

## DISCUSSIÓ GENERAL

El tema central d'aquesta tesi ha estat l'anàlisi de les variants en el gen receptor domini discoidina 1 (*DDR1*) en l'esquizofrènia i de les eines necessàries per l'estudi d'aquesta variabilitat. En una primera part del treball, es va realitzar una anàlisi mutacional en *DDR1* en una mostra de malalts d'esquizofrènia i es va explorar la possibilitat que algunes d'aquestes s'associessin a la malaltia. La segona part va tenir un enfocament més metodològic i va consistir en desenvolupar i optimitzar un nou mètode de genotipatge, *eTag Multiplex Invader*, per l'anàlisi simultània d'SNPs.

L'aproximació a l'estudi de *DDR1* en l'esquizofrènia es va abordar mitjançant un estudi d'associació, amb la hipòtesi que les variants estudiades en *DDR1* estarien directament implicades en la malaltia o bé en desequilibri de lligament amb la variant de susceptibilitat. El disseny experimental concret va ser el d'un estudi d'associació de casos i controls. Aquest disseny ens era més convenient pel reclutament dels participants, tant de casos com de controls, que el d'estudi de nuclis familiars. Com ja s'ha comentat anteriorment, hi ha diversos factors limitants a tenir en compte en aquest tipus d'estudi, com són: l'estratificació poblacional, mida de la mostra insuficient o una descripció no acurada de la malaltia o tret d'estudi. Tots poden emmascarar els resultats derivats i en molts casos, tal com s'ha demostrat en la literatura, han estat la causa de falses associacions positives.

Som conscients de la mancança d'una eina de diagnòstic acurada per l'esquizofrènia. En el nostre estudi, el fet de que només s'inclouguessin pacients de la unitat de hospitalització de llarga durada garanteix, en certa manera, que els diagnòstics són consolidats. Es a dir, es tracta de pacients amb una evolució llarga de la malaltia que han estat estudiats durant anys per diferents especialistes. En el moment d'incloure'ls a l'estudi, un psiquiatra va verificar els diagnòstics. A més, el fet de tenir en compte d'altres variables clíniques (com per exemple, l'edat d'inici, el tipus d'inici i d'evolució de la malaltia), en l'anàlisi de les dades reforça els resultats en les relacions genotip-fenotip, tal com el nostre grup s'ha trobat en treballs anteriors (Martorell *et al*, 2001). D'altra banda, del grup d'individus controls, es van excloure aquells participants amb antecedents personals per patologia psiquiàtrica o amb una puntuació positiva pel qüestionari Golderg de rastreig de patologia psiquiàtrica en població general.

Es va procurar de controlar la presència d'estratificació poblacional mitjançant dues mesures. Per una banda, per control demogràfic com criteri d'inclusió/exclusió i per aparellament de casos i controls amb un mateix origen geogràfic i ètnic. Per una altra, per control de l'estratificació genètica valorat segons el mètode de Pritchard i col.laboradors (Pritchard *et al*, 2000). Amb aquesta última evidenciem que la mostra estudiada era genèticament homogènia.

En el primer estudi, la utilització de la tècnica de la seqüenciació en *pools* o barreges de 10 mostres de DNA va permetre identificar un total de 17 variants: 16 SNPs (2

no-sinònims, 8 sinònims, 6 intrònics) i una deleció (IVS4-18delCT), de les quals 7 no han estat descrites anteriorment (Figura 10). Atès les limitacions del nostre grup, abans d'estudiar en detall totes les variants identificades, es va decidir de valorar l'associació d'algunes d'aquestes en una mostra de casos i controls (Estudi 2). L'Estudi 1 va ser, doncs, merament descriptiu. A més, la determinació de les freqüències al·lèliques de les diferents variants identificades no va ser possible ja que els resultats de la seqüenciació no eren quantificables. Una observació a destacar fou que dels 40 SNPs dipositats a la dbSNP i que es localitzen en les regions de *DDR1* analitzades, només se'n van detectar 10. Aquest fet suggeriria que o bé la resta de SNPs són poc freqüents (freqüència menor al 10% per l'al·lel minoritari), i no foren detectats donada la sensibilitat de la tècnica emprada, o bé no estaven presents en la mostra de malalts d'esquizofrènia estudiada. D'altra banda, la majoria d'aquests SNPs han estat identificats *in silico* i no han estat validats per genotipatge en múltiples mostres i, per tant, està per determinar si es tracta de veritables SNPs.

