

## **6.- RESULTATS**

## RESULTATS

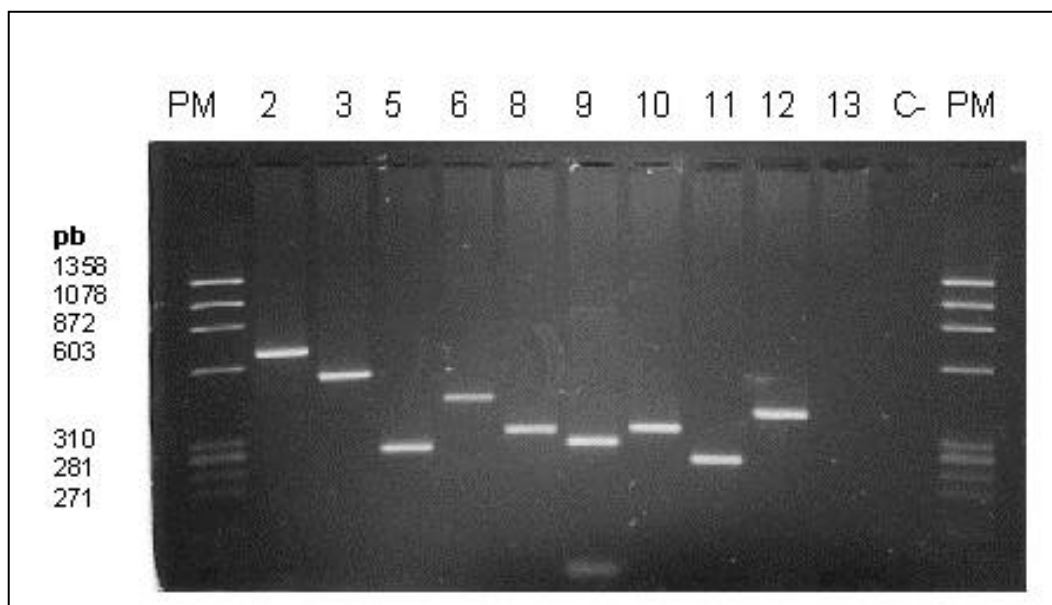
### 6.1.- PCR

Els resultats de les reaccions de PCR utilitzant el protocol de Seino i cols. (79) van ser positius, es van detectar bandes úniques de la mida esperada per a cada producte amplificat, excepte pels exons 1, 13 i 16 (**figures 14 i 15**).

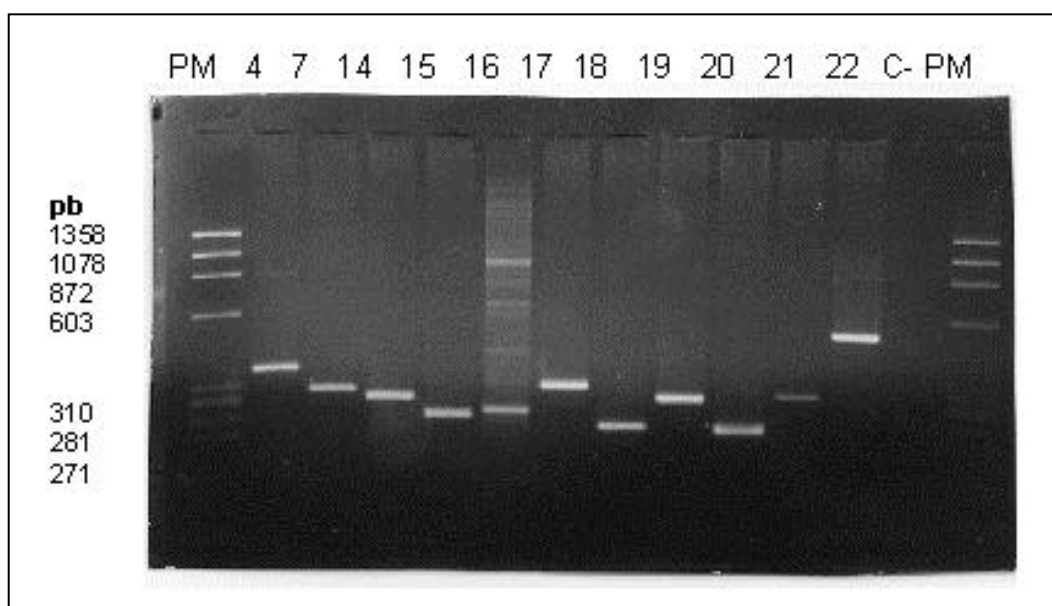
Per detectar amplifcació en l'exó 1 (molt ric en GC) es va doblar la concentració de l'enzim Taq ADN polimerasa, es va afegir un 10% de DMSO i es va modificar lleugerament el programa incrementant 2min la "Hot start", augmentant la temperatura d'extensió a 72°C i disminuint-ne el temps a 1min.ut 30 segons. Es van fer 30 cicles d'amplificació.

Per l'exó 13 va ser necessari disminuir la concentració de  $\text{CaMg}_2$  a 1mM, mentre que per l'exó 16 es va haver d'incrementar a 2mM.

Fent les modificacions pertinents es va detectar en totes les mostres una única banda amplificada de la mida esperada. Així es van descartar grans aberracions en el gen del receptor d'insulina dels individus estudiats (delecions, insercions, translocacions, etc).



**Figura 14.-** Imatge dels productes de PCR dels exons 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 i 13. El producte de l'exó 13 no dona senyal en les condicions d'amplificació estàndards. Gel d'agarosa al 2%



**Figura 15.-** Imatge dels productes de PCR dels exons 4, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 i 22. En l'exó 16 s'aprecia molta amplificació inespecífica quan s'amplifica amb les condicions estàndards. Gel d'agarosa al 2%.

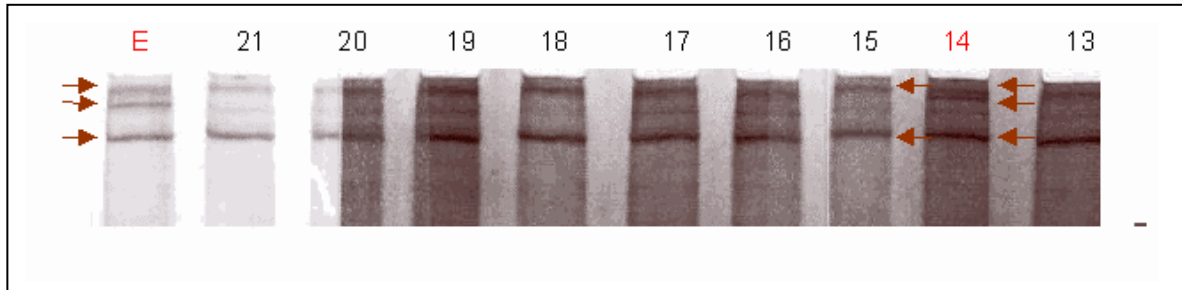
## 6.2.- SSCP

Mitjançant aquest mètode es van detectar els canvis conformacionals que s'indiquen en la **Taula 12**. En la **Figura 16 (a, b, c, d, e i f)** es poden veure imatges corresponents a aquests canvis conformacionals.

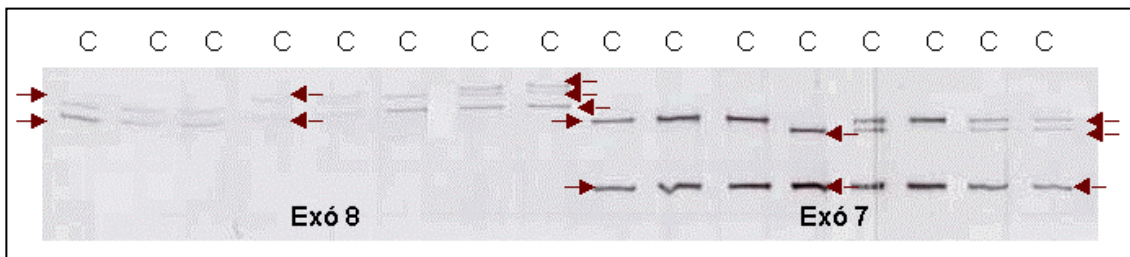
EXÓ	CANVI			
2	Lys272Aturada AAG-TAG	Val140Leu GTG-TTG		
4	Ser323Leu TCA-TTA			
6	3' +32 C-T			
7	3' +28 A-C			
8	Ala523 GCG-GCA	Asp519 GAT-GAC		
9	Phe642 TTC-TTT	5' -4 G-A	Pro617 CCA-CCC	
11	3' +90 C-G	3' +17 C-T		
17	His1058 CAC-CAT	Arg1000Aturada CGA-TGA	Val985Met GTG-ATG	Ala1028Val GCG-GTG
20	Pro1178Leu CCC-CTC			

**Taula 12.-** Canvis detectats mitjançant la tècnica de SSCP Les mostres amb modificacions en els exons 4, 6 i 20 són controls positius per canvis conformacionals donats pel Dr. S. O'Rahilly de l'Addenbrooke's Hospital (Cambridge, Anglaterra). La resta de mostres són de pacients i de controls (individus sense resistència a la insulina) estudiats en el nostre laboratori.

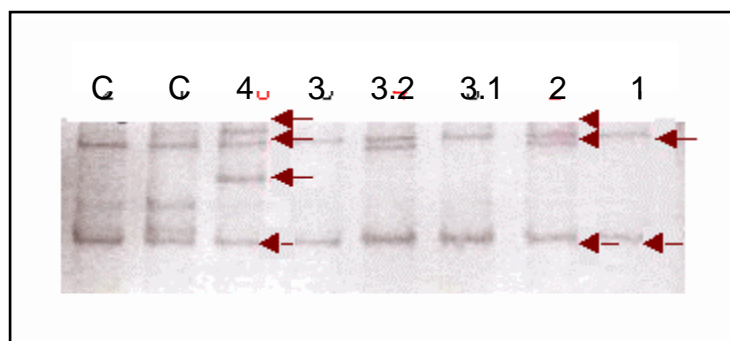
**Figura 16.-** Es poden veure gels de diferents mostres amb canvis conformationals en diferents exons. Els nombres corresponen a les mostres dels pacients. Els controls s'indiquen amb una C. Els controls positius cedits pel Prof. S. O'Rahilly s'indiquen amb una C+. Les fletxes indiquen les diferents conformacions.



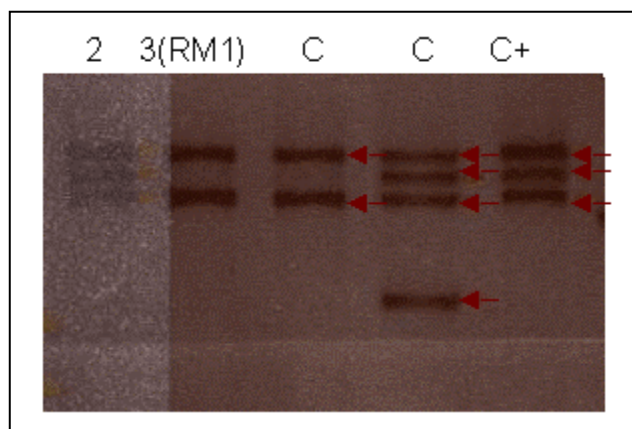
**a)** Diferents conformacions detectades en l'exó 2. La pacient A1 presenta una conformació diferent a la resta de pacients i als controls, fins i tot al C+ (E).



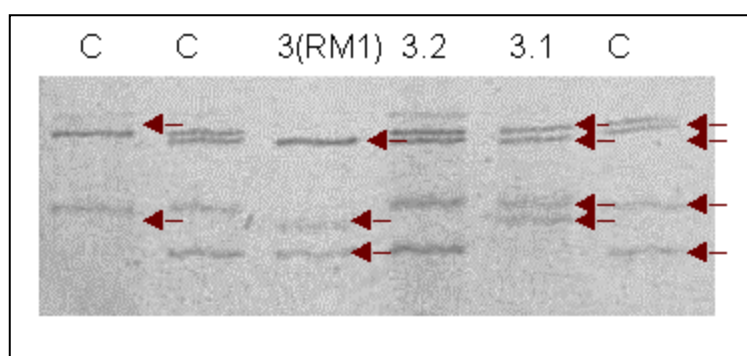
**b)** Diferents conformacions detectades en els exons 8 i 7 de diferents controls.



