

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología
molecular

CARACTERIZACIÓN DE SNP DE SUSCEPTIBILIDAD EN DOS microRNA RELACIONADOS CON LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Egilea/Autor:

Maialen De La Cuesta Etxeberria

Zuzendariak/Directores:

David Otaegui (IIS Biodonostia) y Ana Zubiaga (UPV/EHU)

© 2015, Maialen De La Cuesta Etxeberria

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	3
3 MATERIAL Y MÉTODOS	3
3.1 BÚSQUEDA DE LOS GENES QUE CODIFICAN EL miR3155 Y miR3656	3
3.2 DISEÑO DE CEBADORES PARA LOS DOS miRNA	3
3.3 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA LA RFLP	3
3.4 PONER A PUNTO LA RFLP DE LOS DOS miRNA	6
3.4.1 miR3656 (MluCI)	6
3.4.2 miR3155a /miR3155b (NlaIV)	6
3.5 SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS EN GELES DE AGAROSA	7
3.6 GENOTIPADO DE PACIENTES Y CONTROLES	7
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	8
4 RESULTADOS Y CONCLUSIONES	8
4.1 PONER A PUNTO LA RFLP DE LOS DOS miRNA Y SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS EN GELES DE AGAROSA	8
4.1.1 miR3656 (MluCI)	9
4.1.2 miR3155a /miR3155b (NlaIV)	10
4.2 GENOTIPADO DE PACIENTES Y CONTROLES	10
4.2.1 PCR Y SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS EN GELES DE AGAROSA DE LOS DOS miRNA	10
4.2.1.1 miR3656	10
4.2.1.2 miR3155a/ miR3155b	11
4.2.2 RFLP E IDENTIFICACIÓN DE PATRONES EN GELES DE AGAROSA	11
4.2.2.1 miR3656	11
4.2.2.2 miR3155a/ miR3155b	12
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
5. BIBLIOGRAFÍA	13

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica autoinmune y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) caracterizada por las lesiones o placas escleróticas que presentan sus pacientes. Estas placas se forman como consecuencia de una desmielinización focal aguda e inflamatoria asociada a una posible pérdida axonal con una posterior remielinización. A pesar de que se han descrito casos con un inicio de la enfermedad en edad infantil, la EM es considerada una enfermedad que afecta a adultos jóvenes, entre 20 y 40 años de edad, llegando a ser la segunda causa de discapacidad neurológica en esta franja [1]. En cuanto al género, la probabilidad que tienen las mujeres jóvenes de padecer esta enfermedad es tres veces mayor que la de los varones. Normalmente, los síntomas que se observan clínicamente suelen estar relacionados con una afectación monofocal, que bien puede ser una afectación motora, visual, sensorial o del sistema autónomo, o incluso una afectación cognitiva. No obstante, a veces pueden existir casos en los que el paciente muestra signos clínicos que sugieren lesiones multifocales.

El sistema nervioso central (SNC) está compuesto por dos tipos de células: las neuronas, encargadas de conducir el impulso nervioso a través de sus axones, y las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y la microglía), vitales para la supervivencia y buen funcionamiento de las neuronas. Los astrocitos, regulan la sinapsis, al mismo tiempo que controlan el flujo sanguíneo, mientras que la microglía son células del sistema inmune encargadas de mantener el ambiente inmunológico adecuado del cerebro. La gran mayoría de los axones están cubiertos por una vaina de mielina, una estructura multilaminar compuesta por lípidos y proteínas estructurales, que protege el axón. Esta vaina es la membrana plasmática de los oligodendrocitos y permite que la conducción del potencial de acción sea saltatoria y rápida [2, 3], gracias a los canales de sodio que se encuentran entre las áreas mielinizadas de los axones, denominadas nódulos de Ranvier.

Las moléculas que entran y salen del sistema nervioso central (SNC) son transportadas por una maquinaria selectiva situada en la barrera conocida como barrera hemato-encefálica (BHE), que separa el torrente sanguíneo del parénquima del SNC. Esta barrera está formada por células epiteliales cuya unión está reforzada gracias a las prolongaciones de los astrocitos que llegan a su membrana basal [4], formando de esta manera, una doble barrera entre la sangre y el parénquima: la barrera endotelial y la barrera glial. En condiciones fisiológicas, cuando las células del sistema inmune que circulan por la sangre, identifican los antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno (CPA), se activan y cruzan la barrera endotelial de la BHE. Sin embargo, en el caso de los pacientes de esclerosis múltiple (EM), los precursores de linfocito T CD4⁺ autoreactivo, presentes en la sangre, son capaces de cruzar también la barrera glial, además de la endotelial. Esta capacidad se debe al aumento de expresión de moléculas de adhesión en la superficie de los linfocitos, generado por su activación al reconocer su antígeno específico presentado por las CPA en el espacio perivascular. Gracias a estas moléculas de adhesión, estos leucocitos son capaces de crear una unión fuerte con las células endoteliales, pudiendo así adentrar en el parénquima del sistema nervioso central [5]. Una vez dentro, estas células inmunes sufren una reactivación por parte de los astrocitos o células de la microglía activada, desencadenando una respuesta inflamatoria en la que participan factores y moléculas como las citoquinas, quimiocinas, glutamato, óxido nítrico y radicales libres. Todos ellos atraen a más linfocitos, haciendo que el proceso se repita una y otra vez, al mismo tiempo que producen daño en la vaina de mielina. Este daño puede estar dirigido por la toxicidad generada por los linfocitos T CD8⁺, por la activación de macrófagos y células gliales capaces de digerir algunos componentes de la mielina o por el efecto directo de las citoquinas inflamatorias [6]. Todo esto promueve la desmielinización focal de los axones, formando así las placas o lesiones escleróticas que dieron lugar al nombre de esta enfermedad.

