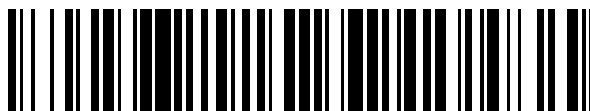


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 573**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2007** **E 07766636 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013** **EP 2013365**

54 Título: **Uso de ornitina transcarbamilasa (OTC) como marcador para el diagnóstico de daños cerebrales**

30 Prioridad:

18.04.2006 EP 06290619

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2014

73 Titular/es:

GENOSCREEN (50.0%)
Campus de l'Institut Pasteur de Lille 1, rue du
Professeur Calmette
59000 Lille, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)

72 Inventor/es:

AMOUYEL, PHILIPPE;
LAMBERT, JEAN-CHARLES y
FERREIRA, STÉPHANIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 449 573 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de ornitina transcarbamilasa (OTC) como marcador para el diagnóstico de daños cerebrales

La presente invención pertenece al campo de las enfermedades cerebrales, y proporciona marcadores y procedimientos novedosos para diagnosticar una alteración cerebral en un individuo, especialmente en pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. La presente invención proporciona también herramientas para evaluar la probabilidad de que un individuo desarrolle la enfermedad, así como una diana para identificar nuevos fármacos para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial compleja y una causa importante de demencia entre los ancianos. Aproximadamente un 5 % de las personas de 65 años o más están afectadas por la EA y la prevalencia aumenta abruptamente a 19 % después de los 75 años y a 47 % después de los 85. Actualmente, existen más de 4 millones de casos de EA en los EE.UU., 850.000 en Francia y 12-14 millones en todo el mundo. El grupo de 85 años y más, en que casi un 50 % está afectado por alguna forma de demencia, es uno de los segmentos de más rápido crecimiento de las poblaciones europeas y estadounidense. Sin embargo, la modelización sugiere que un retraso de 5 años podría reducir la prevalencia de demencia un 50 %, permitiendo un control potencial de esta dramática pandemia. Dicha posibilidad plantea dos temas esenciales: (i) diagnóstico temprano y (ii) eficacia de la terapia.

Hasta la fecha, aunque se han realizado importantes mejoras, sigue siendo difícil asignar un diagnóstico en la etapa muy temprana de la enfermedad. Además, no existe un tratamiento curativo, aunque están disponibles algunos tratamientos sintomáticos de las funciones cognitivas, principalmente inhibidores de acetilcolinesterasa (3 moléculas actualmente registradas) y, más recientemente, un antagonista del receptor de NMDA. Sin embargo, todo este arsenal terapéutico, cuando los pacientes pueden beneficiarse del mismo, permite como máximo un retraso en la inevitable dependencia resultante del agravamiento de la enfermedad.

Como consecuencia, el diagnóstico temprano y el arsenal terapéutico están estrechamente ligados. Para proponer un tratamiento eficaz, parece esencial establecer un diagnóstico en la etapa más temprana de la enfermedad, o incluso detectar los primeros signos de la patología a nivel subclínico.

En los sujetos que se hacen mayores, se observan habitualmente síntomas de falta de memoria y cognitivos, pero no están necesariamente asociados a un declive cognitivo patológico. Estos síntomas pueden ser un simple indicador de un problema aislado y menor o, por el contrario, indicar una alteración cognitiva y patológica objetiva. Dentro de este marco, se ha propuesto el concepto de "deterioro cognitivo leve" o DCL para caracterizar a los sujetos localizados en la zona de transición entre el envejecimiento normal y la demencia. Estos pacientes presentan un declive objetivo de sus rendimientos cognitivos sin satisfacer los criterios clínicos de demencia. El índice de conversión de estos pacientes es de aproximadamente 14 % al año, y un 50 % de los casos de DCL habrá desarrollado demencia tres años después. Muy pocos trabajos permiten tener una visión a largo plazo, pero una parte no despreciable de estos casos de DCL no desarrollará demencia (aproximadamente un 20 %) 5 años después.