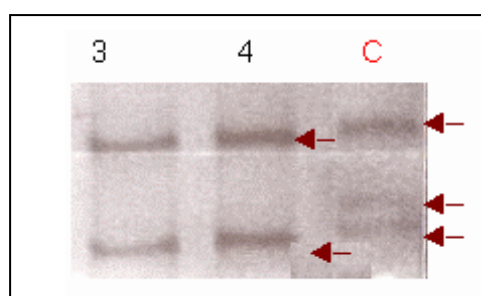
**c)** Diferents conformacions detectades en l'exó 9 de diferent controls i pacients.



**d)** Diferents conformacions detectades en l'exó 11 en diferents pacients i controls.



**e)** Diferents conformacions detectades en l'exó 17 de diferents controls i de la família amb un pacient afecte de la síndrome de Rabson-Mendenhall (RM1).



**f)** Diferents conformacions detectades en l'exó 20 de diferents pacients i un control.

Mitjançant aquesta tècnica no es van poder detectar tots els canvis conformacionals que presentaven els exons dels diferents pacients, ja que després amb la seqüenciació directa es va comprovar que hi havia més canvis que no s'havien detectat.

En els exons 4, 5, 15, 16, 18 i 20 dels pacients no es van detectar canvis mitjançant SSCP i aquesta absència de canvis es va confirmar en la seqüenciació.

No es van analitzar totes les mostres de tots els pacients mitjançant aquesta tècnica, degut a què es va comprovar que era molt més segur i ràpid emprar la seqüenciació directa de les mostres.

### **6.3.- SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA**

Totes les mostres van ser seqüenciades, tant les que presentaven una conformació diferent per SSCP, com les que no. Les mostres van ser seqüenciades inicialment en un únic sentit, si la seqüència de la mostra era la seqüència estàndard, és a dir WT (segons Seino i cols.) es considerava normal. Si la seqüència presentava algun punt dubtós candidat a ser una variació en la seqüència, aquesta se seqüenciava en el sentit contrari de manera que es podia comparar el punt problema i si coincidia el punt problema en els dos sentits, es ratificava fent una nova seqüenciació de la mostra provinent d'un producte de PCR diferent al primer. El resultat de la seqüenciació dels exons dels pacients es resumeix en la **Taula 13**.

Exó	PACIENT							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	wt	wt	3' +70 T-G	wt	wt	wt	wt	wt
2	wt	wt	<b>Asn15-Lys</b>	wt	wt	wt	wt	wt
3	wt	wt	Gln276	wt	Gln276	wt	wt	wt
4	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
5	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
6	wt	wt	3' +31 C-T / +43 T-G	wt	wt	wt	wt	3' +31 C-T
7	wt	wt	wt	wt	wt	3' +28 A-C	wt	3' +28 A-C
8	wt	wt	Asp519	<b>Asp519</b>	wt	Asp519/Ala523	wt	Asp519/Ala523
9	5' -4 G-A	5' -4 G-A / Phe642	5' -4 G-A	5' -4 G-A / Pro617	5' -4 G-A	5' -4 G-A	wt	5' -4 G-A
10	wt	wt	wt	wt	wt	wt	3' +19 C-A	wt
11	3' +90 C-G	3' +90 C-G	wt	wt	3' +90 C-G	wt	3' +90 C-G	3' +90 C-G
12	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	Glu772
13	Asn838	Asn838	wt	wt	wt	wt	wt	wt
14	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
15	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
16	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
17	wt	His1058	His1058 / Arr1005Stop	wt	wt	wt	His1058	His1058
18	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
19	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
20	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
21	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
22	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

Taula 13.- Seqüenciació dels exons del gen del receptor d'insulina dels pacients estudiats. En negra es marquen els canvis en heterozigosi. Els canvis amb homozigosi no estan marcats. Amb groc s'indiquen les mutacions trobades en els pacients. (La taula continua les dues pàgines següents).



PACIENT													
Exó	9	10	11	12	13	14	15						
1	3' +70 T-G	3' +70 T-G	3' +70 T-G	wt	wt	wt	wt						
2	wt	<b>Val140-Leu</b>	wt	wt	wt	wt	wt						
3	+1TC,-1TTTA, Asp234,Gln276, 3' +52	<b>3' +65 T-A</b>	3' +65 T-A	Gln276	Gln276	<b>Gln276</b>	Gln276						
4	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
5	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
6	wt	3' +43 T-G	3' +43 T-G	wt	3' +39 C-T/+43 T-G	3' +31/+43	wt						
7	wt	3' +28 A-C	3' +28 A-C	wt	wt	wt	wt						
8	<b>Ile534</b>	Asp519/Ala523	Asp519/Ala523	<b>Ala523</b>	Asp519	<b>Asp519</b>	<b>Asp519</b>						
9	Leu613/Pro617	5' -4G -4A-20G-A	5' -4G -4A-20G-A	wt	wt	<b>Phe642</b>	<b>Phe642</b>						
10	wt	<b>3' +19 C-A</b>	<b>3' +19 C-A</b>	wt	wt	wt	<b>Gln671</b>						
11	wt	<b>3' +90 C-G</b>	<b>3' +90 C-G</b>	wt	<b>3' +90 C-G</b>	wt	wt						
12	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
13	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
14	wt	wt	wt	Glu868	wt	wt	wt						
15	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
16	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
17	wt	His1058	<b>His1058</b>	<b>His1058</b>	<b>Ala1028 -Val</b>	His1058	<b>Glu988</b>						
18	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
19	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
20	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
21	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt						
22	wt	<b>Splice acceptor AG-AA</b>	<b>Splice acceptor AG-AA</b>	wt	wt	wt	wt						

PACIENT					
Exó	16	17	18	19	20
1	wt	wt	wt	wt	wt
2	<b>His187</b>	<b>Leu70</b>	wt	wt	wt
3	Gln276	wt	wt	<b>Asp234</b>	
4	wt	wt	wt	wt	wt
5	wt	wt	wt	wt	wt
6	<b>3' +39 C-T/+43 T-G</b>	wt	<b>5' -22 G-C</b>	<b>3' +31 C-T/+43 T-G</b>	<b>3' +31 C-T/+43 T-G</b>
7	<b>3' +28 A-C/-45 T-A</b>	wt	wt	wt	wt
8	<b>Asp519/ Ala523</b>	<b>Asp519/Ala523</b>	<b>Asp519</b>	<b>Asp519</b>	<b>Asp519</b>
9	wt	wt	wt	wt	wt
10	wt	wt	wt	wt	wt
11	<b>3' +90 C-G</b>	wt	wt	wt	wt
12	wt	wt	<b>Ser758</b>	wt	wt
13	wt	wt	<b>Asn838</b>	wt	wt
14	wt	wt	wt	wt	wt
15	wt	wt	wt	wt	wt
16	wt	wt	wt	wt	wt
17	wt	wt	wt	<b>His1058</b>	wt
18	wt	wt	wt	wt	wt
19	wt	wt	wt	<b>3' +25 A-G</b>	wt
20	wt	wt	wt	wt	wt
21	<b>3' +43 A-C/-85 T-A</b>	wt	wt	wt	wt
22	wt	wt	wt	wt	wt

Es van detectar diferents polimorfismes (canvis) en seqüències intròniques i diferents polimorfismes prèviament descrits com Gly-20 (GGA-GGG), Asp234 (GAC-GAT), Gln276 (CAA-CAG), Asp519 (GAT-GAC), Ala523 (GCG-GCA), Leu613 (CTG-TTG), Pro617 (CCA-CCC), Phe642 (TTC-TTT), Asn838 (AAC-AAT), i His1058 (CAC-CAT), també es van detectar una sèrie de variants que segons el nostre coneixement no han estat descrites fins al moment; Leu70 (CTC-CTT), His187 (CAC-CAT), Ile534 (ATT-ATC), Gln671 (CAG-CAA), Ser758 (TCG-TCC), Glu772 (GAG-GAA), Glu868 (GAG-GAA) i Glu988 (GAG-GAA).

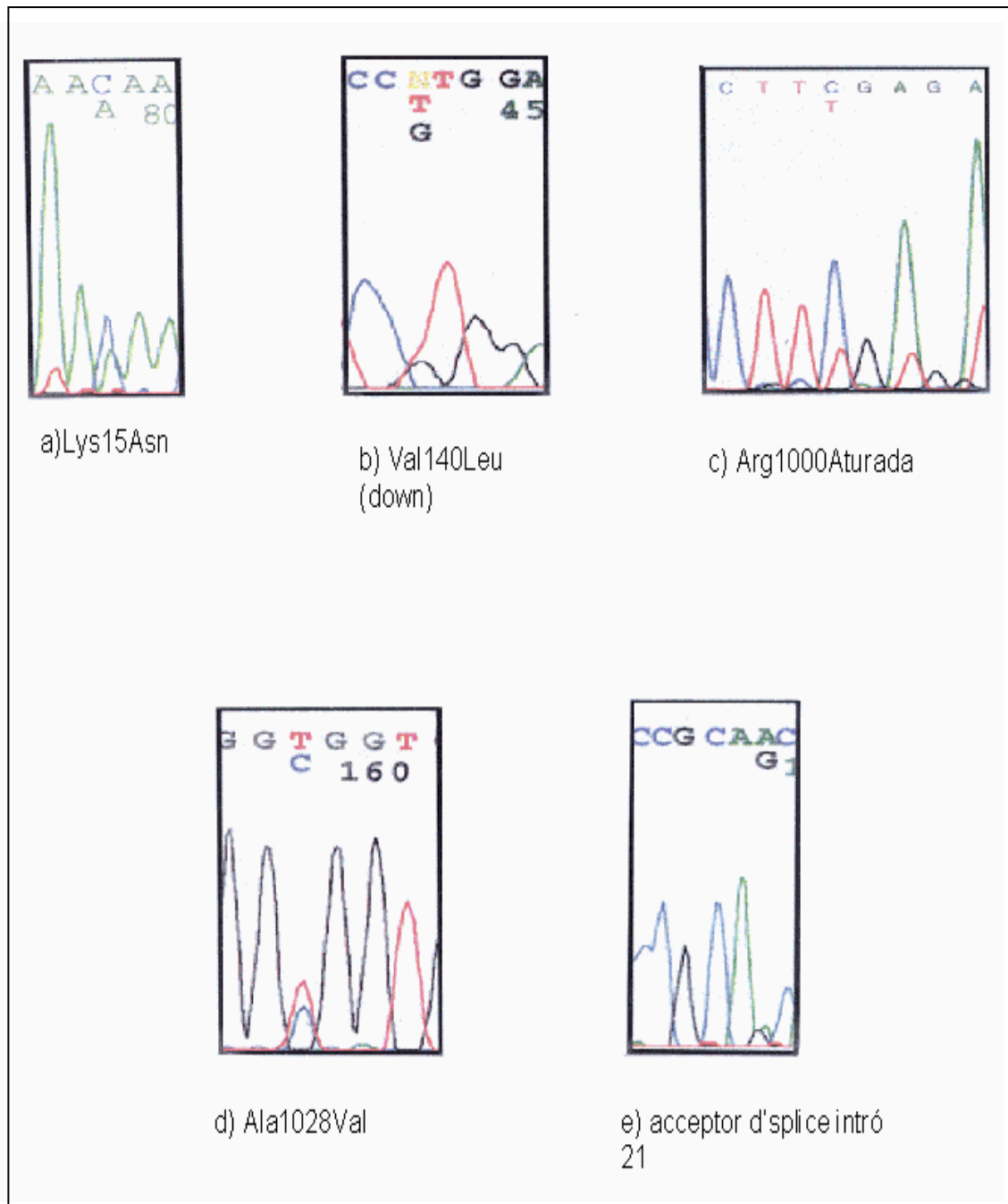
Es van detectar tres mutacions de canvi de sentit; Asn15Lys (AAC-AAA), Val140Leu (GTG-TTG) i Ala1028Val (GCG-GTG). Una mutació d'aturada prematura Arg1000Aturada (CGA-TGA) i una mutació en la seqüència consens acceptora d'splicing en l'intró 21 (AG AA) (**figura 17**).

D'aquestes mutacions la Val140Leu, la Ala1028Val i la mutació d'splicing en l'intró 21 AG AA, han estat descrites per primer cop en aquest treball (article 1).