Ante este ataque inmunológico, el SNC es capaz de compensar el daño producido mediante diferentes factores tales como la resolución de la inflamación, la adaptación compensatoria del SNC y la remielinización [7, 8, 9]. Este último proceso está dirigido por las células precursoras de oligodendrocitos (OPC del inglés, *oligodendrocyte precursor cells*) capaces de diferenciarse en oligodendrocitos maduros responsables de la síntesis de la mielina. A pesar de que la nueva región internodal suele ser más corta y fina, estos axones parece que presentan una función normal [10, 11]. Este fenómeno de remielinización se ve reflejado en una mejoría clínica tras un brote, un primer episodio de déficit neurológico focal provocado por una lesión desmielinizante. La capacidad de regeneración de esta vaina es limitada y por ello llega un momento, en el que el SNC no es capaz de compensar la desmielinización, produciéndose así un empeoramiento progresivo de la enfermedad derivado en parte del daño axonal acumulado al quedar el axón desprotegido. Este daño axonal es considerado la mayor causa de la discapacidad neurológica presente en los pacientes de EM y algunos estudios indican que esta neurodegeneración está presente desde el comienzo de la enfermedad [12], sólo que el SNC es capaz de solventarlo al principio, hasta que llega ese momento en el que no tiene más recursos y por tanto, la enfermedad pasa a una segunda fase donde la inflamación no predomina tanto, y predomina más la neurodegeneración.

En cuanto a su etiología, no se sabe cómo se origina esta enfermedad. Sus causas no se han podido caracterizar de una manera clara, pero se conoce que en su origen interactúan factores ambientales, tales como la luz solar, el tabaco y las infecciones víricas, unidos a una predisposición genética. A la hora de analizar esta predisposición, se han realizado diferentes estudios, de los cuales los que mayor impulso han dado han sido los estudios de asociación de genoma completo. Estos trabajos se centran en el análisis de cientos de miles de SNP (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) a lo largo de todo el genoma en una población de controles sanos y enfermos, para poder así determinar sus frecuencias, observar si existe alguna diferencia y ver si pueden sugerir una asociación con la enfermedad. En 2011, se publicó en Nature el GWAS (del inglés, *Genome Wide Association Study*) más grande realizado hasta ahora, en el que se genotiparon 465434 SNP autosómicos en 9772 casos y 17376 controles, caracterizando 57 zonas ligadas a la EM [13]. A partir de 2011 nuevos estudios y otros trabajos de meta-análisis han sido capaces de identificar nuevas variantes elevando el número de variantes asociadas a la enfermedad [14, 15]. Sin embargo, éstos son capaces de explicar únicamente entre un 18 y 24% de la heredabilidad de la EM. Este resultado puede deberse a diferentes causas derivadas de la propia complejidad de la enfermedad, aunque también hay que tener en cuenta que, desde el punto de vista técnico, estos análisis no tienen en cuenta la información que contienen las regiones no codificantes del genoma.

Esta información se empezó a tener en cuenta, gracias al nuevo punto de vista generado por el proyecto ENCODE (del inglés, *The Encyclopedia of DNA elements*) que incide en la importancia de los RNA no codificantes. Dentro de este grupo, los microRNA (miRNA) son los que más se han estudiado. La función de estas moléculas de RNA, compuestas por 22 nucleótidos aproximadamente, es regular la expresión génica, bien degradando el mRNA, o bien inhibiendo su traducción. Diversos estudios han demostrado que los miRNA, están implicados en muchos procesos biológicos, tales como el desarrollo, diferenciación, regulación de células madre, proliferación y muerte celular, desarrollo y función de las células del sistema inmune, etc. [16, 17, 18, 19, 20]. Por ello, en base a estos nuevos datos, Otaegui y colaboradores, reanalizaron los datos del GWAS, buscando en las 57 regiones asociadas a la EM genes de miRNA. En este análisis se encontraron 26 genes de miRNA, que analizaron en 7 familias guipuzcoanas con esclerosis múltiple, secuenciando a cada hermano sano y enfermo de cada familia. Al secuenciar dichos genes, encontraron dos regiones que contenían los miRNA, miR3155a, miR3155b y miR3656, que tenían variantes genéticas (SNP) que potencialmente podrían estar ligadas a la enfermedad (trabajo en preparación, datos no publicados).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este proyecto es analizar si estos polimorfismos de nucleótido único (SNP) encontrados en los dos miRNA citados anteriormente, miR3155 y miR3656, son susceptibles a la enfermedad de la esclerosis múltiple.

Para poder responder a esta pregunta, el objetivo de este proyecto es validar estas variantes en un grupo de pacientes (n=285) y controles (n=285) para demostrar si las variaciones están sobre representadas en la población con EM de manera significativa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Búsqueda de los genes que codifican el miR3155 y miR3656

Para encontrar y recopilar información acerca de la secuencia de estos dos genes se utilizó la base de datos NCBI. Existen dos tipos de miR3155, el miR3155a (Chr10:6194159-6194240) y el miR3155b (Chr10:6194170-6194225). Los dos genes se encuentran en el cromosoma 10 compartiendo una misma región del ADN y por tanto, son considerados genes solapados. El estudio de ambas se realizó de manera conjunta, utilizando una secuencia que abarcara las dos secuencias, añadiendo 200 bp de más en cada extremo de la misma para el posterior diseño de cebadores (Chr10:6193959-6194440).

El miR3656 se encuentra en el cromosoma 11 y en este caso, también se le añadieron 200 bp de más a cada extremo de la secuencia para poder después diseñar los cebadores para la PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) (Chr11:118889454-118889922).