A pesar de su frecuencia, la base genética molecular de las enfermedades neurodegenerativas no está clara. Respecto a la enfermedad de Alzheimer, está establecido que existen dos tipos de EA: (i) EA familiar (EAF), que cursa en familias, y (ii) EA esporádica, en que no está presente un historial familiar obvio. Las formas de inicio temprano familiares de EA dan cuenta de menos de un 5 % del número total de casos, y estas se han ligado a mutaciones en tres genes diferentes: el gen de proteína precursora amiloide (*APP*) en el cromosoma 21, el gen de presenilina 1 (*PS1*) en el cromosoma 14 y el gen de presenilina 2 (*PS2*) en el cromosoma 1 (Cruts y Van Broeckhoven, 1998). La etiología de la EA esporádica de inicio tardío es más compleja, con la posible implicación, e interacción entre ellos, de factores ambientales y numerosos genes. La apolipoproteína E (*APOE*), especialmente el alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, se ha establecido como un fuerte marcador de la propensión que da cuenta de aproximadamente un 20 % del riesgo genético en EA de inicio tardío (Kamboh, 2004). Sin embargo, como el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* no es necesario ni suficiente por sí solo para el desarrollo de EA, es probable que otros factores genéticos y/o ambientales, que actúan solos o junto con $\epsilon 4$ de *APOE*, puedan modificar el riesgo de EA. Recientemente, estudios de ligamiento del genoma completo o desequilibrio de ligamiento (DL) sobre EA de inicio tardío han proporcionado pruebas de la existencia de múltiples presuntos genes para EA en varios cromosomas. Sin embargo, la localización general de los presuntos genes de EA en un cromosoma dado cubre una amplia región. Además, una de estas regiones puede contener también varios genes de interés. Por lo tanto, no está claro si estos descubrimientos indican la existencia de múltiples genes en un cromosoma, o si representan una variación casual dentro de la región de interés, porque las estimaciones de localización de genes basada en estudios de ligamiento pueden variar en 30 cM o más para trastornos complejos (Roberts *et al.*, 1999).

Para priorizar la selección de genes candidatos localizados en estas regiones de interés, un procedimiento apropiado y consistente sería combinar los datos de información del mapa genético con los datos de perfil de expresión génica para una identificación rápida de los genes. Esta suposición surge de dos observaciones importantes:

(i) la expresión de numerosos genes se modifica durante la etiología de EA (Blalock *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2002; Colangelo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Loring *et al.*, 2001);

(ii) así como variaciones cualitativas (concretamente, mutaciones de codificación) en genes ya implicados en la EA y variaciones cuantitativas en la expresión de estos mismos genes se ha mostrado también que son determinantes genéticos de la enfermedad. Por ejemplo, los polimorfismos funcionales en las secuencias promotoras de genes *APOE*, *PS1* y *PS2* se han asociado a un riesgo aumentado de desarrollo de EA (Lambert *et al.*, 2002; Riazanskaia *et al.*, 2002; Theuns *et al.*, 2000). Se ha discutido una implicación similar de APP (Lahiri *et al.*, 2005).

Por consiguiente, los inventores plantearon la hipótesis de que los genes que exhiben una expresión diferencial entre pacientes y controles, y localizados en una de las regiones de interés definidas por barridos genómicos anteriores, podrían constituir genes candidatos potenciales para EA. Para desarrollar el enfoque de "convergencia genómica", desarrollaron una micromatriz casera para cribar 2741 marcos abiertos de lectura (ORF) contenidos en los loci asociados al riesgo (en nueve cromosomas diferentes) identificados anteriormente en estudios de barrido genómico (Lambert *et al.*, 2003). Este perfil de expresión de tejidos cerebrales en 12 controles y 12 pacientes con EA les conduce a seleccionar 106 genes expresados diferencialmente. Entre estos 106 genes modulados, 11 se localizaban en el cromosoma X.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que uno de estos genes se sobreexpresa en gran medida en el cerebro de casos de EA, mientras que no se expresa en el cerebro de los controles. Este gen es el gen de ornitina transcarbamilasa (*OTC*) localizado en Xp21.1. La *OTC* es una enzima clave del ciclo de la urea que no es funcional en el "cerebro normal" (Felipo y Butterworth, 2002; Wiesinger, 2001).

En sujetos sanos, la *OTC* se expresa casi exclusivamente en mitocondrias hepatocelulares y se considera como un marcador específico del hígado. Se ha mostrado que el nivel sérico de esta proteína aumentaba en pacientes con trastornos hepáticos como hepatitis, cirrosis y cáncer. Aunque no se expresa en el cerebro de sujetos sanos, la deficiencia de esta enzima puede conducir a trastornos neurológicos. Es más, uno de los síntomas habituales de deficiencia de ornitina transcarbamilasa (que es muy heterogénea en su presentación) es el coma hiperamoniémico (Gordon, 2003).

Los inventores estudiaron extensamente el gen de *OTC* en individuos con EA y de control. También estudiaron el nivel de actividad de *OTC* presente en el líquido cefalorraquídeo de sujetos que padecen DCL, demencia con EA y sin EA y sus resultados, dados a conocer en la parte experimental a continuación, demuestran que el gen *OTC*, así como la expresión de *OTC* en el cerebro, son marcadores relevantes de la propensión a y/o el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer y otras patologías cerebrales.