Les mutacions Asn15Lys i Arg1000Aturada detectades en el pacient amb la síndrome de Rabson Mendenhall (pacient RM1 o pacient número 5) ja havien estat descrites en un cosí germà seu afecte de la mateixa síndrome (83).

En el cas dels pares que havien perdut un fill recent nascut degut a problemes de regulació de la glucosa, i que es van estudiar per descartar un possible síndrome de Leprechaunisme, es van diagnosticar com a normals ja que no se'ls va detectar cap mutació en el gen del receptor d'insulina.

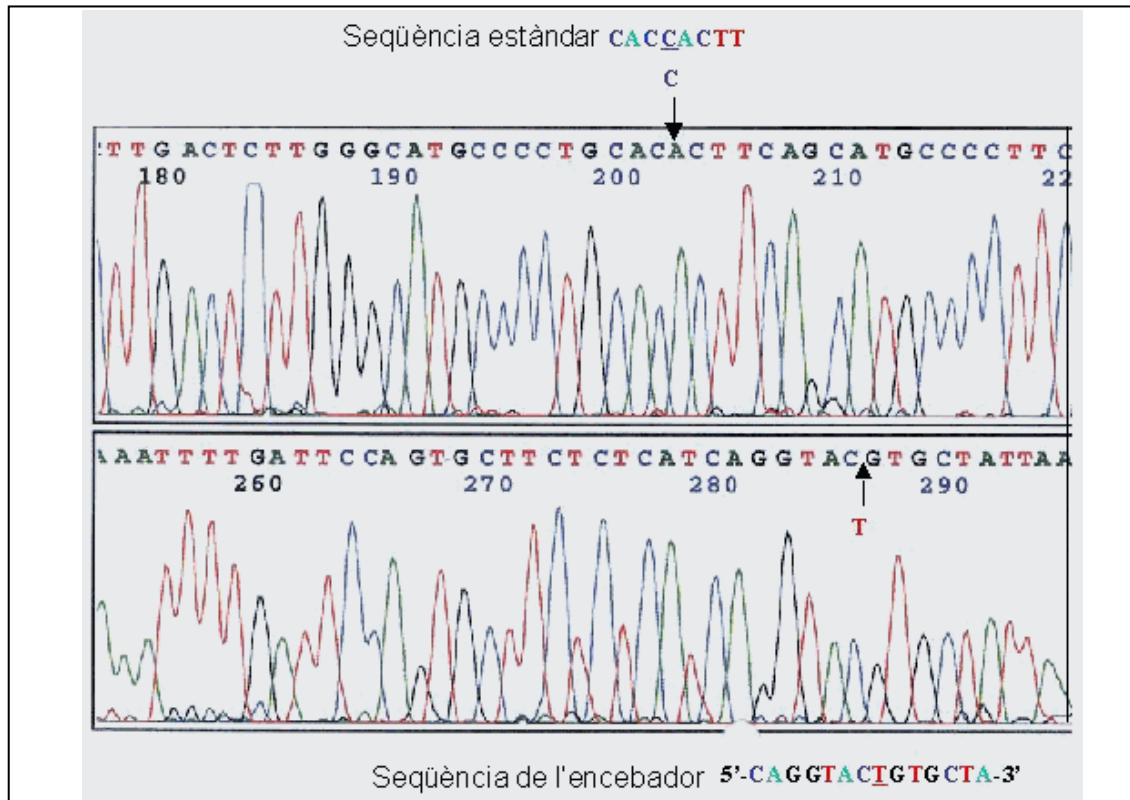
En un individu control es va detectar la variant Val985Met (GTG-ATG). Aquesta variant ha estat una mica controvertida i es comentarà en l'apartat dels estudis funcionals.



**Figura 17.-** Imatges de les seqüències mutades del gen del receptor d'insulina en els pacients estudiats. a) Lys15Asp, b) Val140Leu (seqüència down o antisentit), c) Arg1000Aturada, d) Ala1028Val, e) acceptor d'splice intró 21. Totes les mutacions estan en heterozigosi

La seqüències obtingudes estan contrastades segons la seqüència publicada per Seino (79) (**figura 9**) el qual segueix la numeració descrita per Ebina *et al* (11). Nosaltres hem detectat algun canvi en aquesta seqüència estàndard. Segons Seino en l'exó 1 el codó -20 està representat per una Gly amb la seqüència GGA, tots els nostres pacients presenten en aquesta posició una Gly amb la seqüència GGG (homozigota). Aquest codó també està compost per tres G segons Ullrich (10), Ebina (11) i Whittaker (84) entre d'altres autors. Per tant per nosaltres més que un polimorfisme, aquesta seqüència GGG és la que considerem com l'estàndard.

Una altra variació que hem detectat és en l'intró 12 (entre l'exó 13 i el 14). En el producte de les nostres mostres hi falten dues bases: la +34 (C) i la +120 (T). La T +120 forma part de la seqüència de l'encebador antisentit per amplificar el producte en qüestió (5'-CAGGTACTGTGCTA-3') (**figura 18**).



**Figura 18.-** Seqüència de l'exó 13 on falten dues bases en la regió intrònica 3', una de les quals pertany a la regió on s'uneix l'encebador per amplificar aquesta regió.

La seqüència de l'encebador sintetitzat amb el qual s'ha treballat es va revisar per tal d'assegurar que fos la correcta i que la deleció no fos un artefacte degut a una mala síntesi de l'encebador. La seqüència motlle amb la què es contrasta la nostra seqüència també va ser revisada, tant en la referència bibliogràfica (79), com en una seqüència introduïda per Seino al NCBI a internet. Totes les seqüències presenten aquesta T (tant en l'encebador com en l'estàndard). No és clar el perquè d'aquesta doble deleció en l'intró, de tota manera al ser seqüència intrònica no afecta de cap manera a la seqüència del proper exó. El fet que pugui ser un error de l'enzim Taq

està descartat ja que aquesta anomalia la presenten totes les mostres seqüenciades. No hem trobat cap referència en la es descriu aquesta situació, pot ser que, pel fet que no transcendeixi a nivell de seqüència codificant s'hagi ignorat.

## 6.4.- MUTACIÓ LEU140

Aquesta mutació ha estat detectada en heterozigosi en una pacient afecta de resistència Tipus A a la insulina (A1). Per tal de descriure l'efecte de dita mutació en la síntesi i funcionament del receptor, s'han efectuat els següents estudis.

### 6.4.1.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Per mutar, l'ADNc del receptor d'insulina inserit en el vector pRc.CMV, amb la mutació Leu140, es va utilitzar el GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega), emprant el protocol estàndard dissenyat pels fabricants.

Es van aïllar 48 de les colònies obtingudes en les plaques de cultiu després de la transformació i es van cultivar individualment en una microplaca de 96 pous. Aquests microcultius es van emprar directament per fer una amplificació per PCR del fragment delimitat pels encebadors #5 i #6 (veure **Taula 8**) en una microplaca de 96 pous. Es va obtenir producte d'amplificació de 21 de les colònies.

Ja que la mutació Leu140 crea un lloc de restricció Sty I es va aprofitar per fer el cribatge de les colònies mutades.

Seqüència estàndard	T CCGTGG AG
Seqüència Leu140 :	T CCTTGG AG
Seqüència Sty I	C/CWWGG (W = A o T)

Aquestes reaccions no van donar bon resultat ja que només es van obtenir digestions parcials que no eren informatives.

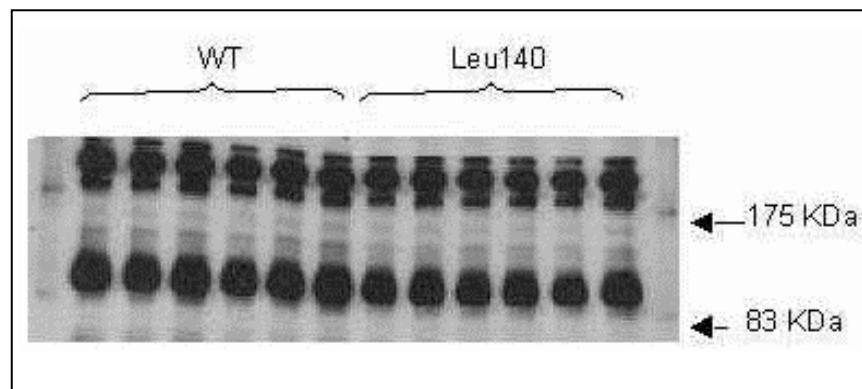
Es va optar per seqüenciar directament. El resultat de seqüenciar 24 colònies, emprant directament l'ADN obtingut de les colònies via minipreps, va ser 3 colònies portadores de la mutació Leu140 i 2 colònies WT, la resta van ser il·legibles.

No es va poder establir la taxa de mutagènesi d'aquest mètode degut a la baixa recuperació de seqüències llegibles. A nivell pràctic, però, l'obtenció d'una única colònia mutada és suficient, ja que la clonació (cultiu) i immortalització (stock de glicerol) d'aquesta pot proporcionar el material (ADN de l'insert) necessari per fer els estudis que siguin oportuns.

#### 6.4.2.- EXPRESSIÓ TOTAL EN EL LLISAT CEL·LULAR

L'estudi de l'expressió del receptor RI.Leu140 mitjançant western blot, i emprant els anticossos antireceptor d'insulina específics (Carl 10 com a primer anticòs, i un anticòs anti IgG de conill marcat amb HRP com a segon) va revelar que aquest receptor s'expressa en les cèl·lules CHO transfectades.

Comparant el resultat amb el de les cèl·lules transfectades amb el receptor WT, es pot comprovar que el receptor mutat s'expressa aproximadament un 20% menys que el WT (**figura 19**). Aquest percentatge és estadísticament significatiu amb una  $p=0,001$ .

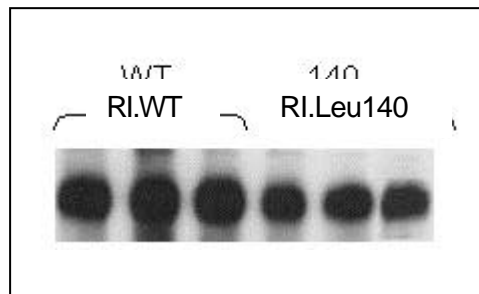


**Figura 19.-** Western blot de l'expressió del receptor RI.Leu140. A uns 200 kDa trobem el proreceptor d'insulina, el pes molecular de la subunitat del receptor d'insulina és de 95 kDa.

El resultat és expressat com la mitja de tres experiments diferents on cada dada s'obté per sextuplicat.

### 6.4.3.- BIOTINITZACIÓ

Aquesta dada ens dóna la informació de l'expressió del receptor en la membrana plasmàtica i és molt concordant amb la dada de l'expressió total en el llisat cel·lular. El receptor RI.Leu140 s'expressa aproximadament un 24% menys que el receptor WT (**figura 20**). Aquest percentatge és estadísticament significatiu amb una  $p=0,001$ . El resultat és la mitja de tres experiments on cada dada s'obté per triplicat.



**Figura 20.-** Western blot de la biotinització del receptor RI.Leu140.

Aquest resultat indica que pràcticament tot el receptor RI.Leu140 que s'expressa, és translocat a la membrana plasmàtica, per tant es poden descartar problemes de transport del receptor cap a la superfície cel·lular.

### 6.4.4.- UNIÓ DE LA INSULINA AL RECEPTOR

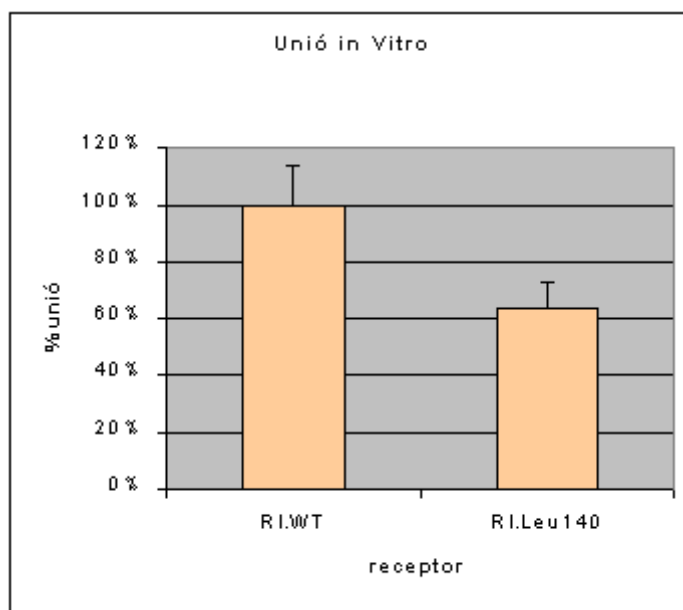
La unió de la insulina al receptor es va estudiar mitjançant reaccions de competència pel receptor entre insulina marcada radioactivament ( $^{125}\text{I}$ -insulina) i insulina freda. Es va estudiar tant la unió de la insulina en el total del llisat cel·lular (*in vitro*) com la unió de la insulina en cèl·lules en suspensió senceres (*in situ*).