3.2 Diseño de cebadores para los dos miRNA

El diseño de cebadores se realizó con el programa Primer3, escogiendo las que mejor se ajustaban a nuestras condiciones (Tm, %GC, cantidad de nucleótidos etc.). Los juegos de cebadores complementarios a una región del miR3155a/miR3155b y otros complementarios al miR3656, se encargaron a la empresa Eurofins (mwg/operon) (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del ADN.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3') (tamaño)	Tm (°C)	%GC
mir3155a/mir3155b F	GTTTCTGCCTTGATGCCTAGA (21)	58.01	47.62
mir3155a/mir3155b R	TTCCACCTCCTACCAGACG (20)	60.61	60
hsa-mir-3656 F	CGTCGGGTAGAGGCTGAATA (20)	58.68	55
hsa-mir-3656 R	AGCACTGCATGACCCACTG (19)	60.30	57.9

3.3 Enzimas de restricción para la RFLP

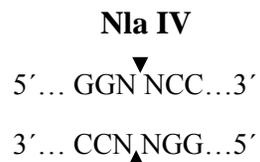
La técnica RFLP (del inglés, *restriction fragment length polymorphism*) se basa en la identificación y en el corte de secuencias específicas de nucleótidos en el ADN mediante enzimas de restricción. Estas secuencias varían entre los individuos y es por ello, que estas proteínas cortan únicamente aquellas que contengan su secuencia específica. De manera que realizando una electroforesis y observando la cantidad de bandas generadas, se determinará en qué individuos ha actuado la

enzima, pudiendo así realizar el genotipado. Esta técnica se suele emplear mucho a la hora de analizar los polimorfismos de nucleótido único (SNP), ya que la sustitución de un nucleótido hace que se impida la identificación de la secuencia específica que reconoce la enzima de restricción, dando lugar a un patrón diferente en la electroforesis. Antes de utilizar esta técnica es necesario amplificar el ADN extraído tanto de los pacientes como de los controles mediante la técnica PCR.

Utilizando el programa NebCutter V2 y teniendo en cuenta los SNP de cada miRNA (secuenciados anteriormente en hermanos sanos y enfermos de 7 familias guipuzcoanas por Otaegui et al.), se eligieron las enzimas de restricción que mejor se ajustaban a nuestras condiciones.

En el caso del miR3155a/miR3155b, se escogió la enzima de restricción NlaIV (GGNNCC), en base al alelo referente (citosina, C) y minoritario (timina, T) del SNP (rs10795846) de este miRNA, que se encuentra en la posición 394 bp de la secuencia de este gen. Si el alelo es T, la secuencia del gen de este miRNA estará cortada en dos posiciones (213 bp, 372 bp), mientras que si es C, estará cortada en una posición más (394 bp) (Figura 1A).

En el caso del miR3656, Otaegui et al. encontraron tres SNP (rs3802884, rs3802883, rs3802882) que parecía que podían estar relacionados con la enfermedad. En este proyecto únicamente se va a analizar el genotipo de uno, ya que estos tres forman un haplotipo, por lo que la información de uno de ellos nos sirve para extrapolar la de los otros dos. El alelo referente de este SNP (rs3802884) es la citosina (C), mientras que el alelo minoritario es la timina (T). Por ello, en este caso, se escogió la enzima de restricción MluCI (AATT). La secuencia del gen del miR3656 no será cortada en ninguna posición si el alelo es C, mientras que si es T, se tendrá una diana de restricción (346 bp) (Figura 1B).



ALELO REFERENTE

GTTTCTGCCTTGATGCCTAGACAAAAATGTCCTGAAACAATACTTCACCTCAGACAATACTGTACATGCTGATGTTTTCTAGTCTGTTCCATTTTCATTAAGAAAGATTCTGGTCTTATTCCAGTAAATTGATTTCAAGGCCACTAATGGGTGGTGACCCACACTTTTGAGATGCCTGTTCCGGGCATCACCTCCCACTGCAGAGCCTGGGGAGCCGGA
CAGCTCCCTTCCCAGGCTCTGCAGTGGGAACTGATGCCTGGAACAGTTCTGCAGCCGGTCTCCAGTGTGATT
CAGGTCTGCGGCAAGTTCTAGGTGGTCCAAGTGAGGCAGAAGCCTTGCTGGAGGCTTTACCCGTCCACACTG
CTGTGGAGCCTCTGAGCCTCCATGGAAGGCTCCCAAGCCAGGCAGCAGGGGAGGAAAGCGTCTGGTAGGAGGGT
GGAA

ALELO MINORITARIO

GTTTCTGCCTTGATGCCTAGACAAAAATGTCCTGAAACAATACTTCACCTCAGACAATACTGTACATGCTGATGTTTTCTAGTCTGTTCCATTTTCATTAAGAAAGATTCTGGTCTTATTCCAGTAAATTGATTTCAAGGCCACTAATGGGTGGTGACCCACACTTTTGAGATGCCTGTTCCGGGCATCACCTCCCACTGCAGAGCCTGGGGAGCCGGA
CAGCTCCCTTCCCAGGCTCTGCAGTGGGAACTGATGCCTGGAACAGTTCTGCAGCCGGTCTCCAGTGTGATT
CAGGTCTGCGGCAAGTTCTAGGTGGTCCAAGTGAGGCAGAAGCCTTGCTGGAGGCTTTACCCGTCCACACTG
CTGTGGAGCCTCTGAGCCTCCATGGAAGGCTCCCAAGCCAGGCAGCAGGGGAGGAAAGCGTCTGGTAGGAGGGT
GGAA

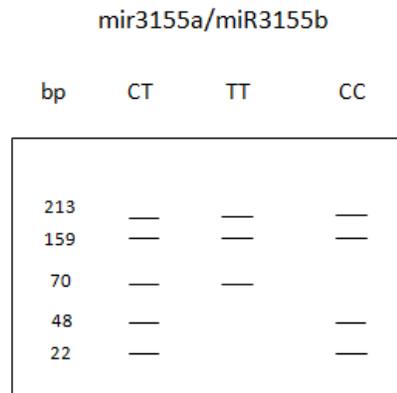


Figura 1A. Los cortes que va a realizar la enzima NlaIV (GGNNCC). Si el nucleótido 394 es una citosina, se generaran cuatro bandas posteriormente en la electroforesis. Si es una timina, tres.

