrexate sensitivity. *Eur J Pediatr* 146, 416-22.

Pellissier, M. C., Laffage, M., Philip, N., Passage, E., Mattei, M. G., and Mattei, J. F. (1988). Trisomy 21q223 and Down's phenotype correlation evidenced by in situ hybridization. *Hum Genet* 80, 277-81.

Peterson, A., Patil, N., Robbins, C., Wang, L., Cox, D. R., and Myers, R. M. (1994). A transcript map of the Down syndrome critical region on chromosome 21. *Hum Mol Genet* 3, 1735-42.

Petrecca, K., Atanasiu, R., Akhavan, A., and Shrier, A. (1999). N-linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression. *J Physiol* 515, 41-8.

- Pfeiffer, R. A., Kessel, E. K., and Soer, K. H. (1977). Partial trisomies of chromosome 21 in man. Two new observations due to translocations 19;21 and 4;21. *Clin Genet* 11, 207-13.
- Piccini, M., Vitelli, F., Seri, M., Galletta, L. J., Moran, O., Bulfone, A., Banfi, S., Pober, B., and Renieri, A. (1999). KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. *Genomics* 60, 251-7.
- Poissonnier, M., Saint-Pau, B., Dutrillaux, B., Chassaige, M., Gruyer, M., and de Bagnieres-Strouk, G. (1976). Trisomie 21 partielle (21q-q22.2). *Ann Genet*, 69-70.
- Polani, P. E., Briggs, J. H., Ford, C. E., Clarke, C. M., and Berg, J. M. (1960). A mongol child with 46 chromosomes. *Lancet* 1, 721-724.
- Pongs, O. (1999). Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett* 452, 31-5.
- Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bianchi, L., Dennis, A., De Fusco, M., Brown, A. M., and Casari, G. (1998). A recessive variant of the Romano-Ward long-QT syndrome? *Circulation* 97, 2420-5.
- Proudfoot, N. (1991). Poly(A) signals. *Cell* 64, 671-4.
- Pueschel, S., Sassaman, E., Scola, P., Thuline, H., Stark, A., and Horrobin, M. (1982). Biomedical aspects in Down Syndrome. *Down Syndrome. Advances in biomedicine and the behavioral sciences Cambridge MA Ware*, 169.
- Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., and et al. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5958-62.
- Raoul, O., Carpentier, S., Dutrillaux, B., Mallet, R., and Lejeune, J. (1976). [Partial trisomy of chromosome 21 by maternal translocation t(15;21) (q26.2; q21)]. *Ann Genet* 19, 187-90.
- Raz, N., Torres, I. J., Briggs, S. D., Spencer, W. D., Thornton, A. E., Loken, W. J., Gunning, F. M., McQuain, J. D., Driesen, N. R., and Acker, J. D. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45, 356-66.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T., and Davisson, M. T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits [see comments]. *Nat Genet* 11, 177-84.
- Reeves, R. H., Yao, J., Crowley, M. R., Buck, S., Zhang, X., Yarowsky, P., Gearhart, J. D., and Hilt, D. C. (1994). Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5359-63.
- Rehder, H. (1981). Pathology of trisomy 21--with particular reference to persistent common atrioventricular canal of the heart. *Hum Genet Suppl* 2, 57-73.
- Reimann, F., and Ashcroft, F. M. (1999). Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* 11, 503-8.
- Rethore, M. O. (1981). Structural variation of chromosome 21 and symptoms of Down's syndrome. *Hum Genet Suppl* 2, 173-82.

Romano, G., Gemme, G. and Pongiglioni R (1963). Artimie cardiach rare dell'eta pediatrica II. Accessi sincopali per fibrillazione ventricolare parossitica. *Clin Pediatr.* **45**, 656-683.

Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillemare, E., Barhanin, J., and Lazdunski, M. (1997). Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KVLQT1 channel activity. *J Biol Chem* **272**, 16713-6.

Russell, M. W., Dick, M., 2nd, Collins, F. S., and Brody, L. C. (1996). KVLQT1 mutations in three families with familial or sporadic long QT syndrome. *Hum Mol Genet* **5**, 1319-24.

Saccone, S., De Sario, A., Wiegant, J., Raap, A. K., Della Valle, G., and Bernardi, G. (1993). Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11929-33.

Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., Epstein, C. J., and Huang, T. T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6256-61.

Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Rubin, E. M., Crnic, L. S., Huang, T. T., and Epstein, C. J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* **48**, 606-13.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.

Sakata, K., Tamura, G., Nishizuka, S., Maesawa, C., Suzuki, Y., Iwaya, T., Terashima, M., Saito, K., and Satodate, R. (1997). Commonly deleted regions on the long arm of chromosome 21 in differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Genes Chromosomes Cancer* **18**, 318-21.

Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-3.

Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**, 299-307.

Satge, D., Sasco, A. J., Carlsen, N. L., Stiller, C. A., Rubie, H., Hero, B., de Bernardi, B., de Kraker, J., Coze, C., Kogner, P., Langmark, F., Hakvoort-Cammel, F. G., Beck, D., von der Weid, N., Parkes, S., Hartmann, O., Lippens, R. J., Kamps, W. A., and Sommelet, D. (1998). A lack of neuroblastoma in Down syndrome: a study from 11 European countries. *Cancer Res* **58**, 448-52.

Satge, D., Sommelet, D., Geneix, A., Nishi, M., Malet, P., and Vekemans, M. (1998). A tumor profile in Down syndrome. *Am J Med Genet* **78**, 207-16.

Satler, C. A., Vesely, M. R., Duggal, P., Ginsburg, G. S., and Beggs, A. H. (1998). Multiple different missense mutations in the pore region of HERG in patients with long QT syndrome. *Hum Genet* **102**, 265-72.

Satler, C. A., Walsh, E. P., Vesely, M. R., Plummer, M. H., Ginsburg, G. S., and Jacob, H. J. (1996). Novel missense mutation in the cyclic nucleotide-binding domain of HERG causes long QT syndrome. *Am J Med Genet* **65**, 27-35.

- Schapiro, M. B., Ball, M. J., Grady, C. L., Haxby, J. V., Kaye, J. A., and Rapoport, S. I. (1988). Dementia in Down's syndrome: cerebral glucose utilization, neuropsychological assessment, and neuropathology. *Neurology* **38**, 938-42.
- Schlessinger, D. (1990). Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes. *Trends Genet* **6**, 248, 255-8.
- Schott, J. J., Charpentier, F., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bouhour, J. B., Donnelly, P., Vergnaud, G., Bachner, L., Moisan, J. P., and et al. (1995). Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet* **57**, 1114-22.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., and Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* **275**, 24089-95.
- Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V., and Jentsch, T. J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* **396**, 687-90.
- Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., and Jentsch, T. J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-9.
- Schulze-Bahr, E., Haverkamp, W., Wedekind, H., Rubie, C., Hordt, M., Borggrefe, M., Assmann, G., Breithardt, G., and Funke, H. (1997). Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum Genet* **100**, 573-6.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J. A., Borggrefe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J. C., Breithardt, G., Oberti, C., and Funke, H. (1997). KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* **17**, 267-8.
- Schwalbe, R. A., Wang, Z., Wible, B. A., and Brown, A. M. (1995). Potassium channel structure and function as reported by a single glycosylation sequon. *J Biol Chem* **270**, 15336-40.
- Scotese, I., Gaetaniello, L., Matarese, G., Lecora, M., Racioppi, L., and Pignata, C. (1998). T cell activation deficiency associated with an aberrant pattern of protein tyrosine phosphorylation after CD3 perturbation in Down's syndrome. *Pediatr Res* **44**, 252-8.
- Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23-31.
- Sesti, F., Abbott, G. W., Wei, J., Murray, K. T., Saksena, S., Schwartz, P. J., Priori, S. G., Roden, D. M., George, A. L., Jr., and Goldstein, S. A. (2000). A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10613-8.
- Shapiro, B. L. (1983). Down syndrome--a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* **14**, 241-69.
- Shapiro, M. B., and Senapathy, P. (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* **15**, 7155-74.
- Sherman, S. L., Takaesu, N., Freeman, S. B., Grantham, M., Phillips, C., Blackston, R. D., Jacobs, P. A., Cockwell, A. E., Freeman, V., Uchida, I., and et al. (1991). Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet* **49**, 608-20.
- Shimizu, N., Antonarakis, S. E., Van Broeckhoven, C., Patterson, D., Gardiner, K., Nizetic, D., Créau, N., Delabar, J.-M., Korenberg, J., Reeves, R., Doering, J., Chakravati, A., Minoshima, S., Ritter, O.,

and Cuticchia, J. (1994). report of the Fifth International Workshop on Human Chromosome 21. *Cytogenetics and Cell Genetics* 70, 148-164.

Sinet, P. M., Couturier, J., Dutrillaux, B., Poissonnier, M., Raoul, O., Rethore, M. O., Allard, D., Lejeune, J., and Jerome, H. (1976). [Trisomy 21 and superoxide dismutase-1 (IPO-A). Tentative localization of sub-band 21Q22.1]. *Exp Cell Res* 97, 47-55.

Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., and Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18, 25-9.

Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watabe, A. M., O'Dell, T. J., Fung, J., Weier, H. U., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* 16, 28-36.

Smith, D. J., Zhu, Y., Zhang, J., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (1995). Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics* 27, 425-34.