#### 6.4.4.1.- 'IN VITRO'

L'estudi de la unió *in vitro* va revelar que la unió de la insulina al receptor RI.Leu140 és menor que la unió de la insulina amb el receptor WT. En percentatge el receptor mutat uneix aproximadament un 50% menys que el WT. Si estandarditzem aquest resultat en funció de l'expressió del receptor (recordem que s'expressa un 80% respecte al WT), el receptor RI.Leu140 uneix un 30% menys insulina (**figura 21**).

Aquesta dada també és estadísticament significativa amb una  $p=0,001$ .



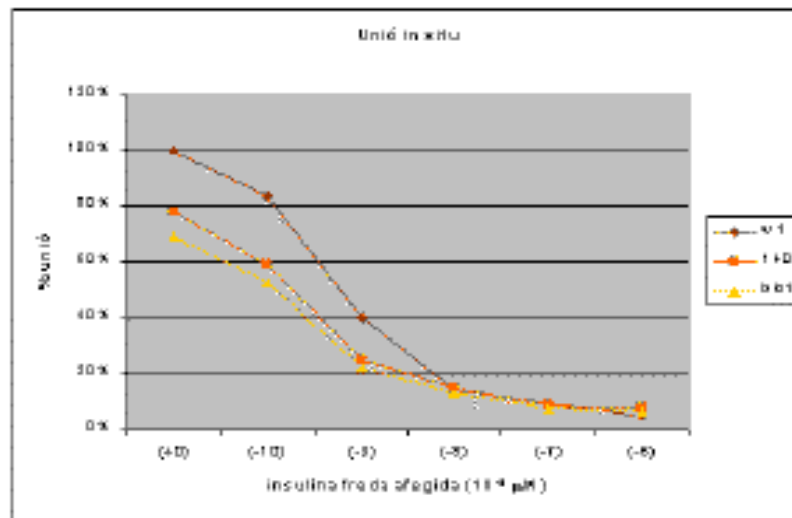
**Figura 21.-** Representació de la unió de la insulina *in vitro* pels receptors WT i RI.Leu140. La diferència és significativa.

#### 6.4.4.2.- 'IN SITU'

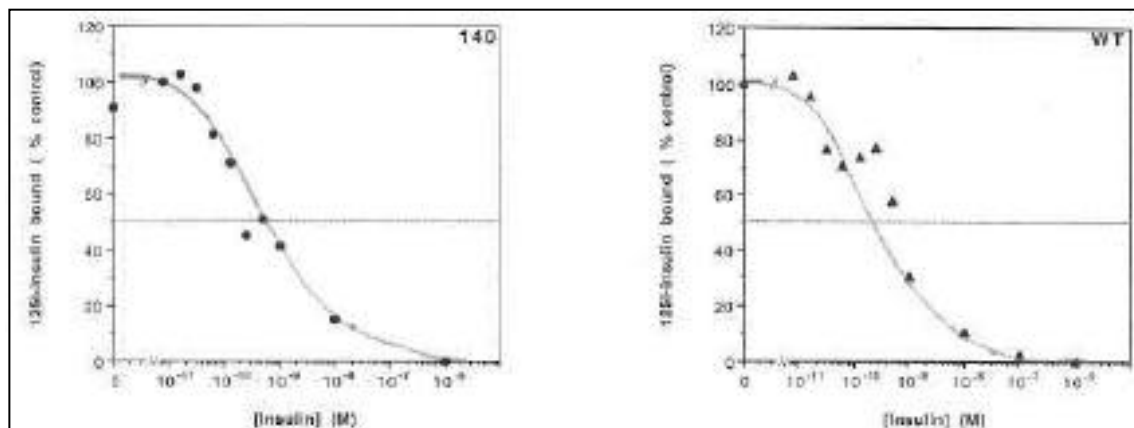
La unió de la insulina, en les cèl·lules en suspensió, pel receptor mutat RI.Leu140, és concordant amb la unió de la insulina *in vitro*. Aquest receptor uneix la insulina aproximadament un 60% respecte al WT. Si aquesta dada l'estandarditzem segons l'expressió en el llisat cel·lular o segons l'expressió del receptor mutat a membrana, tenim que la unió és d'aproximadament un 25% menys que en el WT. Aquesta diferència és significativament diferent respecte al receptor WT, amb una  $p=0,001$  (**figura 22**).

La corba d'Scatchard (anàlisi d'unió en suspensió cel·lular per determinar la concentració d'insulina marcada que es necessita per desplaçar el 50% de la insulina

no marcada) per determinar l'afinitat d'unió del receptor, i es va detectar que el receptor mutat uneix la insulina amb una afinitat més baixa que el WT. Mentre que els receptors WT tenen una afinitat de 0.3nM, els receptors mutats tenen una afinitat de 0.5nM. És a dir que els receptors mutats necessiten una concentració més gran d'insulina marcada per tal de desplaçar la mateixa quantitat que en els receptors WT (**figura 23**).



**Figura 22.-** Unió de la insulina *in situ*. Representació dels valors estandarditzats segons l'expressió total del receptor en el llista cel·lular (140), i segons l'expressió del receptor en la superfície cel·lular (biot). Els resultats es comparen amb el receptor RI.WT (wt).



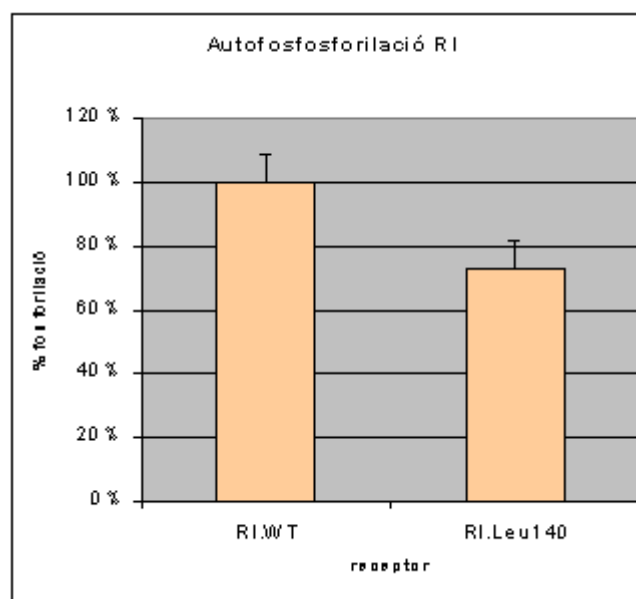
**Figura 23.-** Corbes d'Scatchard dels receptors RI.WT i RI.Leu140. Es detecta una menor afinitat per la unió de la insulina dels receptors mutats enfront dels receptors RI.WT (0,5nM vs. 0,3nM)

#### 6.4.5.- AUTOFOSFORILACIÓ

L'autofosforilació es va analitzar mitjançant western blot i emprant anticossos específics per detectar-la (un anticòs antifosfotirosina com a primer anticòs i una anticòs anti IgG de ratolí marcat amb HRP com a segon anticòs).

El resultat va revelar que el receptor RI.Leu140 és fosforilat, encara que entre un 25-30% menys que el receptor RI.WT, si estandarditzem les dades en funció de l'expressió. També es va detectar fosforilació en la banda del proreceptor, en la mateixa proporció que entre els receptors, tant en el proreceptor mutat com en el WT (**figura 24**). Aquesta dada és estadísticament significativa amb una  $p=0,001$ .

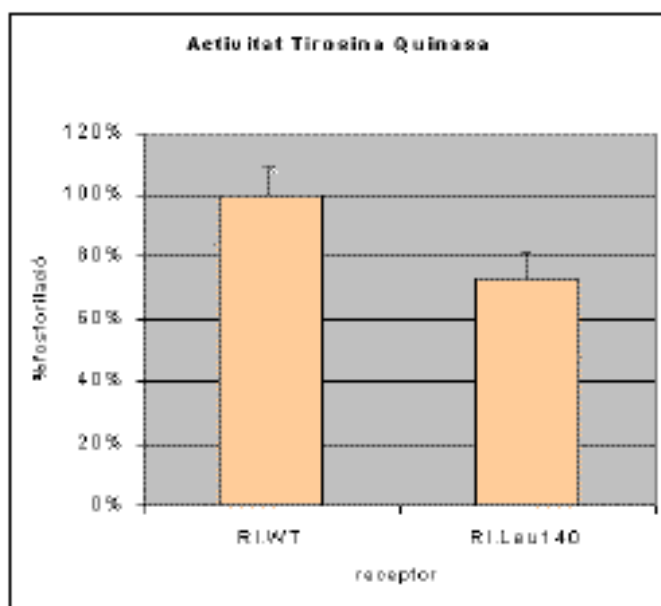
Aquesta disminució de l'autofosforilació pot ser deguda a la disminució de la pròpia expressió del receptor mutat i també en la disminució de l'afinitat amb què aquest receptor uneix la insulina.



**Figura 24.-** Representació de l'autofosforilació dels receptors RI.WT i RI.Leu140. La diferència entre els receptors és significativa.  $P=0,001$ .

#### 6.4.6.- ACTIVITAT TIROSINA QUINASA

L'estudi de la capacitat de l'activitat enzimàtica tirosina quinasa del receptor per fosforilar substrats exògens, va donar com a resultat una disminució de l'activitat en el receptor mutat d'un 35% aproximadament. Aquesta dada és força concordant amb l'autofosforilació i és també significativament diferent respecte al resultat dels receptors RI.WT,  $p=0,001$ . L'experiment es va fer per duplicat i cada dada de cada experiment es va obtenir per triplicat (**figura 25**).



**Figura 25.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa dels receptors RI.WT i RI.Leu140. La diferència observada és estadísticament significativa.  $P=0,001$ .

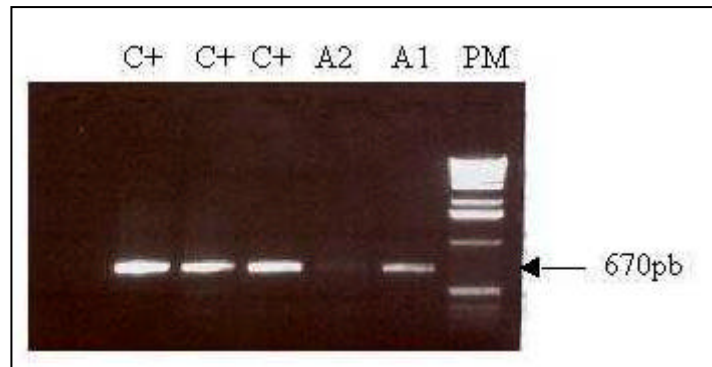
#### 6.5.- MUTACIÓ ACCEPTOR D'SPLICING-1239ATURADA

Aquesta mutació ha estat descrita pel nostre grup en dues pacients germanes (A1 i A2) afectes de la síndrome de resistència a la insulina Tipus A. Per tal de conèixer l'estructura i funcionalitat d'aquest receptor mutat s'han efectuat els següents estudis.