Es un primer aspecto de la presente invención un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de una alteración cerebral en un individuo, que comprende una etapa de detección (y/o cuantificación) de ornitina transcarbamilasa (*OTC*) en una muestra de líquido cefalorraquídeo de dicho individuo. En el contexto de la presente invención, una "alteración cerebral" designa cualquier clase de neurodegeneración cerebral, y especialmente demencia.

Es un interés particular del procedimiento según la presente invención que posibilita el diagnóstico o detección de una alteración cerebral en etapas muy tempranas de una enfermedad cerebral, e incluso a nivel subclínico, concretamente, antes de la aparición de síntomas claros de dicha enfermedad (con respecto a las capacidades cognitivas y el comportamiento del sujeto).

Cuando se efectúa el procedimiento según la invención, el médico será capaz, en ciertos contextos clínicos, de diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa o, más precisamente, de establecer un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o demencia sin EA. Se entiende por "demencia sin EA" cualquier clase de demencia que no esté causada por la enfermedad de Alzheimer. Pueden citarse como ejemplos no limitantes de dicha demencia los siguientes: demencia vascular, demencia mixta, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, etc.

El procedimiento según la invención puede efectuarse ventajosamente en sujetos que padecen un deterioro cognitivo leve (DCL), puesto que este posibilita el diagnóstico objetivo de una patología en sujetos en que es difícil *a priori* determinar si sus síntomas cognitivos corresponden a un problema menor o a una patología real y posiblemente progresiva.

Para efectuar el procedimiento según la invención, pueden usarse una variedad de técnicas para detectar la ornitina transcarbamilasa (*OTC*) y, ventajosamente, medir su nivel en el líquido cefalorraquídeo:

- Según una primera técnica, se determina la presencia de *OTC* en la muestra de líquido cefalorraquídeo detectando la actividad de *OTC*. Una medida cuantitativa de la actividad de *OTC* posibilita también la cuantificación de *OTC*. Se describen ensayos que pueden usarse para detectar a actividad de *OTC* a continuación y en la bibliografía científica (Ishikawa *et al.*, 2003; Ohshita *et al.*, 1976). En una realización preferida, se detecta la actividad de *OTC* midiendo la producción de citrulina producida después de la adición de fosfato de carbamilo y ornitina a dicha muestra. Ventajosamente, se añaden fosfato de carbamilo y ornitina, que son sustratos de *OTC*, en exceso a la muestra, y se mide la producción de citrulina durante

un tiempo determinado. La producción de citrulina puede medirse por un ensayo colorimétrico, por ejemplo usando la reacción de diacetilmonoxima-tiosemicarbazida sin desprotenización, como se describe en Ohshita, Takeda *et al.* (1976).

- Una segunda técnica que puede usarse ventajosamente en los procedimientos de la invención consiste en medir la actividad de OTC mediante un ensayo basado en la reacción inversa de ornitina transcarbamilasa, como se describe por Ishikawa *et al.* (Ishikawa *et al.*, 2003). Brevemente, la conversión de ornitina en glutamato por la acción de OKT, P5CDH y GDH, fuerza a la OTC a catalizar su reacción inversa (conversión de citrulina en ornitina), de modo que se producen 3 mol de glutamato por 1 mol de sustrato citrulina. Se mide entonces el glutamato por glutamato oxidasa y reactivo de Trinder. Puede efectuarse una reacción preliminar para evitar la interferencia con el glutamato endógeno.
- Una tercera técnica está basada en un inmunoensayo con un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra OTC. Es un ejemplo de inmunoensayo que puede efectuarse un ensayo ELISA con anticuerpos monoclonales obtenidos contra OTC recombinante purificada, tal como se describe por Murayama *et al.* (Murayama *et al.*, 2006). El especialista en la materia puede usar también otros ensayos, tales como ELISA o transferencias Western con anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra OTC o un fragmento de la misma. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo monoclonal o policlonal obtenido contra un polipéptido específico de OTC humana, tal como el péptido MKTAKVAASDWTFLHCLPRK (SEC ID N°: 17). Pueden usarse también otros fragmentos de la OTC humana en el contexto de la invención. Dicha técnica permite la detección y/o cuantificación de OTC.