En el segon estudi, es va valorar si polimorfismes en el *DDR1* estaven associats a la incidència d'esquizofrènia en una mostra de població espanyola. Es van analitzar un total de 5 SNPs, 4 ubicats en *DDR1* i un en *GTF2H4* (Figura 16). Atès la proximitat física dels diferents marcadors analitzats, s'esperava trobar un fort LD entre totes les parelles de *loci* estudiades. Aquest no va ser el cas per la variant N502S. A més, el seu patró de LD fou diferent entre ambdós grups d'estudi. En malalts, l'associació d'aquesta variant amb la resta dels SNPs analitzats es trobava debilitada. Mentre que en controls, es mantenia amb un fort LD amb els SNP1, SNP2 i SNP4 i moderat amb l'SNP5. Aquesta fet explicava, en part, l'aparició d'un major nombre d'haplotips rars (freqüència menor a 0.5%) en el grup de malalts i les diferències estadísticament significatives observades en la distribució de les freqüències haplotípiques entre ambdós grups d'estudi. Tant en malalts com en controls, es va observar que més d'un 93% de la distribució haplotípica es concentrava en tan sols 3 combinacions al·lèliques (haplotips 1, 8, 16), de les quals l'haplotip majoritari estava compost per l'al·lel més comú de cada locus. La resta dels haplotips es trobaren amb freqüències menors a 1.5%.

La debilitació del LD entre parelles de *loci* molt properes en el cromosoma es pot explicar per: i. un fenomen de recombinació; ii. una mutació recurrent o iii. la conversió gènica. D'acord amb les dades publicades, *DDR1* es localitzaria en un bloc haplotípic o de LD contingut entre dos punts calents majors de recombinació (Cullen *et al*, 2002), la qual cosa explicaria l'observació de 3 haplotips majoritaris en la regió estudiada. En aquest treball desconeixem el motiu pel qual el LD s'ha perdut per la variant N502S en el grup de malalts. Ens crida l'atenció el fet d'haver observat aquesta variant només en heterozigosi. No es va detectar cap individu homozigot en casos ni en controls. Es podria especular que o bé es tracta d'una mutació nova o bé es tracta d'una variant que en homozigosi és inviable, la qual cosa explicaria perquè tot i estar en equilibri de Hardy-Weinberg, no la detectem ni en casos ni en controls.

El fet que els resultats de l'anàlisi individual dels SNPs no mostressin cap contribució al·lèlica o genotípica amb la malaltia o amb cap de les variables clíniques considerades i si que trobessim diferències estadísticament significatives en comparar les freqüències haplotípiques, posava de manifest quelcom ben establert que és que l'avaluació de la combinació d'al·lels o haplotips és més informativa que l'anàlisi independent dels marcadors. Malgrat no s'ha pogut trobar una correlació directa entre cap dels haplotips estimats i la malaltia, els resultats d'aquest treball semblen apuntar a que d'altres variants en el gen *DDR1* o en regions flanquejants podrien tenir un paper en l'etiologia de l'esquizofrènia.

A la llum dels resultats de l'Estudi 2, l'anàlisi bioinformàtica i funcional de la resta de variants identificades en l'Estudi 1 pot ser molt informativa i aportar noves dades. Sis d'aquestes variants es localitzaren en regions intròniques i es desconeix si tenen cap efecte en els mecanismes de *splicing* o en la maduració del transcrit. Així, per exemple, tot i que la deleció IVS4-18delCT no va ser estudiada en detall, els tres individus heterozigots identificats per aquesta deleció presentaren el mateix diploip, constituït pels haplotips 1 i 8. Serà d'interès analitzar aquestes variants i ampliar l'estudi d'haplotips en futurs estudis. D'altra banda, l'Estudi 1 va excloure l'anàlisi mutacional de les regions reguladores de l'expressió gènica, com regions promotores i les regions 5' i 3' UTR. Serà també interessant explorar la variabilitat d'aquestes regions i estudiar el seu efecte en l'expressió de *DDR1*.