##### 6.5.1.- OBTENCIÓ DE L'ARNm MITJANÇANT RT-PCR

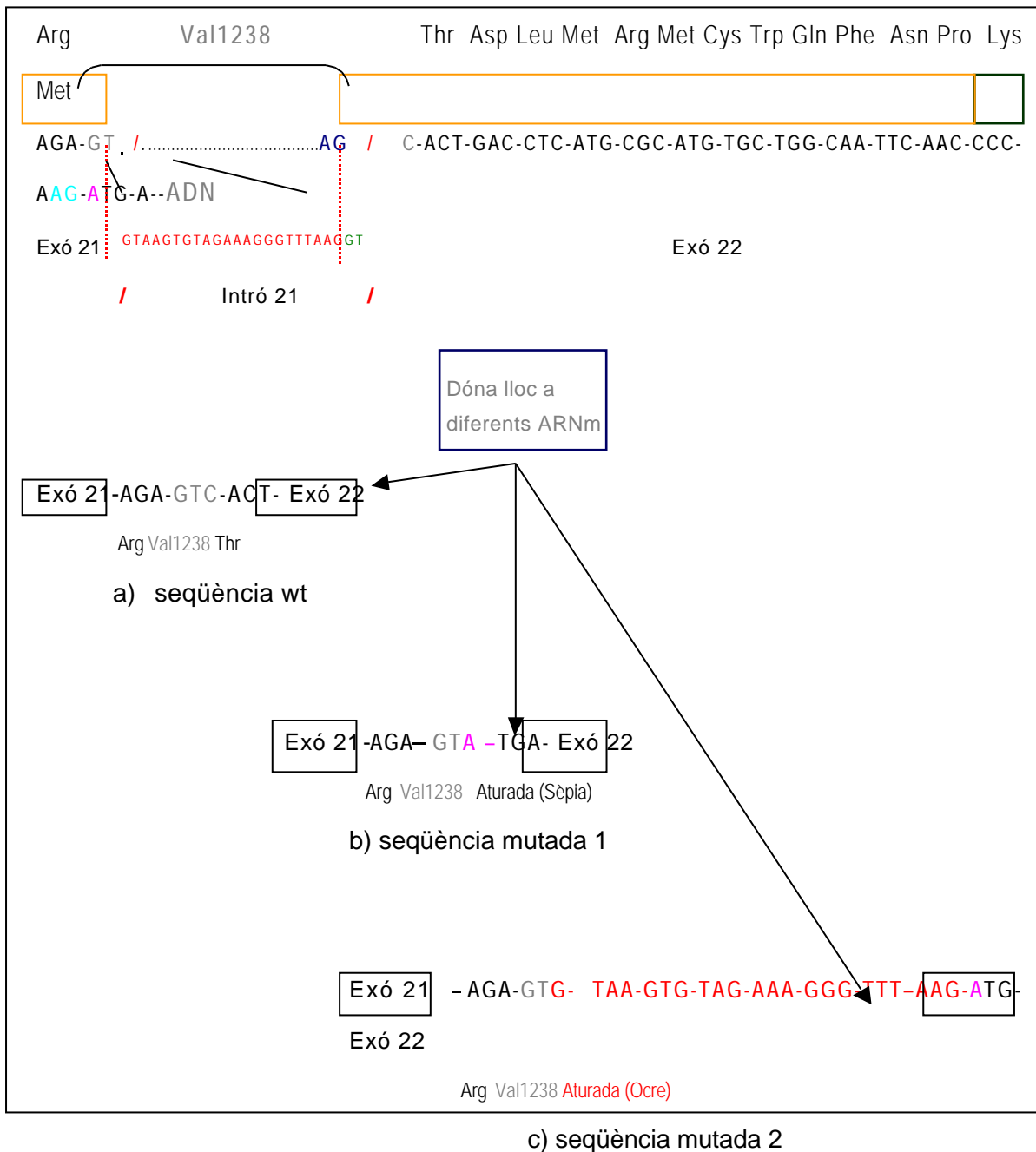
Per estudiar aquesta mutació es va fer necessari conèixer quina repercussió tenia en el processament o splicing de l'ARNm. Així doncs mitjançant la tècnica de la RT-PCR es va obtenir l'ARNm de fibroblasts de les pacients i de controls. Amplificar l'ARNm de les pacients va resultar molt difícil i quan finalment es va detectar en el gel d'agarosa, la recuperació era molt menor que la dels controls. Tot i que no es va emprar un sistema quantitatiu, es partia de les mateixes concentracions d'ARN en totes les mostres, i

aquest resultat ens vindria a indicar que l'expressió de l'ARNm del receptor mutat és significativament menor que la dels controls (**figura 26**).



**Figura 26.-** Electroforesi en gel d'agarosa de l'extracció de l'ARNm de les pacients A1 i A2 i de diferents controls.

Gràcies a la clonació dels productes de la RT-PCR mitjançant el Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) es van poder obtenir els ADNc i es van poder seqüenciar. Es va comprovar que aquesta mutació dóna com a resultat dos tipus d'ARNm diferents; en un s'activa un lloc d'splicing críptic 14 aminoàcids endins de l'exó 22, crea un corriment de la pauta de lectura i provoca una aturada prematura en el codó 1239, just després de l'exó 21. En l'altre trobem que hi ha afectats dos llocs d'splicing, un en l'extrem 5' de l'intró 21 (queden retingudes 19 pb de la seqüència intrònica dins de l'exó 21) i l'altre en l'extrem 3' de l'intró 21 (es dóna la mateixa situació que en el primer tipus d'ARNm). Per tant tot i donar-se dues situacions d'splicing diferents el producte que se n'obté és el mateix; al receptor li manquen els 117 aminoàcids de l'extrem C-terminal de la subunitat (**figura 27**).

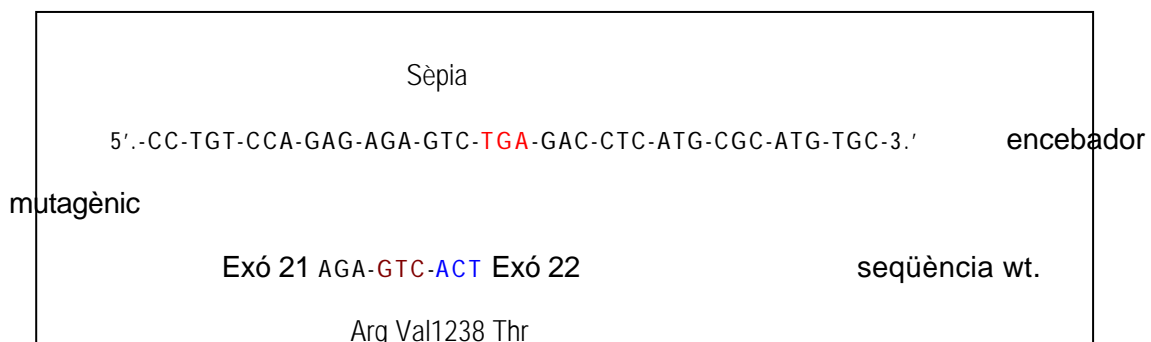


**Figura 27.-** La seqüència en vermell correspon a seqüència de l'intró 21, **GT**= donador d'splicing wt, **GT**= donador d'splicing críptic, **AG**= acceptor d'splicing wt, **AG**= acceptor d'splicing críptic, **A**= primera base de l'exó 22 que es detecta en les seqüències mutades, **GT** i **C**= bases que formen l'aminoàcid Val1028 en la seqüència WT. a) seqüència WT. b) Seqüència mutada 1; s'aboleix el lloc acceptor d'splicing WT (**AG**) i s'activa el lloc críptic **AG**, de manera que la primera base l'exó 22 que es troba en la seqüència de és la **A**. c) Seqüència mutada 2; s'aboleixen els llocs donador WT (**GT**) i acceptor WT (**AG**) d'splicing i s'activen els llocs donador **GT** i acceptor **AG** críptics, de manera que la primera base de l'exó 22 que es troba en la seqüència és la **A**.

### 6.5.2.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Per tal d'obtenir els mutants es va emprar el sistema Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) i es va forçar l'enzim *Pfu Turbo* DNA polymerase a treballar amb una construcció gran (pRc.CMV.RI.ADNC de 10,5 Kb) (el manual del kit aconsella no treballar amb inserts més grans de 8Kb), i a més es va haver d'afegir DMSO a la reacció per tal d'obtenir els mutants.

Es va introduir el codó d'aturada Sèpia (TGA) per ser el que té més complementarietat amb la seqüència WT (**figura 28**).



**Figura 28.-** En vermell es marca el codó sèpia en l'encebador mutagènic, en blau es marca el codó en la seqüència WT que ha de ser mutat. Cal destacar la complementarietat entre les bases dels dos codons (T/A, G/C i A/T).

Només es van obtenir 5 colònies de les quals 2 eren WT, 2 portaven la mutació introduïda (aturada prematura Sèpia (TGA) en el codó 1239) i 1 portava una nova mutació, introduïda a l'atzar degut probablement a un error de la polimerasa, consistent en la deleció del primer nucleòtid del codó 1238 (Val **GTC**) a més de portar la mutació introduïda expressament. Aquesta deleció provoca un corriment en la pauta de lectura, abolint l'efecte de la mutació introduïda (codó d'aturada prematura Sèpia), incorporant 14 aminoàcids aleatoris després del codó 1237 i introduint una aturada prematura Sèpia en el que seria el codó 1252.

Aquesta colònia doble mutada no es va emprar per fer l'estudi funcional del receptor ja que no presenta la seqüència que es vol estudiar (**figura 29**).

<b>Codó</b>	1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252
WT	CCA GAG AGA GTC ACT GAC CTC ATG CGC ATG TGC TGG CAA TTC AAC CCC AAC ATG A
SÈPIA	CCA GAG AGA GTC TGA GAC CTC ATG CGC ATG TGC TGG CAA TTC AAC CCC AAC ATG A
DOBLE MUTANT	GAG AGA // TCT GAG ACC TCA TGA GCA TGT GCT GGC AAT TCA ACC CCA ACA TGA

**Figura 29.-** El vermell indica el codó sèpia introduït, el rosa indica el nucleòtid que pateix la deleció (en el codó 1238) i el verd és la seqüència resultant del corriment del marc de lectura degut a la deleció.

Tot i que la polimerasa *Pfu Turbo* DNA polymerase és un dels enzims que treballa amb una fiabilitat més alta, aquesta nova mutació introduïda aleatòriament ens indica que aquest enzim no és infal·lible, i que per tant encara que la possibilitat de que s'hagi introduït un error és molt baixa és convenient revisar la seqüència d'interès abans de treballar-hi.

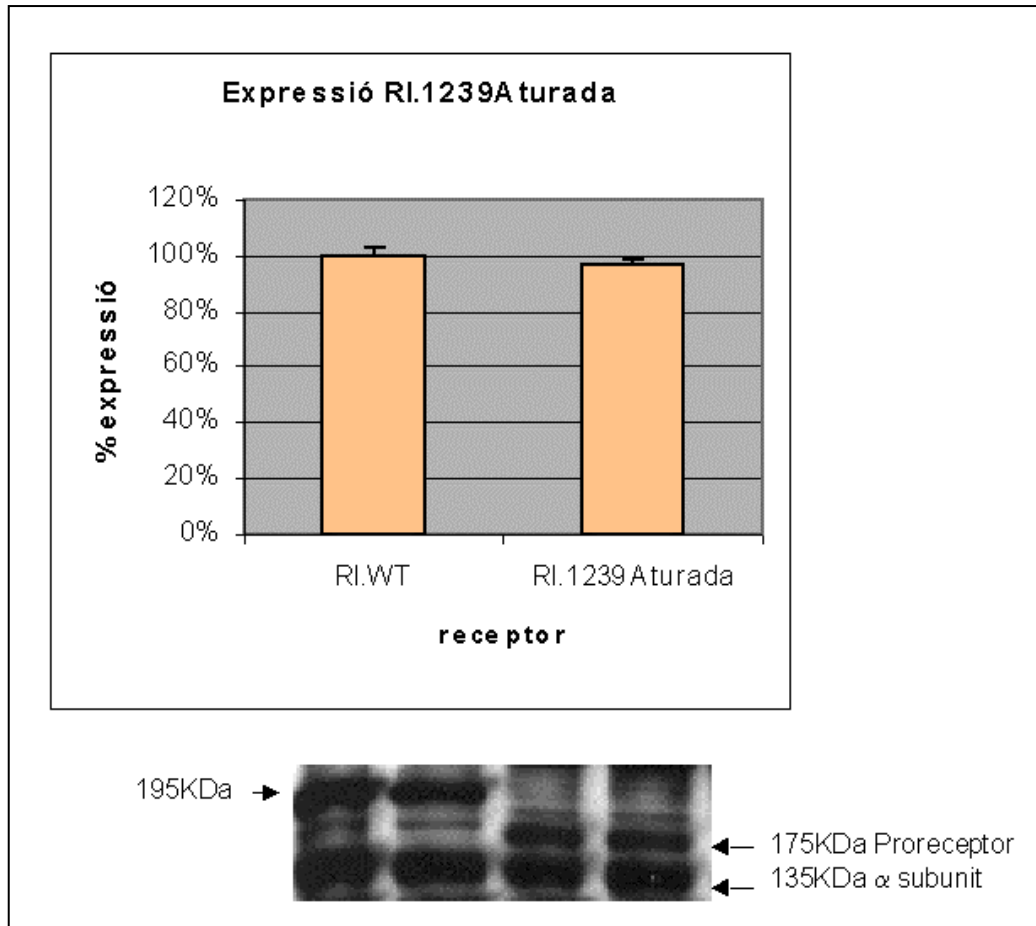
No s'ha pogut establir la taxa de mutagènesi ja que s'ha treballat amb unes condicions límits pel sistema.