En los procedimientos anteriores, se diagnostica una alteración cerebral cuando se detecta un nivel y/o actividad significativos de ornitina transcarbamilasa en el líquido cefalorraquídeo. Se entiende por “nivel o actividad significativo” un nivel o actividad de ornitina transcarbamilasa que sea mayor que el nivel o actividad que se observa estadísticamente en sujetos sanos. Esta alteración cerebral es indicativa de una enfermedad cerebral, ya declarada o aún a nivel subclínico.

Se describe también en la presente memoria el uso del gen de ornitina transcarbamilasa (OTC) como marcador genético para determinar la predisposición genética de un individuo a una enfermedad cerebral tal como enfermedad de Alzheimer.

En particular, el presente texto describe un procedimiento para la predicción *in vitro* de un riesgo aumentado, para un individuo, de desarrollar una enfermedad cerebral, o para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad cerebral en un individuo, que comprende la etapa de genotipado de la región que controla la expresión del gen de ornitina transcarbamilasa (OTC) en una muestra biológica de dicho individuo. Este procedimiento es particularmente apropiado para predecir un riesgo aumentado o para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad neurodegenerativa, especialmente enfermedad de Alzheimer. Por supuesto, el nuevo marcador genético descrito en la presente memoria puede combinarse con otros marcadores, tales como por ejemplo el gen de apolipoproteína E, para aumentar la significación estadística del ensayo.

En una realización preferida de este procedimiento, se analizan los SNP (polimorfismos mononucleotídicos) -389 A/G y -241 G/A.

Este análisis puede efectuarse mediante la amplificación de uno o dos fragmentos de la región que controla la expresión del gen de ornitina transcarbamilasa (OTC). Si se amplifican dos fragmentos, uno de ellos comprende el nucleótido -389 y el otro comprende el nucleótido -241. Si se amplifica solo un fragmento, se elige para que abarque ambos nucleótidos -389 y -241. En una realización propuesta de los procedimientos según la invención, ilustrada en la parte experimental a continuación, se efectúa una reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores CTCCTGAGGTGGCCATAGTTG (SEC ID N°:1) y CCAACATGGTGAATCCCCGTC (SEC ID N°:2).

El genotipado de los polimorfismos -389 A/G y -241 G/A puede comprender también la etapa de analizar los patrones de restricción enzimática del producto o productos de amplificación. Por ejemplo, el genotipado del polimorfismo -389 A/G puede comprender una restricción del producto de amplificación por *AlwNI*, y el genotipado del polimorfismo -241 G/A puede comprender una restricción del producto de amplificación por *HinI*. Los patrones obtenidos en cada caso se especifican en la parte experimental a continuación.

Los procedimientos anteriores comprenden ventajosamente una etapa de interpretación, en que el haplotipo G⁻³⁸⁹-G⁻²⁴¹ es indicativo de un riesgo reducido de desarrollo de enfermedad de Alzheimer, y el haplotipo A⁻³⁸⁹-A⁻²⁴¹ es indicativo de un riesgo aumentado de desarrollo de enfermedad de Alzheimer.

Se da a conocer también un procedimiento para el diagnóstico de una alteración cerebral en un individuo fallecido, que comprende la etapa de marcar una biopsia cerebral de dicho individuo con un anticuerpo anti-OTC, que puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal obtenido contra un polipéptido específico de OTC humana. La presencia de ornitina transcarbamilasa en células endoteliales cerebrovasculares es indicativa de una alteración cerebral. En particular, la presencia de OTC en células endoteliales cerebrovasculares puede ser indicativa de enfermedad de Alzheimer.

Según la presente invención, puede usarse por ello un anticuerpo dirigido contra ornitina transcarbamilasa humana para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad cerebral, tal como deterioro cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer o demencia sin enfermedad de Alzheimer, en un sujeto fallecido o vivo. Es un ejemplo de anticuerpo que puede usarse en los procedimientos según la invención un anticuerpo policlonal obtenido contra el polipéptido MKTAKVAASDWTFHLHCLPRK (SEC ID N°: 17).

Se describe también un procedimiento de cribado para identificar compuestos capaces de prevenir, aliviar o tratar la enfermedad de Alzheimer y/u otras enfermedades cerebrales. Dicho procedimiento comprende una etapa de identificación de compuestos que modulan la expresión y/o la actividad de la ornitina transcarbamilasa en células. Dependiendo de varios factores, que incluyen la naturaleza y la etapa de la enfermedad, la concentración de amoníaco en el líquido cefalorraquídeo, etc., es preferible aumentar o reducir la actividad de la ornitina transcarbamilasa. Por lo tanto, en el procedimiento de cribado anterior, el término "modula" significa "activa" así como "inhibe".