Smith, P. L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379, 833-6.

Soeda, E., Hou, D. X., Osoegawa, K., Atsuchi, Y., Yamagata, T., Shimokawa, T., Kishida, H., Okano, S., Chumakov, I., and et al. (1995). Cosmid assembly and anchoring to human chromosome 21. *Genomics* 25, 73-84.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17.

Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Keating, M. T. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*. *Circulation* 102, 1178-85.

Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Lehmann, M. H., and Keating, M. T. (1998). Genomic structure of three long QT syndrome genes: *KVLQT1*, *HERG*, and *KCNE1*. *Genomics* 51, 86-97.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (1997). Mutations in the *hminK* gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 17, 338-40.

Stafstrom, C. E. (1993). Epilepsy in Down syndrome: clinical aspects and possible mechanisms. *Am J Ment Retard* 98, 12-26.

Stafstrom, C. E., and Konkol, R. J. (1994). Infantile spasms in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol* 36, 576-85.

Stene, E., Stene, J., and Stengel-Rutkowski, S. (1987). On methodological issues regarding 47,+21 paternal age data. *Hum Genet* 77, 317.

Stewart, E. A., McKusick, K. B., Aggarwal, A., Bajorek, E., Brady, S., Chu, A., Fang, N., Hadley, D., Harris, M., Hussain, S., Lee, R., Maratukulam, A., O'Connor, K., Perkins, S., Piercy, M., Qin, F., Reif,

- T., Sanders, C., She, X., Sun, W. L., Tabar, P., Voyticky, S., Cowles, S., Fan, J. B., Cox, D. R., and et al. (1997). An STS-based radiation hybrid map of the human genome. *Genome Res* 7, 422-33.
- Stone, N. E., Fan, J. B., Willour, V., Pennacchio, L. A., Warrington, J. A., Hu, A., de la Chapelle, A., Lehesjoki, A. E., Cox, D. R., and Myers, R. M. (1996). Construction of a 750-kb bacterial clone contig and restriction map in the region of human chromosome 21 containing the progressive myoclonus epilepsy gene. *Genome Res* 6, 218-25.
- Sumarsono, S. H., Wilson, T. J., Tymms, M. J., Venter, D. J., Corrick, C. M., Kola, R., Lahoud, M. H., Papas, T. S., Seth, A., and Kola, I. (1996). Down's syndrome-like skeletal abnormalities in *Ets2* transgenic mice. *Nature* 379, 534-7.
- Summitt, R. (1981). Chromosome specific segments that cause the phenotype of Down syndrome. Trisomy 21 /Down syndrome). Research perspectives. Baltimore, University Park Press.
- Takumi, T., Moriyoshi, K., Aramori, I., Ishii, T., Oiki, S., Okada, Y., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1991). Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel. *J Biol Chem* 266, 22192-8.
- Tanaka, T., Nagai, R., Tomoike, H., Takata, S., Yano, K., Yabuta, K., Haneda, N., Nakano, O., Shibata, A., Sawayama, T., Kasai, H., Yazaki, Y., and Nakamura, Y. (1997). Four novel KVLQT1 and four novel HERG mutations in familial long-QT syndrome. *Circulation* 95, 565-7.
- Tapper, A. R., and George, A. L., Jr. (2000). MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J Gen Physiol* 116, 379-90.
- Tassone, F., Xu, H., Burkin, H., Weissman, S., and Gardiner, K. (1995). cDNA selection from 10 Mb of chromosome 21 DNA: efficiency in transcriptional mapping and reflections of genome organization. *Hum Mol Genet* 4, 1509-18.
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K. F., and Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287-301.
- Thuline, H. C., and Pueschel, S. M. (1982). Cytogenetics in Down Syndrome. In *Advances in biomedicine and the behavioral sciences*, R. J. e. Pueschel SM, ed.: Cambridge, M.A., Ware), pp. 133.
- Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *Embo J* 19, 6326-30.
- Tinel, N., Diochot, S., Lauritzen, I., Barhanin, J., Lazdunski, M., and Borsotto, M. (2000). M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit. *FEBS Lett* 480, 137-41.
- Trowell, H. E., Nagy, A., Vissel, B., and Choo, K. H. (1993). Long-range analyses of the centromeric regions of human chromosomes 13, 14 and 21: identification of a narrow domain containing two key centromeric DNA elements. *Hum Mol Genet* 2, 1639-49.
- Tyson, J., Tranebjaerg, L., Bellman, S., Wren, C., Taylor, J. F., Bathen, J., Aslaksen, B., Sorland, S. J., Lund, O., Malcolm, S., Pembrey, M., Bhattacharya, S., and Bitner-Glindzicz, M. (1997). IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet* 6, 2179-85.
- Ugazio, A. G., Maccario, R., Notarangelo, L. D., and Burgio, G. R. (1990). Immunology of Down syndrome: a review. *Am J Med Genet Suppl* 7, 204-12.