De les colònies mutades únicament amb el codó Sèpia se'n va fer un stock de glicerol, i els ADNs mutats es van emprar per transfectar les cèl·lules CHO i fer els estudis funcionals.

### 6.5.3.- EXPRESSIÓ

L'expressió del receptor estudiada mitjançant western i emprant els anticossos específics (anticòs de conill anti-subunitat del receptor d'insulina humà com a primer anticòs i anticòs anti-conill IgG marcat amb HRP com a segon anticòs), va indicar que aquest receptor s'expressa gairebé igual que els receptors WT. Les subunitats que es detecten tenen la mida correcta (135KDa) indicant que no hi ha problemes amb aquesta subunitat. Es detecta el proreceptor mutat amb un pes d'uns 15KDa menys que el proreceptor WT. Aquest és el pes que té el fragment que li manca al receptor (**figura 30**).





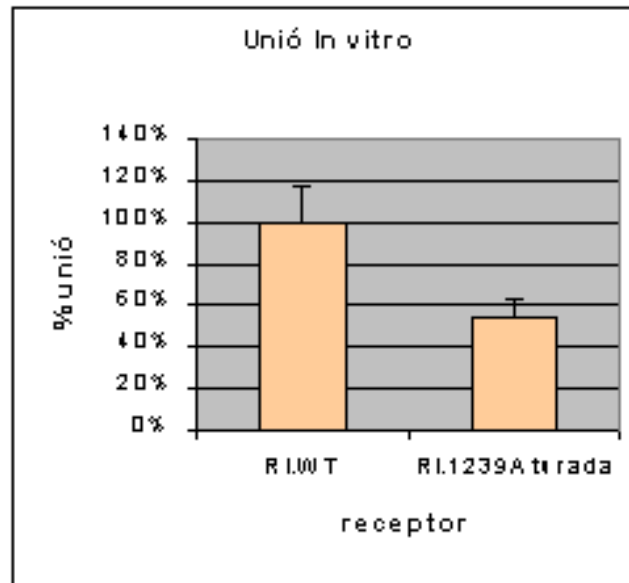
**Figura 30.-** Representació de l'expressió en el llisat cel·lular dels receptors RI.1239A turada i RI.WT. A 195kDa es detecta la banda del proreceptor WT, a 175kDa es detecta la banda del proreceptor mutat, la subunitat dels receptors es detecta a 135kDa.

#### 6.5.4.- UNIÓ DE LA INSULINA AL RECEPTOR

El resultat dels assajos d'unió tant *in vivo* com *in situ* van ser els següents:

##### 6.5.4.1.- 'IN VITRO'

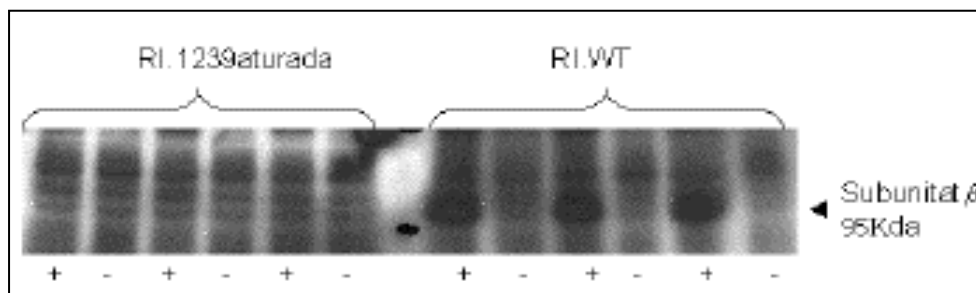
La unió de la insulina al receptor RI.1239A turada estudiada en el llisat cel·lular mitjançant assajos d'unió de  $^{125}\text{I}$ -insulina, va revelar que aquest receptor mutat uneix un 50% menys d'insulina que el receptor RI.WT (**figura 31**).



**Figura 31.-** Representació de la unió de la insulina *in vitro* dels receptors RI.WT, RI.1239Atrurada.

### 6.5.5.- AUTOFOSFORILACIÓ

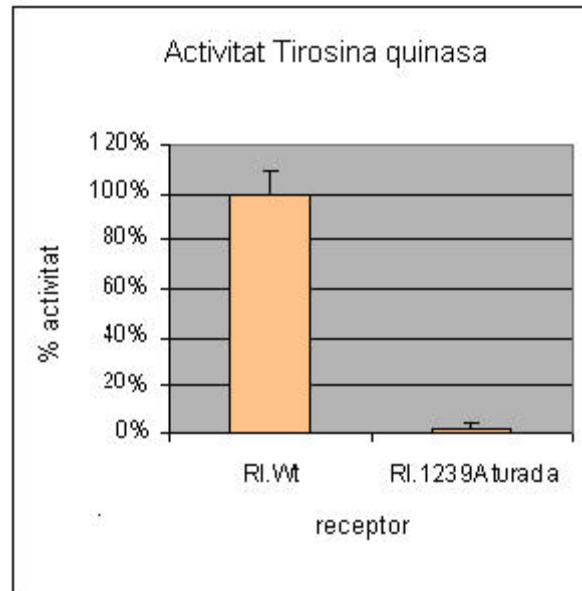
Els estudis d'autofosforilació del receptor mitjançant western blot i emprant els anticossos específics (un anticòs antifosfotirosina de ratolí com a primer anticòs i un anticòs anti-ratolí IgG marcat amb HRP com a segon anticòs), van donar com a resultat la total abolició de l'autofosforilació del receptor (**figura 32**).



**Figura 32.-** Western blot de l'autofosforilació del receptor RI.1239Atrurada. Tal i com es pot comprovar no hi ha fosforilació en el receptor mutat. +; estimulació amb insulina. -; no estimulació.

### 6.5.6.- ACTIVITAT TIROSINA QUINASA

L'activitat tirosina quinasa del receptor RI.1239Aturada, mesurada com la incorporació de  $^{32}\text{P}$ -ATP en un pèptid substrat sintètic exogen degut a l'activitat del receptor és nul·la (**figura 33**).



**Figura 33.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa. El receptor RI.1239Aturada pràcticament no presenta aquesta activitat.

### 6.6.- MUTACIÓ VAL1028

Aquesta mutació no descrita fins ara, l'hem detectada en una pacient afectada de la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (A3). Els resultats dels estudis funcionals per determinar l'efecte de la mutació en el receptor han estat els següents:

#### 6.6.1.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Per tal d'introduir la mutació Val1028 en l'ADNc del receptor d'insulina va ser necessari clonar aquest ADNc en el vector de clonació pUC18.

Tots els experiments que es van fer emprant el vector pRc.CMV.RI i el sistema GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega) van ser nuls alhora d'obtenir RI.Val1028. Es van emprar diferents parells d'encebadors mutagènics, es va afegir DMSO en diferents concentracions a les reaccions de mutagènesi, es van emprar diferents estratègies de desnaturalització (encebadors i ADN junts, encebador per un costat i ADN per un altre), es van testar

diferents concentracions de vector i diferents concentracions d'encebadors, i no es va aconseguir mutar el receptor inserit en el vector.

Per tal de d'utilitzar el sistema de mutagènesi QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) es va haver de tallar l'ADNc del vector pRc.CMV i clonar-lo en el vector pUC18. Això va ser necessari perquè aquest sistema no treballa bé amb vectors grans (el pRc.CMV.RI té aproximadament 10Kb, mentre que el pUC18 en té unes 7Kb). El problema és que el pUC18 no té un promotor potent com el del pRc.CMV (promotor del CitoMegaloVirus humà) per poder expressar la proteïna en cèl·lules eucariotes, així que aquest vector només es va emprar per la mutagènesi.

De la bateria de reaccions que es van fer amb aquest sistema utilitzant diferents concentracions d'ADN amb un 5% de DMSO o bé sense, es van obtenir 11 colònies entre tres plaques on s'havia emprat DMSO a la reacció de mutagènesi, i només 1 en una de les plaques sense DMSO (l'ADN de la qual no es va recuperar amb els minipreps). El resultat de les seqüències d'aquestes colònies va ser 6 colònies amb la mutació Val1028, 1 colònia WT i 4 colònies il·legibles.

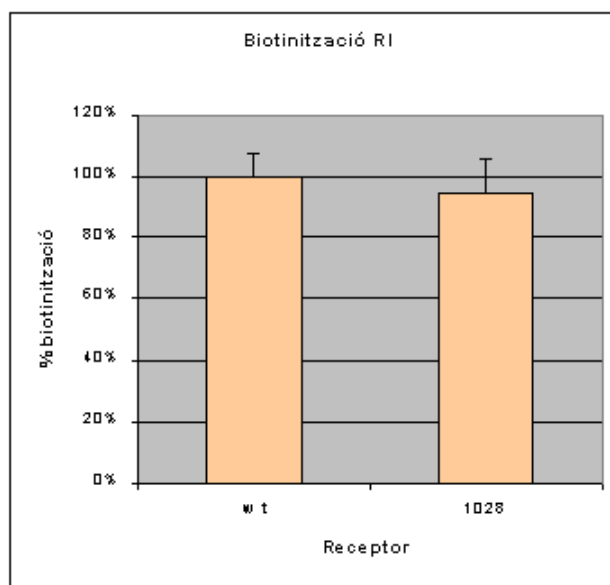
Per tal de poder expressar aquests ADNc mutats, es van tallar del vector pUC18 mitjançant l'enzim Hind III, es va recuperar la banda del ADNc del gel d'agarosa i es va inserir en el vector pRc.CMV.

Un cop es va obtenir la construcció pRc.CMV.RI1028, es va utilitzar per fer els estudis de transfecció i expressió. Se'n va fer un stock de glicerol per tal d'immortalitzar el clon.

La taxa de mutagènesi d'aquest sistema no es va poder establir ja que es van obtenir un número de colònies molt baix, probablement degut a la dificultat amb què els encebadors s'uneixen al seu motlle, ja que és una regió rica amb G+C.

### 6.6.2.- EXPRESSIÓ

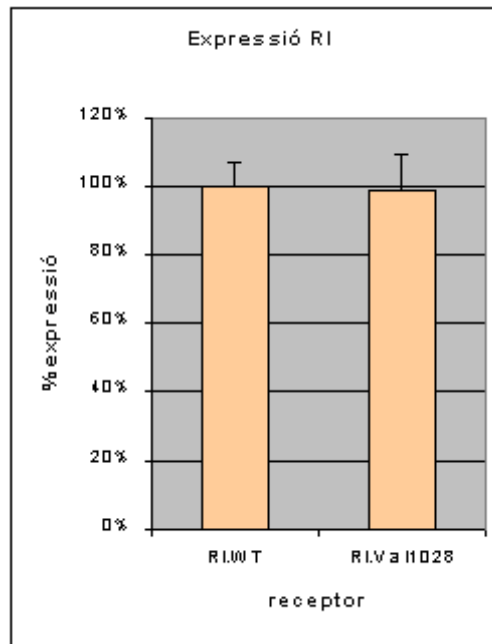
Els resultat d'expressar el receptor RI.Val1028 en les cèl·lules CHO, i estudiant els nivells d'expressió en el llisat cel·lular, va ser que el receptor mutat s'expressa normalment, amb un nivell equivalent al del receptor RI.WT. El resultat és la mitja de tres experiments on cada dada s'obté per sixtuplicat (**figura 34**).



**Figura 34.-** Representació dels nivells d'expressió del receptor RI.Val1028 respecte als del receptor RI.WT. Es pot comprovar que el receptor mutat 1028 s'expressa de forma paral·lela al receptor estàndard.

### 6.6.3.- BIOTINITZACIÓ

Aquesta informació sobre l'expressió del receptor a membrana plasmàtica, corrobora la de l'expressió en el llisat cel·lular. El resultat és la mitja de tres experiments diferents on les dades s'obtenen per triplicat. Aquest receptor s'expressa en superfície igual que el receptor RI.WT. Això indica que no hi ha problemes de síntesi ni de transport intracel·lular d'aquest receptor (**figura 35**).