MluCI



ALELO REFERENTE

CGTCGGGTAGAGGCTGAATAACCAGTTTCCGAGCGGCAAGGCAGCGATGGCGATTTTTAGTGTGTATGTGGTGA
 ACAAAGCTGGCGGCTTGATTTACCAGTTGGACAGCTACGCGCCACGGGCTGAGGCTGAGAAAACCTTTCAGTTA
 TCCGCTGGATCTGCTGCTCAAGCTACACGATGAGCGTGTGTTGGTTGCTTTCGGCCAGCGGGACGGCATCCGA
 GGTGGGCTAGGCTCGGGCCCCTGGCGGGTGCAGGGGTGGGAGGGCCCCAGTGCTGTAGAAGTGGGCTGGTTGT
 AGGTGCGGGGTTGGGGGAAAAGGGGTTGTGTCGGGTCCCTTGTCCCCTCGGCGGAATCCCCGGGCTGCACCTT
 CGCTGACCGTTAGCTTCACCTCTG**CAGTGGGTCATGCAGTGCT**

ALELO MINORITARIO

CGTCGGGTAGAGGCTGAATAACCAGTTTCCGAGCGGCAAGGCAGCGATGGCGATTTTTAGTGTGTATGTGGTGA
 ACAAAGCTGGCGGCTTGATTTACCAGTTGGACAGCTACGCGCCACGGGCTGAGGCTGAGAAAACCTTTCAGTTA
 TCCGCTGGATCTGCTGCTCAAGCTACACGATGAGCGTGTGTTGGTTGCTTTCGGCCAGCGGGACGGCATCCGA
 GGTGGGCTAGGCTCGGGCCCCTGGCGGGTGCAGGGGTGGGAGGGCCCCAGTGCTGTAGAAGTGGGCTGGTTGT
 AGGTGCGGGGTTGGGGGAAAAGGGGTTGTGTCGGGTCCCTTGTCCCCTCGGCGGAATCCCCGGGCTGCACCTT
 CGCTGACCGTTAGCTTCACCTCTG**CAGTGGGTCATGCAGTGCT**

mir3656

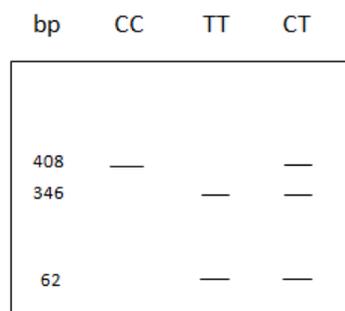


Figura 1B. Los cortes que va a realizar la enzima MluCI (AATT). Si el nucleótido 346 es una timina, se generaran dos bandas posteriormente en la electroforesis. Si es una citosina, una.

3.4 Poner a punto la RFLP de los dos miRNA

3.4.1 miR3656 (MluCI)

Se realizó una prueba para verificar el buen funcionamiento de esta enzima. Para ello, se utilizaron 12 muestras, 11 de ellas como controles positivos (pacientes anteriormente genotipados mediante secuenciación capilar de Sanger por Otaegui et al.) y una como control negativo (H₂O). Entre los controles positivos, algunos eran homocigotos para C, otros homocigotos para T y otros heterocigotos (Y), respecto al gen de este miRNA.

Antes de realizar la RFLP, hubo que amplificar el gen del miR3656 de todos los controles positivos y para ello, se realizó una PCR en el termociclador Veriti de Applied Biosystems utilizando el programa Touch Down 65-55, (disminuyendo 0.5 grados en cada ciclo durante 20 ciclos, por lo tanto, bajamos 10 grados). Para que se diera esta reacción se añadieron los siguientes compuestos: MgCl₂ (2.5mM), tampón 1x, desoxirribonucleótidos trifosfato (DNTPs) (0.5 mM), cebadores (0.125 µM cada uno), Taq polimerasa (0.075 U/µl), H₂O, ADN (5 ng/µl).

Una vez amplificado el gen, se realizaron cinco RFLP diferentes hasta conseguir las condiciones óptimas (Tabla 2).

Tabla 2. Las cinco RFLP realizadas para conseguir las condiciones óptimas. Éstas se consiguieron con las condiciones del cuarto ensayo.

Número de ensayo	Volumen de la enzima (µl)	Volumen del producto PCR (µl)	Tiempo de incubación (h)	Temperatura (°C)
1	0.5	5	3	37
2	0.5	5	Toda la noche	37
3	1	5	Toda la noche	37
4	0.5	1	3	37
5	0.1	1	Toda la noche	37

3.4.2 miR3155a/miR3155b (Nla IV)

En este caso, a la hora de realizar la prueba se utilizaron 4 muestras, un control por cada genotipo (pacientes anteriormente genotipados mediante secuenciación capilar de Sanger por Otaegui et al.) y una muestra como control negativo (H₂O).

Para amplificar el gen del miR3155a/miR3155b de dichas muestras, se realizó una PCR utilizando el programa Touch Down 65-55, en el que se utilizaron los siguientes compuestos para que se pudiera dar la reacción: MgCl₂ (2.5mM), tampón 1x, desoxirribonucleótidos trifosfato (DNTPs) (0.5 mM), DMSO (5%), cebadores (0.125 µM cada uno), Taq polimerasa (0.075 U/µl), H₂O, ADN (5 ng, µl).

Después de la amplificación, se tuvieron que llevar a cabo seis RFLP diferentes para poder comenzar a trabajar en condiciones óptimas (Tabla 3).

Tabla 3. Las seis RFLP realizadas para poder trabajar en condiciones óptimas. Éstas fueron obtenidas con las condiciones del quinto ensayo.

Número de ensayo	Volumen de la enzima (µl)	Volumen del producto PCR (µl)	Tiempo de incubación (h)	Temperatura (°C)
1	0.1	1	Toda la noche	37
2	0.5	1	3	37
3	1	3	3	37
4	0.1	10	3	37
5	0.5	10	3	37
6	1	10	3	37

3.5 Separación de fragmentos en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa para poder observar los resultados obtenidos tanto con la técnica PCR como con la RFLP. Los productos PCR se cargaban en geles de agarosa de 2%, dejando que las bandas migraran entre 20 y 30 minutos a 200 mV, mientras que los productos RFLP, se cargaban en geles de agarosa de 3%, dejando que las bandas migraran entre 40-50 minutos a 200 mV.

Una vez puesto a punto las RFLP de los dos miRNA, se empezó a trabajar con las muestras de los 285 pacientes y 285 controles.