En una realización preferida del procedimiento de cribado descrito anteriormente, se ensaya la capacidad de los compuestos de modular la expresión y/o la actividad de la ornitina transcarbamilasa en células endoteliales vasculares cultivadas que expresan el gen *OTC*.

Pueden usarse las mismas técnicas que las descritas anteriormente para medir la expresión y/o actividad de *OTC* en el líquido cefalorraquídeo de pacientes para efectuar los procedimientos de cribado. Sin embargo, puede observarse que la técnica consistente en medir la actividad de *OTC* mediante un ensayo basado en la reacción inversa de *OTC*, como se describe por Ishikawa *et al.* (Ishikawa *et al.*, 2003), puede automatizarse y es por ello particularmente adecuado para cribado de alto rendimiento. Por supuesto, para cribar compuestos para identificar los moduladores de *OTC*, se mide la expresión y/o actividad de *OTC* en presencia y ausencia de los compuestos candidatos, y se comparan los resultados obtenidos.

Se describen también kits para efectuar los procedimientos anteriormente descritos. Dicho kit, cuando se diseña para medir la actividad de *OTC* o la cantidad de *OTC* (en líquido cefalorraquídeo para establecer un diagnóstico o en medio en el caso de un procedimiento de cribado), comprende al menos una solución de ornitina y una solución de fosfato de carbamilo y, opcionalmente, una solución de trietanolamina y/o una solución de ácido fosfórico y ácido sulfúrico, y/o una solución de butanodiona.

Como alternativa o complementariamente, un kit para diagnosticar una enfermedad cerebral o para cribar moléculas según la presente invención, comprende al menos un anticuerpo dirigido contra ornitina transcarbamilasa humana, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra el polipéptido MKTAKVAASDWTFHLHCLPRK (SEC ID N°: 17).

Se describe también otro kit, diseñado para diagnosticar una enfermedad cerebral o para predecir el riesgo, para un individuo, de desarrollar dicha enfermedad, que comprende al menos un conjunto de cebadores para amplificar la región que controla la expresión del gen de ornitina transcarbamilasa (*OTC*) que comprende los nucleótidos -389 y -21. Este kit comprende también, además, las enzimas de restricción *AlwNI* e *HinI*.

Cada kit puede comprender también una reseña de uso que indica las etapas del procedimiento o procedimientos que pueden efectuarse con dicho kit, la naturaleza de la información que puede obtenerse y, posiblemente, cómo debería interpretarse esta información (dependiendo del contexto). Pueden incluirse también controles positivos y negativos incluyendo, por ejemplo, *OTC* recombinante.

Se describe también un mamífero transgénico no humano que porta un módulo de expresión para expresar *OTC* de manera condicional y/o específica de tejido. Dicho animal puede usarse como modelo de enfermedad de Alzheimer. En una realización preferida de dicho animal transgénico, la expresión del transgén *OTC* depende de la actividad de un activador transcripcional inducible. Por ejemplo, el transgén *OTC* puede estar bajo el control de un elemento promotor sensible a tetraciclina (*TRE*). Es un ejemplo de activador transcripcional inducible que puede usarse para obtener un animal transgénico según la invención una proteína transactivadora controlada por tetraciclina (*tTA*), que se expresará preferiblemente bajo el control de un promotor específico de tejido. Es un promotor particularmente adecuado para activar la expresión de este activador transcripcional el promotor de cadherina endotelial vascular.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Expresión de enzimas del ciclo de la urea en el cerebro. Experimentos de RT-PCR. Se extrajo el ARN total del cerebro de 11 casos de EA (EA) y 9 controles (T) usados para análisis transcriptómico. Se realizó un control omitiendo la muestra de ARN (T-); con fosfato de carbamoilo sintetasa 1 (CPS1), ornitina transcarbamilasa (*OTC*), argininosuccinato sintetasa 1 (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL).

Figura 2: Experimentos de inmunohistoquímica. El citoplasma de hepatocitos normales se tiñe intensamente de marrón por antisuero anti-*OTC*, como se muestra en el panel A, pero no los vasos y los conductos biliares

intrahepáticos. La corteza del cerebro de control no es inmunorreactiva de OTC (B), mientras que el endotelio de la corteza cerebral está marcado por este anticuerpo en 6 de los 12 pacientes de Alzheimer (C y D).

Figura 3: Electroferograma representativo del estado de metilación del promotor de OTC en posiciones -389 y -241 por secuenciación con bisulfito. El cuadrado indicaba la ausencia (A) o presencia (C) de metilación según el alelo de SNP -389.