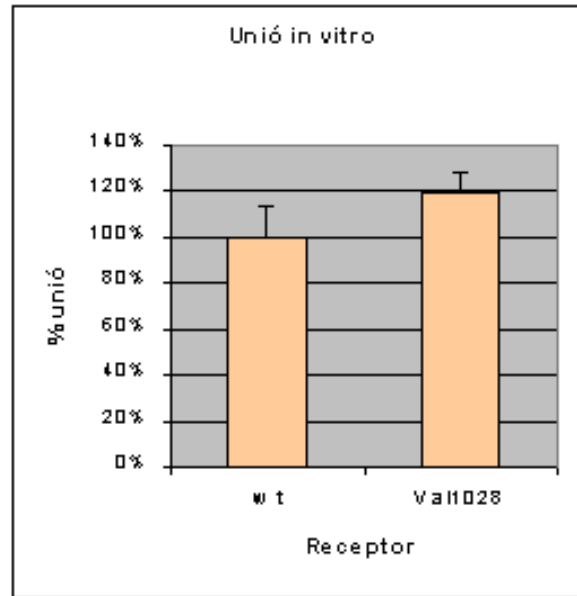
**Figura 35.-** Representació de l'expressió a membrana plasmàtica dels receptors RI.WT i RI.Val1028. Els nivells d'expressió d'ambdós tipus de receptors són gairebé equivalents.

#### 6.6.4.- UNIÓ DE LA INSULINA AL RECEPTOR

La capacitat d'aquest receptor per unir la insulina es va estudiar de dues maneres: en el llisat cel·lular (*in vitro*) i en cèl·lules senceres en suspensió (*in situ*), els resultats obtinguts són els següents.

##### 6.6.4.1.- 'IN VITRO'

El resultat de l'estudi *in vitro* va ser que el receptor RI.Val1028 uneix un 20% més d'insulina que el WT. L'experiment es va fer una única vegada i cada dada s'obté per sextuplicat (**figura 36**). Encara que aquesta diferència és estadísticament significativa es va esperar tenir el resultat dels diferents estudis funcionals per determinar-ne la significació.

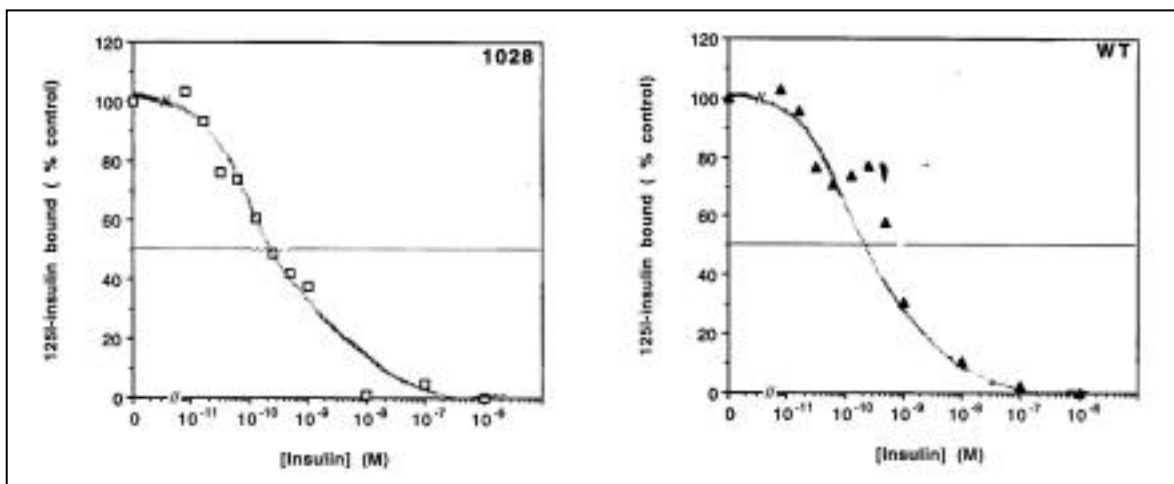


**Figura 36.-** Esquema de la unió *in vitro* dels receptors RI.WT i RI.Val1028. El receptor mutat presenta un increment significatiu en la unió respecte al RI.WT, per tenir en compte aquesta diferència és necessari relacionar les dades de les diferents proves funcionals.

#### 6.6.4.2.- 'IN SITU'

L'estudi de la unió *in situ* es va efectuar mitjançant una corba d'Scarchard, d'aquesta manera també es va mesurar l'afinitat dels receptors.

El resultat va ser que els receptors mutats RI.Val1028 uneixen la insulina de la mateixa manera i amb la mateixa afinitat que els receptors WT (**figura 37**). Aquesta dada va descartar que el receptor mutat lligui més insulina que el WT.

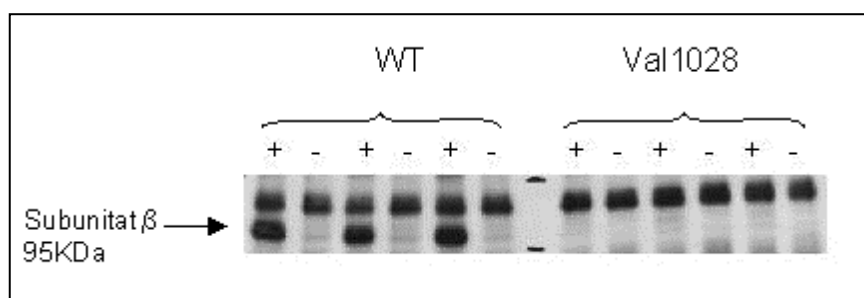


**Figura 37.-** Corbes d'Scarchard pels receptors RI.Val1028 i RI.WT. Es pot comprovar que les corbes són molt iguals i el punt de tall en el 50% d'unió coincideix en 0,3nM.

Aquesta dada descarta la significació del resultat de la unió de la insulina *in vitro*. Probablement l'increment del percentatge d'unió detectat es degui a algun problema de manipulació de la mostra.

### 6.6.5.- AUTOFOSFORILACIÓ

L'estudi de l'autofosforilació mitjançant western blot i emprant els anticossos específics (un anticòs de ratolí antifosfotirosina com a anticòs primari i un anticòs antiratolí IgG marcat amb HRP com a anticòs secundari) va revelar l'absència de fosforilació del receptor mutat RI.Val1028 (**figura 38**). Aquest estudi es va fer per duplicat i cada dada de l'experiment es va obtenir per triplicat.

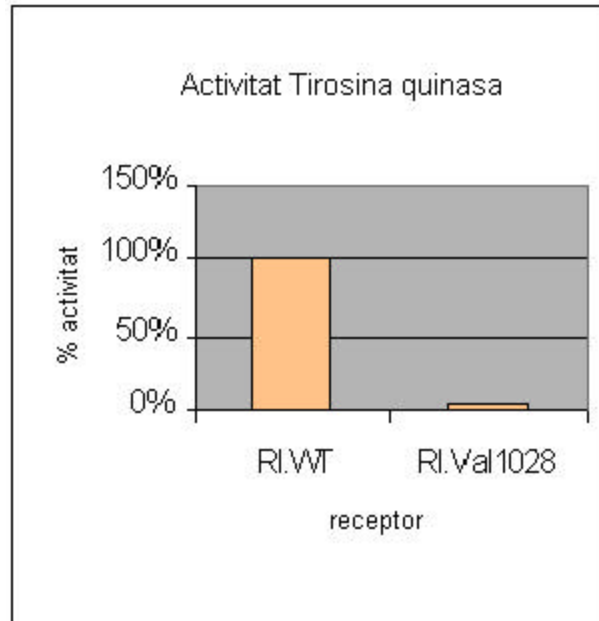


**Figura 38.-** Western blot de l'estudi de fosforilació del receptor RI.Val1028. S'indica amb el signe + les mostres estimulades amb insulina i amb el signe – les mostres sense estimular. Es pot veure en les mostres del receptor mutat que no s'observa fosforilació del receptor ni en les mostres estimulades ni en les mostres sense estimular, per tant aquest receptor no es fosforila.

### 6.6.6.- ACTIVITAT TIROSINA QUINASA

L'activitat tirosina quinasa es va mesurar mitjançant la incorporació de  $-^{32}\text{P}$  al substrat sintètic FYF del receptor d'insulina. Es va obtenir cada dada per triplicat i es van fer dos experiments independents. El resultat va ser conseqüent amb el resultat de l'autofosforilació i pràcticament no es va detectar activitat tirosina quinasa del receptor RI.Val1028 (un 4% respecte al WT) (**figura 39**).





**Figura 39.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa. El receptor RI.Val1028 presenta una activitat pràcticament nul·la.  $P=0,001$ .

## 6.7.- DETERMINACIÓ DE L'EFECTE DOMINANT NEGATIU DE LA MUTACIÓ VAL1028

Per tal de determinar la dominància de la mutació Val1028 (situada en el domini tirosina quinasa del receptor) es van cotransfectar les cèl·lules CHO amb 0,25 $\mu$ g de cada una de les construccions pRc.CMV.RI.Val1028 i pRc.CMV.RI.WT (de manera que el tipus d'expressió esperada seria com en una situació d'heterozigosi, tal i com es dona en la pacient estudiada).

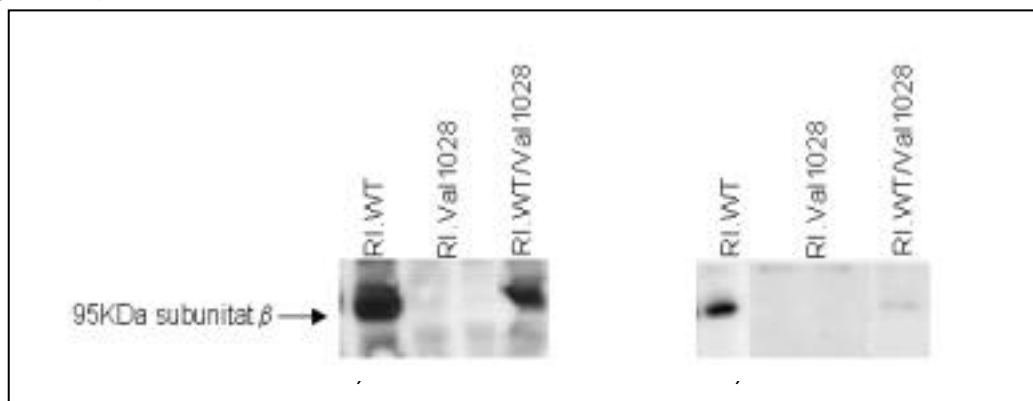
El resultat de l'estudi de la coexpressió (mitjançant western i amb els anticossos específics) va ser que no hi havia diferències amb l'expressió de les dues construccions per separat (**figura 40**).



**Figura 40.-** Expressió de la cotransfecció dels receptors RI.WT i RI.Val1028.

L'estudi de l'autofosforilació va donar resultats dispersos. En dos experiments el resultat va revelar que pràcticament no hi havia autofosforilació a l'estudiar els dos

receptors coexpressats, per tant aquí es donava l'efecte de dominància negativa del receptor RI.Val1028 sobre el receptor RI.WT. En uns altres dos experiments el resultat va ser que els receptors coexpressats s'autofosforilaven amb una intensitat de banda que representava la meitat de la banda obtinguda només amb l'expressió del receptor RI.WT tal i com s'esperaria si els dos receptors presentessin la mateixa dominància (figura 41).