3.6 Genotipado de pacientes y controles

En el caso de ambos miRNA, se realizaron seis PCR para la amplificación de cada gen de cada miRNA de todas las muestras, tres de ellas con muestras de controles (n=285) y las otras tres con muestras de pacientes (n=285). Para cada PCR se utilizó una placa de 96 pocillos, 95 para cargar las muestras y uno para el control negativo (H₂O). Las condiciones de las PCR realizadas para cada miRNA son las mencionadas en las secciones 3.4.1 y 3.4.2.

Posteriormente, para poder genotipar las muestras se realizaron seis RFLP para cada miRNA, tres de ellas con muestras de pacientes (n=285) y las otras tres, con muestras de controles (n=285). En este caso como en la PCR, para cada RFLP, se utilizó también una placa de 96 pocillos, 95 para las muestras y uno para el control negativo (H₂O), utilizando las condiciones óptimas para cada miRNA, mencionadas anteriormente en las secciones 3.4.1 y 3.4.2.

En general, tanto los productos PCR como RFLP se cargan en geles de agarosa, matrices tridimensionales constituidos por poros cuya función es separar las moléculas en función a su masa y carga. A la hora de cargar las muestras de ADN en el gel, se utiliza un tampón de carga compuesto normalmente por agua, sacarosa y un colorante (en nuestro caso utilizamos azul de bromofenol) y de esta manera, aplicando un campo eléctrico, se consigue que las moléculas de ADN migren hacia el polo positivo. Para que estas bandas sean visibles en los geles, éstos suelen teñirse con un intercalante del ADN, siendo el bromuro de etidio el que más se utiliza. Finalmente, es necesario añadir un tampón de elevada fuerza iónica para que la conductancia eléctrica sea elevada y se genere una importante cantidad de calor (en nuestro caso utilizamos el TBE).

En nuestro caso, los productos PCR se cargaban en geles de agarosa de 2%, dejándolos migrar entre 20 y 30 minutos, y para poder verificar que las bandas obtenidas cuadraban con el tamaño del amplicón, se cargaba también un marcador, ϕ X174 RF DNA/Hae III Fragments, constituido por bandas cuyo peso molecular ya se conocía.

Sin embargo, en el caso de los productos RFLP, éstos se cargaban en geles de agarosa de 3% a lo largo de una hora aproximadamente. En el caso del miR3656, se utilizó el mismo marcador que el utilizado con los productos PCR, mientras que en el caso del miR3155a/miR3155b, se utilizó otro marcador diferente para poder visualizar las bandas de menor peso molecular (25 bp DNA ladder). Gracias a las bandas generadas en estos geles se pudo realizar el genotipado tanto de los pacientes como de los controles para cada SNP de cada miRNA.

3.7 Análisis estadístico

Una vez realizado el genotipado, se calcularon las frecuencias genotípicas de los pacientes y controles, para poder así realizar un análisis estadístico de cada SNP de cada miRNA. Gracias a los datos obtenidos, se pudo determinar si las variaciones encontradas conferían mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad de la esclerosis múltiple o no.

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

4.1 Poner a punto la RFLP de los dos miRNA y separación de fragmentos en geles de agarosa

4.1.1 miR3656 (MluCI)

La amplificación del gen que codifica el miR3656 se dio de manera adecuada en los 11 controles positivos, pero en el caso de las muestras 3, 4 y 10, se obtuvieron bandas más débiles. Estas tres muestras tenían el mismo genotipo (homocigotos para C), pero como no eran los únicos que cumplían con esta característica, se prosiguió a trabajar con las 9 muestras restantes con las que se obtuvo una buena amplificación. En el caso del control negativo, no se observó ninguna contaminación, por lo que la PCR se consideró válida.

Con el **primer RFLP** (0.5 μ l enzima, 5 μ l producto PCR, 37°C y 3 h) que se realizó no se consiguieron buenos resultados. El patrón que se identificó para la muestra número dos fue el de un homocigoto para T, mientras que en los datos guardados aparecía que esta muestra era heterocigoto para el SNP de este miRNA. Por lo tanto, las condiciones de esta RFLP no fueron buenas, ya que la enzima no cortó bien en dichas condiciones.

A partir de este punto, en vez de trabajar con 9 controles positivos se decidió trabajar únicamente con tres, para evitar el gasto innecesario de las muestras de ADN de los controles positivos: muestra número 1 (homocigoto para C), muestra número dos (homocigoto para T) y muestra número siete (heterocigoto).

Con las condiciones del **segundo RFLP** (0.5 μ l enzima, 5 μ l producto PCR, **toda la noche** y 37 °C) tampoco se obtuvieron buenos resultados. Observando el gel se determinaba que las tres muestras tenían el mismo genotipo, cosa que no era así, por lo que se tuvo que realizar otra RFLP con nuevas condiciones (**1 μ l enzima**, 5 μ l producto PCR, toda la noche y 37°C). En este caso, los genotipos que se identificaron fueron los correctos, pero las bandas eran muy débiles.

En las especificaciones de la enzima MluCI indicaba que la relación entre enzima/ADN tenía que ser 1:1 (1 μ l enzima/1 μ g ADN) y hasta entonces, las RFLP que habíamos realizado tenían mayor cantidad de ADN que de enzima, ya que antes de realizar la PCR la

concentración de ADN era de 100 ng/ μ l, es decir, **0.1 μ g/ μ l de ADN**, y la cantidad de producto PCR que añadíamos era 5 μ l, por lo que estábamos utilizando más de 0.5 μ g de ADN en cada RFLP:

- Primer RFLP: 0.5 μ l enzima/ más de 0.5 μ g de ADN/3h
- Segundo: 0.5 μ l enzima/ más de 0.5 μ g de ADN/ toda la noche
- Tercero: 1 μ l enzima/ más de 0.5 μ g de ADN/ toda la noche

Las condiciones de la tercera RFLP eran las que más se ajustaban a las de las especificaciones y con las que obtuvimos buenos resultados, pero bandas débiles. Por ello, se realizó una cuarta RFLP (0.5 μ l enzima, **1 μ l producto PCR** (más de 0.1 μ g de ADN), 3 h y 37 °C) con las mismas condiciones que la tercera, pero en este caso disminuyendo la cantidad de producto PCR, ya que sale más rentable disminuir la cantidad de ADN que aumentar la cantidad de enzima. Esa vez, la intensidad de las bandas fue adecuada y los genotipos coincidieron. A pesar de obtener estos resultados, se realizó una última prueba (**0.1 μ l enzima**, 1 μ l producto PCR (más de 0.1 μ g de ADN), toda la noche y 37 °C) para ver si la enzima funcionaba en menores cantidades, sin cumplir del todo con la relación 1:1 enzima/ADN. Analizando los resultados, se demostró que la enzima no cortaba en estas cantidades, por lo que fueron las condiciones de la cuarta RFLP las que se determinaron como válidas y las que a posteriori se utilizaron para realizar las RFLP de los 285 pacientes y 285 controles.