Figura 4: (a) Localización genética de SNP de OTC, (b) estimación del desequilibrio de ligamiento entre los diferentes SNP.

Figura 5: Representación esquemática de la reacción catalizada por OTC.

Figura 6: Cuantificación de la citrulina producida *de novo* correspondiente a la actividad de OTC medida en 30 minutos, en 50 µl de LCR, en controles (n= 10), sujetos de DCL (n= 14), casos de EA (n= 16) y casos de demencia sin EA (n= 30).

Figura 7: Medida de citrulina en presencia o ausencia de sustratos de OTC.

Figura 8: Medida enzimática de la actividad de OTC y ensayos de control.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación del gen *OTC* como marcador genético potencial de enfermedad de Alzheimer

1.1. Materiales y procedimientos

Muestras de cerebro. Se obtuvieron cerebros de autopsias de 114 pacientes con EA esporádica de inicio temprano y tardío obtenidos de la región del gran Manchester del Reino Unido durante los años 1986-2001 (edad media de fallecimiento = $73,1 \pm 9,1$ años; edad media de inicio = $65,9 \pm 10,3$ años; 51 % de varones). Todos los pacientes eran de origen étnico blanco. Se realizaron los diagnósticos patológicos de acuerdo con los criterios neuropatológicos del CERAD para EA (Mirra *et al.*, 1991). Todos los pacientes estaban en las etapas Braak 5 o 6 en el momento del fallecimiento. Se obtuvieron cerebros de control de un conjunto inicial de 167 cerebros obtenidos de autopsias rutinarias llevadas a cabo en el Hospices Civils de Estrasburgo (Francia). Se diseñó la incorporación para excluir los casos de demencia (no se incorporaron individuos de instituciones médicas donde la mayoría de pacientes presentarían demencia, sino de un hospital general). La mayoría de casos ingresaron menos de 48 horas antes del fallecimiento por los servicios de urgencias y vivían en casa antes de su ingreso. Se excluyeron los casos en los que se hacía referencia en la autopsia a patologías neurológicas. Se aplicaron criterios neuropatológicos para definir las etapas de Braak (Braak y Braak, 1991) o de acuerdo con los criterios neuropatológicos del CERAD (Mirra *et al.*, 1991). De nuevo, todos los sujetos de control eran blancos.

Se extrajo el ARN total de tejido de cerebro de corteza frontal congelada de todas las muestras de 114 de EA y 167 de control usando el protocolo de fenol/cloroformo (reactivo TRIzol®, Invitrogen). Se valoró la calidad del ARN total usando el bioanalizador Agilent 2100 y se estimó sistemáticamente la relación de ARN ribosómico 28S/18S usando el software de bioclasificación del bioanalizador Agilent 2100. Se seleccionaron 12 casos de EA y 12 controles de las muestras iniciales según los criterios: (i) una relación de ARN ribosómico 28S/18S mayor o igual a 1,0; (ii) una etapa de Braak menor de 2 para las muestras de control. Se muestran las características principales de las muestras en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Principales características de las muestras cerebrales usadas para análisis transcriptómicos

Caso de EA	Sexo	Edad al fallecimiento (y)	Relación de 28S/18S	Caso de control	Sexo	Edad al fallecimiento (y)	Relación de 28S/18S
AD1	F	68	1,4	T1	F	74	1,0
AD2	M	86	1,0	T2	F	72	1,2
AD3	M	67	1,9	T3	M	75	1,0
AD4	F	66	1,6	T4	F	74	1,7
AD5	M	66	1,4	T5	F	70	1,1
AD6	F	84	1,7	T6	M	67	1,4
AD7	M	77	1,1	T7	M	69	1,8
AD8	M	71	1,2	T8	F	73	1,4
AD9	M	65	1,3	T9	F	80	1,1
AD10	F	64	1,0	T10	M	72	1,2
AD11	F	85	1,0	T11	M	78	1,2
AD12	F	77	1,3	T12	M	70	1,5
50 %		73,0 ± 8,4	1,3 ± 0,3	50 %		72,8 ± 3,7	1,3 ± 0,3

5 *Análisis de micromatriz.* Se diseñaron oligonucleótidos específicos de 2741 marcos abiertos de lectura localizados en las regiones de interés definidas por los estudios de barrido del genoma usando el software OLIGOMER (Mediagen). Los principales criterios de selección fueron: (i) una longitud de 60 oligonucleótidos; (ii) una temperatura de hibridación de entre 65 y 75 °C; (iii) la especificidad de la secuencia oligonucleotídica; (iv) la incapacidad de formar una estructura secundaria a la temperatura de hibridación; (v) una secuencia oligonucleotídica cercana al extremo 3'-UTR del ORF seleccionado. Después de la síntesis de los oligonucleótidos, se purificaron estos sistemáticamente para obtener una población de longitud homogénea (Sigma). Todos los oligonucleótidos se funcionalizaron con un brazo de C₆H₁₂NH₂ en su extremo 5'.