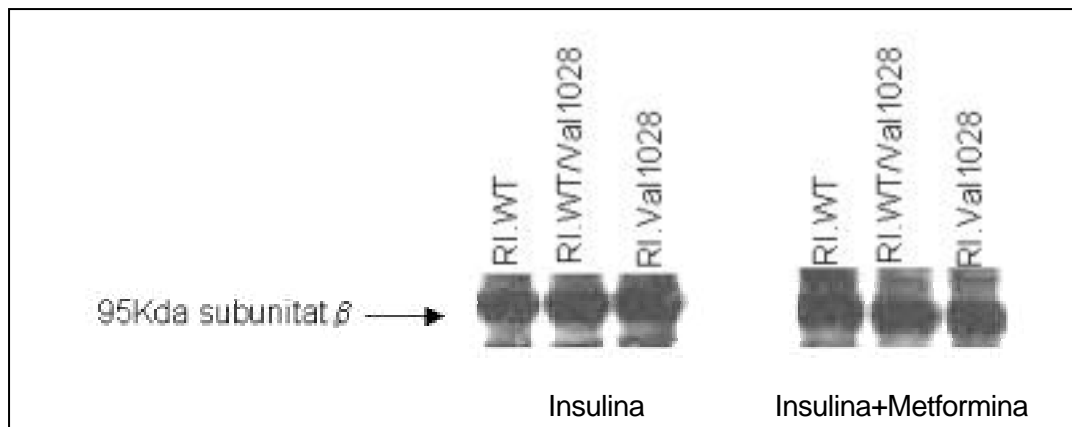
**Figura 41.-** Autofosforilació dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028. a) es detecta la meitat de fosforilació en els receptors coexpressats respecte als receptors RI.WT. b) pràcticament no es detecta autofosforilació en els receptors coexpressats.

## 6.8.- EFECTE DE LA METFORMINA EN ELS RECEPTORS RI.VAL1028, RI.WT I RI.WT/VAL1028

Els resultats dels estudis funcionals fets amb els receptors prèviament estimulats amb la Metformina són, encara, preliminars. S'espera poder efectuar més experiments per tal de confirmar aquests resultats.

### 6.8.1.- EXPRESSIÓ

Els experiments d'incubació de les cèl·lules CHO transfectades amb els diferents tipus de receptors, amb la Metformina durant 30min., semblen indicar que aquest antidiabètic oral no afecta a l'expressió d'aquests receptors. L'expressió s'ha estudiat mitjançant western blot i emprant anticossos específics (figura 42).



**Figura 42.-** Expressió dels receptors incubats en diferents condicions d'estimulació. No es veuen diferències en l'expressió en les diferents condicions.

## 6.8.2.- UNIÓ DE LA INSULINA AL RECEPTOR

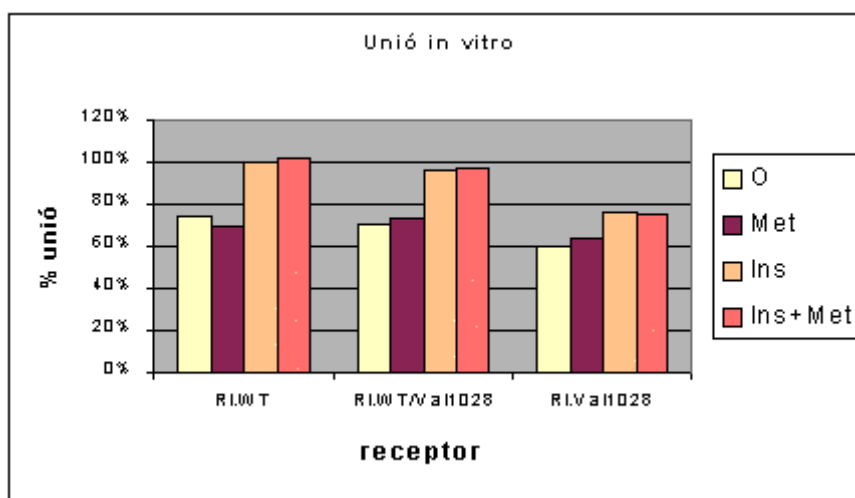
Únicament es van fer els assajos d'unió al receptor *in vitro*.

### 6.8.2.1.- 'IN VITRO'

Els assajos d'unió de la insulina als receptors en el llisat cel·lular després de sotmetre les cèl·lules a les següents condicions d'estimulació:

- ▶ Sense estimular
- ▶ Estimulades només amb Insulina
- ▶ Estimulades amb Metformina i amb Insulina.
- ▶ Estimulades només amb Metformina

han donat com a resultat que la Metformina sola no incrementa aquesta unió. Quan les cèl·lules han estat estimulades amb insulina i amb insulina i Metformina es detecta un lleuger increment de la unió comparat amb les cèl·lules no estimulades o bé estimulades només amb Metformina. Els receptors RI.WT/Val1028 es comporten de manera paral·lela als receptors RI.WT. Els receptors RI.Val1028 presenten una unió lleugerament disminuïda respecte als RI.WT (**figura 43**).

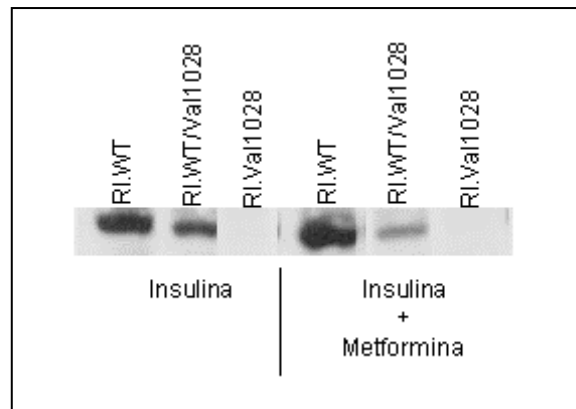


**Figura 43.-** Representació de la unió *in vitro* de la insulina pels diferents receptors incubats en les diferents condicions. La incubació de les cèl·lules només amb Metformina no modifica la unió.

### 6.8.3.- AUTOFOSFORILACIÓ

Es va estudiar la fosforilació en les mateixes condicions d'estimulació en què es va estudiar la unió. Es van emprar els anticossos específics necessaris (Py20 de ratolí com a primer anticòs i un anticòs de cabra dirigit contra ratolí marcat amb HRP com a anticòs secundari).

El resultat de l'autofosforilació és una mica confós. Sense estimular o estimulants només amb Metformina no es detecta autofosforilació de la subunitat del receptor. Quan estimulem amb insulina i amb insulina+Metformina es detecta autofosforilació en els receptors RI.WT i RI.WT/Val1028. No es detecta mai fosforilació dels receptors RI.Val1028. La intensitat de la banda de fosforilització dels receptors RI.WT/Val1028 depèn de l'experiment (des de gairebé no detecció fins a ser aproximadament el 50% dels RI.WT). L'estimulació amb insulina+Metformina dóna un increment de fosforilització només en els receptors RI.WT, mentre que en els receptors RI.WT/Val1028 fins i tot sembla donar un decrement (**figura 44**).



**Figura 44.-** Representació de la fosforilació dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028 i RI.Val1028 estimulats amb insulina i amb insulina+Metformina.

#### 6.8.4.- ACTIVITAT TIROSINA QUINASA

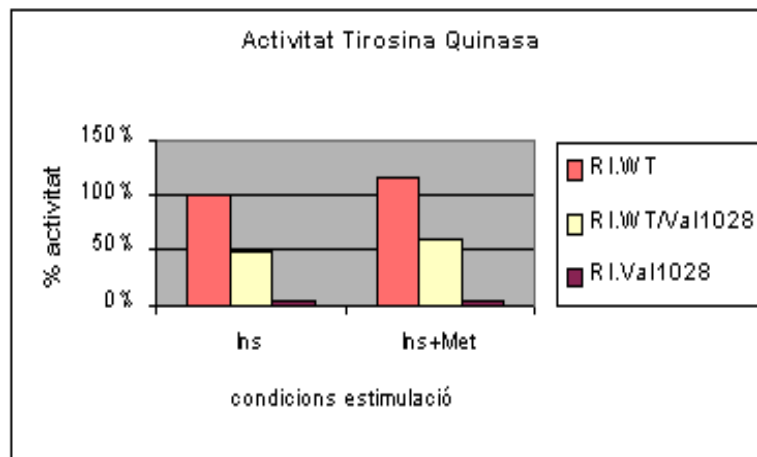
S'ha mesurat l'activitat tirosina quinasa dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028, RI.Val1028 en les següents condicions:

- ▶ Sense estimular
- ▶ Estimulades només amb Insulina
- ▶ Estimulades amb Metformina i amb Insulina.
- ▶ Estimulades només amb Metformina

El resultat obtingut ha estat que no hi ha activitat tirosina quinasa quan els receptors no han estat estimulats o bé quan han estat estimulats només amb Metformina.

Hi ha detecció d'activitat tirosina quinasa en els receptors RI.WT i RI.WT/Val1028 quan han estat estimulats amb insulina. A destacar que l'activitat dels receptors RI.WT/Val1028 és la meitat que la detectada en els receptors RI.WT. No es detecta activitat en els receptors RI.Val1028.

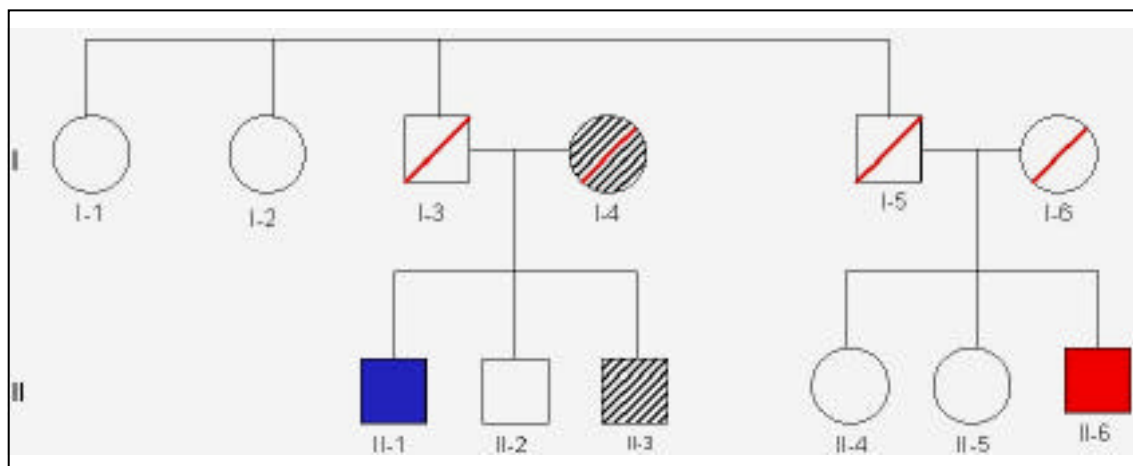
Es detecta un increment de l'activitat tirosina quinasa dels receptors RI.WT i RI.WT/Val1028 quan són estimulats amb insulina i amb Metformina. L'activitat dels receptors RI.WT/Val1028 en aquesta situació s'aproxima a l'activitat dels receptors RI.WT quan són estimulats només amb insulina. En els receptors RI.Val1028 no es detecta cap modificació en el patró de l'activitat (**figura 45**).



**Figura 45.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028 i RI.Val1028 estimulats amb insulina o amb insulina+Metformina.

## 6.9.- MUTACIONS LYS15 I ATURADA1000

Hem detectat les mutacions Lys15 i Aturada1000 en un pacient afecte de la síndrome de Rabson-Mendenhall. Aquest pacient és heterozigot compost per aquestes dues mutacions, de les quals la Lys15 és d'origen matern, mentre que el codó d'Aturada1000 és d'origen patern. Aquestes mutacions però ja han estat prèviament descrites en d'altres pacients, un d'ells afecte de la mateixa síndrome i pertanyent a la mateixa família (**figura 46**).



**Figura 46.-** Arbre genealògic de la família afecte de la síndrome de Rabson-Mendenhall. En vermell està assenyalat el pacient estudiat. En blau s'assenyala un altre membre afecte de la citada síndrome. L'individu I-4 és la tia de l'individu I-6. L'individu II-3 va morir a l'edat de dos anys, es desconeix la causa.

L'efecte d'aquestes mutacions es descriu en l'apartat 7.3.5. de la discussió.

## **6.10.- VARIANT VAL985MET**

Es va detectar la variació Val985Met en heterozigosi en un individu control normoglicèmic que no tenia antecedents familiars de diabetis ni d'hipertensió.

No està clar si aquesta variació es pot considerar un polimorfisme (canvi d'aminoàcid que no comporta cap canvi funcional ni estructural de la proteïna resultant), o una mutació de canvi de sentit (amb un efecte directe sobre la proteïna), per tant la continuarem anomenant variant.

Aquesta mutació ha estat descrita prèviament per altres grups (48, 85-87) i per tant en aquest estudi no s'han fet els assajos pertinents per tal de conèixer l'efecte que exerceix sobre el receptor. En l'apartat 7.4 de la discussió es comenten els resultats obtinguts per aquests grups.