4.1.2 miR3155a/miR3155b (NlaIV)

La amplificación de este gen se realizó sin ningún problema obteniendo buenos resultados, por lo que se procedió a realizar la **primera RFLP** (0.1 μ l de 1000 unidades/mL de enzima, 1 μ l producto PCR, **toda la noche**, 37°C) utilizando los productos PCR de los tres controles positivos anteriormente amplificados, y un control negativo (H₂O).

Después de realizar la separación de los fragmentos en un gel de agarosa de 3%, no se observaron todas las bandas que se tenían que visualizar (no aparecieron las bandas de bajo peso molecular). Por ello, en la **segunda RFLP** (0.5 μ l de 1000 unidades/mL de enzima, 1 μ l producto PCR, **3h**, 37°C) se decidió disminuir el tiempo de incubación, pensando que la inespecificidad de la enzima podía haber aumentado a causa del tiempo de incubación que se utilizó en el ensayo anterior (toda la noche). En este caso, se realizaron dos fotos, una, al cabo de 20 minutos de haber cargado las muestras, para ver a ver si se podían distinguir las bandas de menor peso molecular, y otra, al cabo de 50 minutos. En la primera foto, no se logró observar ninguna banda pequeña, pero, en la segunda, sí. Aún y todo, éstas tenían muy poca intensidad.

Las especificaciones de la enzima NlaIV indicaba que la enzima era eficaz cuando se cumplía la relación 10:1 enzima/ADN (10 unidades de enzima para 1 μ g de ADN). Nosotros hasta ahora habíamos añadido 0.1 y 0.5 μ l de 1000 unidades/mL de enzima, es decir, **0.1 y 0.5 unidades de enzima**; y 1 μ l de producto PCR, es decir, **más de 0.1 μ g de ADN**, teniendo en cuenta que la concentración del ADN era de 100 ng/ μ l antes de realizar la PCR.

Por lo que en las RFLP que habíamos realizado la cantidad de ADN era mayor o más o menos igual que la de la enzima añadida, mientras que en el panfleto ponía que la cantidad de la enzima tenía que ser 10 veces mayor que la del material genético. Por ello, en la **tercera RFLP** (1 μ l de 1000 unidades/mL de enzima (**1 unidad de enzima**), 3 μ l producto PCR (**más de 0.3 μ g de ADN**), 3h, 37°C) que realizamos aumentamos la cantidad de la

enzima respecto al del ADN. No obstante, las bandas de abajo obtenidas en este caso seguían teniendo poca intensidad.

Ante la dificultad de conseguir buenos resultados, se decidió aumentar la cantidad del material genético, para analizar a ver si de esta manera se conseguía obtener unos resultados más claros, variando también la cantidad de la enzima:

- **Cuarta RFLP: 0.1 µl** de 1000 unidades/mL de **enzima/ 10 µl producto PCR**
- **Quinta RFLP: 0.5 µl** de 1000 unidades/mL de **enzima/ 10 µl producto PCR**
- **Sexta RFLP: 1 µl** de 1000 unidades/mL de **enzima/ 10 µl producto PCR**

*En los tres casos se realizó una incubación de tres horas con una temperatura constante de 37°C.

Una vez realizadas las tres RFLP, los productos se cargaron en un gel de agarosa de 3%. En los tres casos, la obtención de bandas y sus intensidades fueron adecuadas, pero, analizando los resultados, se determinó que las condiciones de la quinta RFLP eran las óptimas para trabajar a posteriori con las muestras de los 285 pacientes y 285 controles, ya que la claridad de las bandas de la quinta RFLP era mayor que las de las otras dos, por lo que se diferenciaban mejor los diferentes genotipos.

4.2 Genotipado de pacientes y controles

4.2.1 PCR y separación de fragmentos en geles de agarosa de los dos miRNA

4.2.1.1 miR3656

Las seis PCR que se realizaron para amplificar el gen del miR3656 de todos los pacientes (n=285) y controles (n=285), obtuvieron resultados satisfactorios. Los controles negativos no presentaron ninguna contaminación y el tamaño de las bandas obtenidas coincidía con el del amplicón (408 bp) previamente observado en los controles positivos a la hora de poner a punto las RFLP (Figura 2).

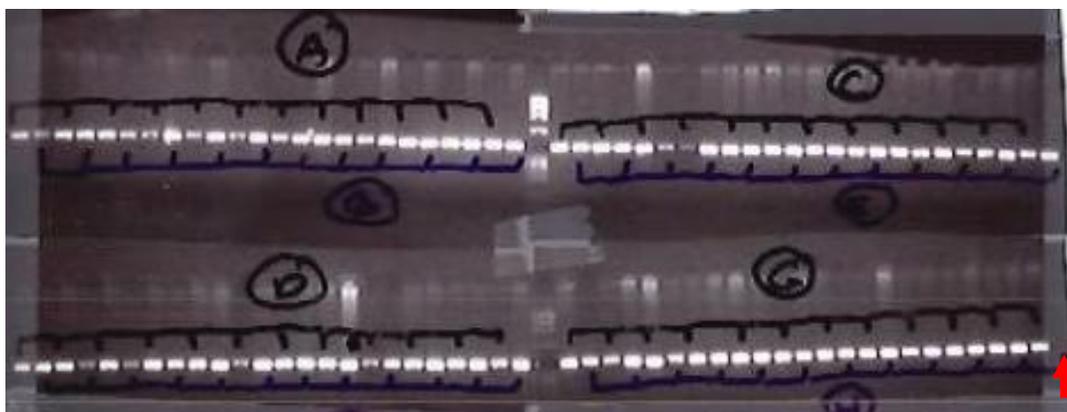


Figura 2. Esta imagen muestra los resultados de la amplificación del gen del miR3656 de una de las seis PCR realizadas. La flecha roja remarca que no ha habido ninguna contaminación en el pocillo del agua (control negativo), por lo que la PCR se determinó como válida.