10 Se comparó la expresión genética de cada caso de EA con un agrupamiento de muestras de control para reducir la variabilidad interindividual potencial en la población de control. Se produjeron mediante amplificación ARNc representativos de la población de ARNm inicial a partir de 10 µg de ARN total, y se marcaron con los fluoróforos Cy5 o Cy3 usando el kit de amplificación lineal fluorescente Agilent como se describe por el proveedor. Se siguió una estrategia de intercambio de tintes, analizándose cada muestra de EA en dos micromatrices independientes en que se marcó la misma muestra con los fluoróforos Cy3 o Cy5. Para hibridación, se mezclaron 4 µl de ARNc de cada caso de EA con 4 µl de ARNc del agrupamiento de control. Se disolvió entonces esta mezcla en 22 µl de tampón de hibridación (proveedor), obteniéndose una concentración final de 40 % de formamida, 2,5 x medio de Denhardt, 0,5 % de SDS y 4xSSC (Sambrook y Russel 2001). Después de incubar a 95 °C durante 5 min, se aplicó la mezcla a portaobjetos bajo un cubreobjetos. Se dispusieron entonces los portaobjetos en una cámara de hibridación (Corning) y se añadieron 30 µl de tampón de hibridación a la cámara antes de sellar. Se incubaron las cámaras selladas durante 14-16 h en un baño de agua a 42 °C. Se lavaron entonces los portaobjetos dos veces con SSC 2X y SDS al 0,1 % durante 5 min a 42 °C, una vez durante 1 min con SSC 0,2X a temperatura ambiente y después una vez durante 1 min con SSC 0,1 X a temperatura ambiente. Finalmente, se secaron los portaobjetos por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Después de la hibridación, se barrieron las matrices usando un escáner Affymetrix® 418 y se procesaron las imágenes usando el software ImaGene 6.0 (Biodiscovery). Se analizaron entonces los datos brutos usando la biblioteca LIMMA (modelos lineales para datos de micromatriz) (Smyth *et al.*, 2003) procesando en lenguaje estadístico R v2.0.1 (Ihaka y Gentlman, 1996). Se aplicó un protocolo de normalización consistente en una normalización intramatricial de puntas de impresión Loess para corregir los efectos del tinte y especiales (Yang *et al.*, 2002) a las intensidades medianas con sustracción de fondo de los puntos no marcados. Después de la normalización, se efectuó la identificación de la regulación estadísticamente significativa usando el estadístico t moderado con contracción de Bayes empírica de los errores estándares (Lönstedt y Speed, 2002).

35 *RT-PCR.* Se efectuó la transcripción inversa de 500 ng de ARN total extraído de la corteza frontal de 11 casos de EA y 9 controles usados inicialmente para experimentos de micromatrices. Se obtuvo la amplificación específica de ARNm de genes de fosfato de carbamoilo sintetasa 1 (*CPS 1*), ornitina transcarbamilasa (*OTC*), argininosuccinato

sintetasa 1 (ASS), argininosuccinato liasa (ASL) y arginasa 1 usando lo conjuntos oligonucleotídicos descritos en la Tabla 2. Se diseñaron los cebadores en diferentes exones para evitar la contaminación potencial por amplificación del ADN genómico. Se efectuaron experimentos de control omitiendo la muestra de ARN. Se analizaron los productos de ARN en geles de agarosa (al 3 %).

5 **Tabla 2:** Conjuntos de oligonucleótidos usados para una detección por RT-PCR de la expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo de la urea

		Secuencia	SEC ID N°:	Longitud (pb)
CPS I	De codificación	aagacctggcatcaggctcc	18	344
	Inverso	tggtagccagccagtggtg	19	
OTC	De codificación	tccaattatcaatgggctg	20	319
	Inverso	catgcttatccaaagtgtctg	21	
ASS	De codificación	cagtctgctctgccgctg	22	270
	Inverso	ccggccagatgaactcctcca	23	
ASL	De codificación	gaggaaccgccaacatg	24	226
	Inverso	ccacctgtctaggccatgg	25	
Arginasa I	De codificación	cctacagtattgagaaggc	26	334
	Inverso	ttccactgtggtgtcagt	27	