- Unwin, N. (1993). Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72 *Suppl*, 31-41.
- Varnum, M. D., Busch, A. E., Bond, C. T., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1993). The min K channel underlies the cardiac potassium current I_{Ks} and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11528-32.
- Vetter, D. E., Mann, J. R., Wangemann, P., Liu, J., McLaughlin, K. J., Lesage, F., Marcus, D. C., Lazdunski, M., Heinemann, S. F., and Barhanin, J. (1996). Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 17, 1251-64.
- Wahrman J, G. R., Richler C, Goldman B, Ackstein E, Chaki R. (1976). The mongoloid phenotype in man is due to trisomy of the distal pale G-band of chromosome 21. In *Chromosomes today*, L. K. Pearson PL, ed. (New York: Halstead Press).
- Walby, A. P., and Schuknecht, H. F. (1984). Concomitant occurrence of cochleosaccular dysplasia and Down's syndrome. *Arch Otolaryngol* 110, 477-9.
- Wang, D., and Smith, C. L. (1994). Large-scale structure conservation along the entire long arm of human chromosome 21. *Genomics* 20, 441-51.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., and McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel [see comments]. *Science* 282, 1890-3.
- Wang, P. P., and Bellugi, U. (1994). Evidence from two genetic syndromes for a dissociation between verbal and visual-spatial short-term memory. *J Clin Exp Neuropsychol* 16, 317-22.
- Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D., and Keating, M. T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12, 17-23.
- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A., and Keating, M. T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80, 805-11.
- Ward, O. (1964). a new familial cardiac syndrome in children. *J. Ir. Med. Assoc.* 54, 103-106.
- Warmke, J. W., and Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3438-42.
- Watanabe, H., Nagata, E., Kosakai, A., Nakamura, M., Yokoyama, M., Tanaka, K., and Sasai, H. (2000). Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem* 75, 28-33.
- Webb, S., Anderson, R. H., and Brown, N. A. (1996). Endocardial cushion development and heart loop architecture in the trisomy 16 mouse. *Dev Dyn* 206, 301-9.
- Wierzba-Bobrowicz, T., Lewandowska, E., Schmidt-Sidor, B., and Gwiazda, E. (1999). The comparison of microglia maturation in CNS of normal human fetuses and fetuses with Down's syndrome. *Folia Neuropathol* 37, 227-34.
- Williams, J. D., Summitt, R. L., Martens, P. R., and Kimbrell, R. A. (1975). Familial Down syndrome due to t(10;21) translocation: evidence that the Down phenotype is related to trisomy of a specific segment of chromosome 21. *Am J Hum Genet* 27, 478-85.

- Wisniewski, K. E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am J Med Genet Suppl* 7, 274-81.
- Wolosin, J. M., and Forte, J. G. (1984). Stimulation of oxyntic cell triggers K⁺ and Cl⁻ conductances in apical H⁺-K⁺-ATPase membrane. *Am J Physiol* 246, C537-45.
- Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Ramakrishnan, P., Neubauer, M. G., and Blonar, M. A. (1998). Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem* 273, 19419-23.
- Yaspo, M. L., Gellen, L., Mott, R., Korn, B., Nizetic, D., Poustka, A. M., and Lehrach, H. (1995). Model for a transcript map of human chromosome 21: isolation of new coding sequences from exon and enriched cDNA libraries. *Hum Mol Genet* 4, 1291-304.
- Yu, J., Tong, S., Shen, Y., and Kao, F. T. (1997). Gene identification and DNA sequence analysis in the GC-poor 20 megabase region of human chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6862-7.
- Zareba, W., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., Robinson, J. L., Priori, S. G., Benhorin, J., Locati, E. H., Towbin, J. A., Keating, M. T., Lehmann, M. H., and Hall, W. J. (1998). Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *N Engl J Med* 339, 960-5.
- Zhang, Z. J., Jurkiewicz, N. K., Folander, K., Lazarides, E., Salata, J. J., and Swanson, R. (1994). K⁺ currents expressed from the guinea pig cardiac IsK protein are enhanced by activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1766-70.
- Zhou, Z., Gong, Q., Epstein, M. L., and January, C. T. (1998). HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 273, 21061-6.
- Zihni L (1994). Down's syndrome, interferon sensitivity and the development of leukaemia. *Leukaemia research* 18, 1-6.
- Zipursky, A. (2000). Susceptibility to leukemia and resistance to solid tumors in Down syndrome. *Pediatr Res* 47, 704.