4.2.1.2 miR3155a/miR3155b

En el caso de la amplificación de este miRNA, en los seis PCR realizados (pacientes y controles) se consiguieron buenos resultados, tal y como se puede apreciar en la siguiente imagen (Figura 3). No se observó ninguna contaminación en los pocillos del agua (controles negativos), y el tamaño de las bandas generadas coincidía con el anteriormente observado en la puesta a punto de las RFLP, por lo que se decidió continuar con el trabajo.

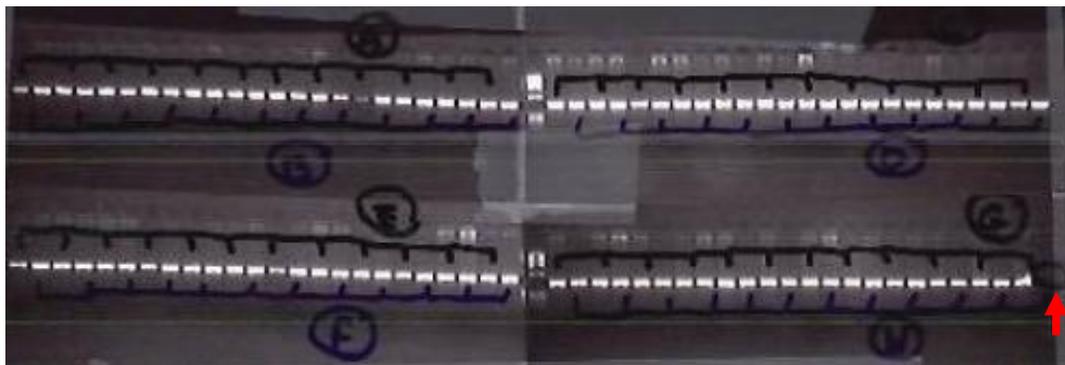


Figura 3. Esta imagen nos muestra los resultados de la amplificación del gen del miR3155a/miR3155b de una de las seis PCR llevadas a cabo. En este caso también, la flecha roja remarca que no ha habido ninguna contaminación en el pocillo del agua (control negativo).

4.2.2 RFLP e identificación de patrones en geles de agarosa

4.2.2.1 miR3656

Las seis RFLP que se realizaron posteriormente a la amplificación del gen del miR3656, tanto de los controles como de los pacientes, dieron buenos resultados, pudiendo así realizar su genotipado respecto al SNP que se encuentra en este miRNA (Figura 4).

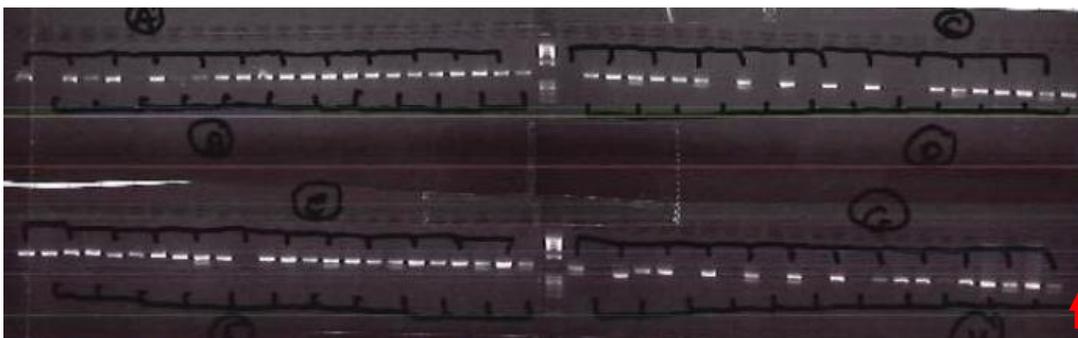


Figura 4. Uno de los resultados obtenidos al realizar la RFLP y la identificación de patrones mediante electroforesis del miR3656. La flecha roja remarca que no ha habido ninguna contaminación en el pocillo del agua (control negativo).

Teniendo en cuenta estos datos, se realizó el genotipado tanto de los 285 pacientes como de los 285 controles para el SNP de este miRNA, a pesar de que algunos de ellos no se

podieron genotipar debido a la evaporación que sufrieron algunas de las muestras a la hora de llevar a cabo o bien la PCR o bien la RFLP. He aquí los resultados que se consiguieron:

Tabla 4. Resultados obtenidos tras realizar el genotipado de los pacientes y controles.

	CC	CT	TT	SUMA
CONTROLES	223	51	3	277
PACIENTES	198	50	4	252
TOTAL	421	101	7	529

Como se puede observar en esta tabla, en total se evaporaron 41 muestras, 33 en el caso de los pacientes y 8 en el de los controles. Por lo que a posteriori, a la hora de llevar a cabo el análisis estadístico, los cálculos se realizaron partiendo de 529 muestras y no de 570.

4.2.2.2 miR3155a/miR3155b

En cuanto a este miRNA, las RFLP que se realizaron también obtuvieron buenos resultados, pudiendo así realizar el genotipado del SNP que se localiza en este gen, tanto en el caso de los pacientes como en el de los controles (Figura 5).