En el tercer estudi es va explorar la possibilitat de combinar els fluorocroms *eTag reporter* amb la tècnica Invader per l'anàlisi de múltiples SNPs. Aquest és el primer treball on s'ha demostrat que el mètode anomenat *eTag Multiplex Invader SNP Assay* és una aproximació vàlida de genotipatge. Els resultats presentats van demostrar que aquest mètode és viable per l'anàlisi de SNPs a partir de DNA amplificat per PCR. En concret, es van desenvolupar un assaig per l'anàlisi simultània de 10 SNPs. En comparació amb la tècnica Invader, comporta dos passos addicionals: l'amplificació del DNA genòmic per PCR i la separació i detecció dels *eTag reporter* mitjançant la tècnica LIF-CE. No obstant, totes dues tècniques són d'ús general i rutinari en els laboratoris de genètica. Per tant, la posada punt del mètode *eTag Multiplex Invader* no requereix d'una instrumentació o infraestructura específica.

Malgrat demostrar que els *eTag reporter* es podien emprar per l'anàlisi simultània de SNPs per combinació amb la tècnica Invader, ACLARA BioSciences Inc. va decidir no continuar amb el projecte per una qüestió de mercat. Les tècniques de genotipatge d'SNPs a l'abast dels investigadors són múltiples, molt variades i algunes d'elles estan molt ben arrelades en la comunitat científica. Per una empresa petita com ACLARA BioSciences Inc., introduir un nou mètode en un mercat tan competitiu, com el de la detecció d'SNPs, era una operació d'alt risc que no es va voler assumir. Actualment, la prioritat de l'empresa rau en la utilització dels *eTag reporter* per la detecció simultània de proteïnes (de secreció o superfície cel·lular), de proteïnes

modificades (fosforilació) o d'interaccions entre elles (homo o heterodimerització de receptors, formació de complexos entre receptor i proteïnes acobladores).

En síntesi, en aquest treball s'han estudiat un grup de variants en el gen *DDR1* i s'ha observat que la distribució dels haplotips resultants és estadísticament diferent en pacients amb esquizofrènia que amb controls. En concret, en el grup de pacients s'observa un debilitament del LD en l'haplotip format per les variants analitzades. No podem concloure, amb els resultats recollits en aquest treball, si realment hi ha una variant en l'entorn *DDR1* de susceptibilitat per l'esquizofrènia o bé es tracta d'un artefacte. Estudis futurs ens ajudaran a esbrinar-ho.

## CONCLUSIONS

1. La tècnica de la seqüenciació en *pools* o mescles de 10 mostres de DNA és adequada per la identificació de polimorfismes d'un únic nucleòtid, malgrat la limitació observada per la detecció de mutacions rares o poc freqüents.
2. Es troben diferències estadísticament significatives en la distribució dels haplotips en la regió del gen receptor domini discoidina 1 (*DDR1*) entre els malalts d'esquizofrènia i individus controls estudiats. S'observa una major diversitat haplotípica, deguda a la presència d'haplotips rars o poc freqüents en el grup de malalts, suggerint la presència d'altres variants a *DDR1* o zones flanquejants les quals podrien tenir un efecte en l'etiologia de l'esquizofrènia. Podria ser que aquesta situació només s'acomplís per un grup dels malalts.
3. S'ha descartat la presència d'estratificació genètica en la mostra estudiada mitjançant l'aplicació del mètode descrit per Pritchard i col.laboradors.
4. La combinació dels *eTag reporter* amb la tècnica Invader resulta en un nou mètode de genotipatge acurat, de ràpid desenvolupament i propietats multiplicadores el qual no requereix d'una infraestructura o instrumentació específica.

## PERSPECTIVES FUTURES

L'estudi de la possible funció del gen *DDR1* en l'etiologia de l'esquizofrènia és una línia d'investigació en marxa en el nostre grup. Malgrat som conscients que aquesta hipòtesi de treball és arriscada, els resultats de l'estudi genètic que es presenten en aquest treball, conjuntament amb els dels estudis d'expressió que demostren la presència de *DDR1* en oligodendròcits (resultats en fase de publicació), són encoratjadors i ens conviden a continuar investigant.

En un futur pròxim i com a continuació dels resultats que s'han presentat en aquesta tesi, ens plantegem els següents objectius:

- Estudiar la deleció IVS4-18delCT en una mostra de malalts d'esquizofrènia i individus controls.
- Analitzar la presència de mutacions en les regions 5' i 3' UTR de *DDR1* en una mostra de malalts d'esquizofrènia.
- Determinar els haplotips moleculars de la regió del gen *DDR1* en nuclis familiars.
- Caracteritzar la variant N502S i determinar l'efecte del canvi 502S sobre la funcionalitat de la proteïna.