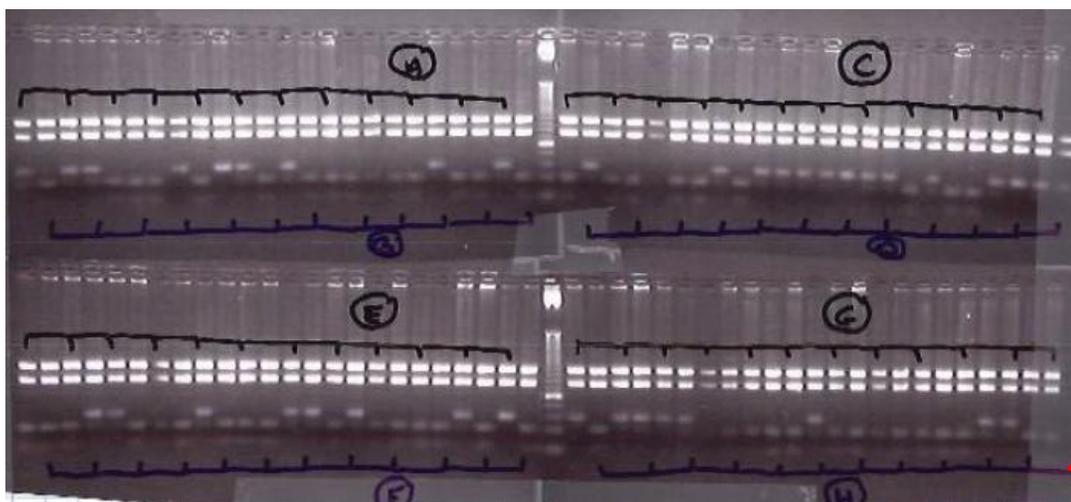


Figura 5. Figura representativa de las RFLP realizadas tanto con los pacientes como con los controles. La fecha roja indica que el pocillo del agua (control negativo) no está contaminado, por lo que la RFLP se consideró como buena.

Teniendo en cuenta estos datos, se realizó el genotipado de los 285 pacientes y de los 285 controles. En este caso, como en el anterior, también se evaporaron algunas de las muestras a la hora de realizar la PCR o la RFLP, por lo que no se pudo realizar el genotipado de las 570 muestras. He aquí los resultados que se obtuvieron respecto al SNP de este miRNA:

Tabla 5. Resultados del genotipado del SNP del miR3155a/miR3155b en los pacientes y controles a estudio.

	CC	CT	TT	SUMA
CONTROLES	163	90	26	279
PACIENTES	143	79	16	238
TOTAL	306	169	42	517

Como se puede observar, 53 muestras se evaporaron, 6 de ellas en el caso de los controles y 47 en el de los pacientes. De modo que a la hora de realizar el análisis estadístico, se realizaron los cálculos con 517 muestras, en vez de con 570.

4.3 Análisis estadístico

Introduciendo los datos obtenidos en el sistema SAS, se realizó el análisis estadístico para cada miRNA. En el caso del miR3656, el sistema indicaba que no era fiable realizar el cálculo del Chi-cuadrado, ya que para llevar a cabo este test es necesario que todas las celdas tengan una frecuencia esperada mayor que 5, y en este caso, el 33% tenía una cantidad menor que dicho número ($X^2_p = 0.4569$, $p = 0.7958$). Por ello, en este caso se realizó el test exacto de Fisher con el que obtuvimos un valor de p parecido, $p = 0.791$.

En cuanto al miR3155, como todas las celdas tenían una cantidad mayor que 5 se pudo realizar sin ningún problema el cálculo del Chi-cuadrado ($X^2_p = 1.1600$, $p = 0.5599$).

Como conclusión, en ambos casos se determina que las diferencias entre las frecuencias genotípicas de los pacientes y controles no es suficientemente relevante para que tengan una significancia estadística, por lo que la hipótesis de este proyecto queda anulada, ya que las variaciones (SNP) encontradas en los dos miRNA no están sobre representadas de manera significativa en la población de esclerosis múltiple. Por ello, determinamos que estas dos variaciones no confieren una mayor susceptibilidad a padecer dicha enfermedad, por lo que habrá que seguir trabajando en la búsqueda de nuevos factores genéticos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Tullman, M. J. (2013). Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis. *The American Journal of Managed Care*, 19(2 Suppl), S15–20.
2. Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675–7.
3. Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321), 223–31.
4. Pascual Garvi, J. M., González Llanos, F., Prieto Arribas, R., Cerdán, S., & Roda, J. M. [Blood brain barrier: development of a structure which supports the functional heterogeneity of the central nervous system]. *Revista de Neurología*, 38(6), 565–81.
5. Sallusto, F., Impellizzeri, D., Basso, C., Laroni, A., Uccelli, A., Lanzavecchia, A. y Engelhardt, B. (2012) T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev*, 248, 216-227.
6. Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual Review of Immunology*, 23, 683–747.
7. Waxman, S. G. (2006). Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(12), 932–41.
8. Vollmer, T. (2007). The natural history of relapses in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 256 Suppl , S5–13.

9. Franklin, R. J. M., ffrench-Constant, C., Edgar, J. M., & Smith, K. J. (2012). Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 8(11), 624–34.
10. Fancy, S. P. J., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J. M., & Rowitch, D. H. (2011). Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annual Review of Neuroscience*, 34, 21–43.
11. Crawford, A. H., Chambers, C., & Franklin, R. J. M. (2013). Remyelination: the true regeneration of the central nervous system. *Journal of Comparative Pathology*, 149(2-3), 242–54.
12. Villoslada, P. (2010) Esclerosis Múltiple. Marge Médica Books.
13. Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., ... Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), 214–9.
14. Patsopoulos, N.A., Esposito, F., Reischl, J., Lehr, S., Bauer, D., Heubach, J., Sandbrink, R., Pohl, C., Edan, G., Kappos, L., y cols. (2011) Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol*, 70, 897-912.
15. Beecham, A.H. y Patsopoulos, N.A. y Xifara, D.K. y Davis, M.F. y Kempainen, A. y Cotsapas, C. y Shah, T.S. y Spencer, C. y Booth, D. y Goris, A., y cols. (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*, 45, 1353-1360.
16. BARTEL, D. (2004). MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297.
17. Baltimore, D., Boldin, M. P., O’Connell, R. M., Rao, D. S., & Taganov, K. D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature Immunology*, 9(8), 839–45.
18. Gangaraju, V. K., & Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2), 116–25.
19. Inui, M., Martello, G., & Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4), 252–63.
20. Li, X., & Jin, P. (2010). Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(5), 329–38.