10 *Experimentos de inmunohistoquímica.* Se desarrollaron anticuerpos policlonales (pAb) anti-peptídicos contra un polipéptido de 20 aa específico de la proteína OTC humana (MKTAKVAASDWTFLHCLPRK) con un protocolo estándar (inmunización de tres meses, Proteogenix SA, Francia). Se obtuvieron muestras de tejido de cerebro de la autopsia de 12 pacientes de Alzheimer (7 hombres y 5 mujeres, en el intervalo de 57 a 95 años; edad media 75,3 años) y 4 controles (pacientes desprovistos de cualquier enfermedad neurológica en los que el estudio neuropatológico no mostró patología de Alzheimer, edad media 69,5 años). Todos los pacientes tuvieron un seguimiento prospectivo en el Hospital Universitario de Lille. Se fijó la mitad del cerebro con formalina para examen por microscopio óptico y se congeló la otra parte del cerebro para estudio bioquímico. En todos los pacientes, se confirmó la patología de Alzheimer por inmunohistoquímica y análisis de transferencia Western de Tau, Aft y α -sinucleína (Delacourte *et al.*, 2002).

15 Se procesaron secciones en parafina de la corteza frontal anterior (BA 10) en un autómata Benchmark-XT (Ventana, Tucson, AZ; EE.UU.). Se aplicaron anticuerpo anti-OTC y suero de conejo preinmune (ambos diluidos 1/500) después de calentar, y se revelaron por una técnica de inmunoperoxidasa estándar. Los controles positivos fueron secciones en parafina de hígado fijado con formalina. Los controles negativos fueron secciones cerebrales de pacientes de Alzheimer y controles, procesados con un suero de conejo preinmune.

20 *Genotipado.* Se determinó el genotipo de 8 SNP mediante digestión enzimática después de amplificación por PCR (Tabla 3 a continuación). Se efectuaron un 50 % de los genotipos aleatoriamente dos veces y no se observaron discrepancias.

25 **Tabla 3:** Conjuntos de oligonucleótidos usados para el genotipado de SNP de OTC

SNP	Posición	Referencia	Cebadores	SEC ID N°	Enzima
1	-544	rs5963408	ctcctgaggtggccatagttg	1	<i>Alu I</i>
2	-389	rs5963409			<i>AlwN I</i>
3	-260	rs5963410	ccaacatggtgaatccccgtc	2	<i>Mnl I</i>
4	-241	rs5963411			<i>Hin I</i>
5	-146	rs5963029	atctgggctcactgcaacct	3	<i>Bst5F I</i>
			gagaccagcctggccaacag	4	

SNP	Posición	Referencia	Cebadores	SEC ID N°	Enzima
6	-69	rs5963412	gtggagacggggattcacat	5	<i>HpyCH4 III</i>
			gggcacggtggctcagact	6	
7	Lys46Arg	rs1800321	gtgtggacaaccactacaaa	7	<i>DdeI</i>
			tgttacatacctctccttc	8	
8	Glu270Arg	rs1800328	atggtaccaagctgttgctg	9	<i>Alw26I</i>
			cgcttttctctcctcgtc	10	

5 Para determinar el nucleótido presente en posición -389, se digiere con *AlwN I* el producto de amplificación de 718 pb obtenido después de amplificación con los cebadores de SEC ID N°: 1 y 2 y se interpreta el patrón como sigue: si el nucleótido en posición -389 es G, entonces el producto de amplificación no se restringe, mientras que la digestión da como resultado dos bandas (de 471 y 247 pb) si el nucleótido en posición -389 es A.

10 Para determinar el nucleótido presente en posición -241, se digiere con *Hin I* el producto de amplificación de 718 pb obtenido después de amplificación con los cebadores de SEC ID N°: 1 y 2 y se interpreta el patrón como sigue: si el nucleótido en posición -241 es A, entonces el producto de amplificación se restringe en 4 fragmentos (de 340, 226, 138 y 14 pb), mientras que una G en posición -241 crea un sitio de restricción *Hin I* adicional, de modo que la digestión da como resultado cinco fragmentos (de 340, 137, 89, 138 y 14 pb).

15 *Estado de metilación en posiciones -389 y -241.* Para determinar el estado de metilación de las citosinas de los motivos CpG en posiciones -389 y -241 dentro del promotor de *OTC* humano, se efectuó el tratamiento de ADN genómico con bisulfito usando el kit de modificación de ADN CpGenome (Chemicon). Brevemente, se trató 1 µg de ADN genómico extraído de linfocitos de sangre periférica con bisulfito de sodio e hidroquinona y se incubó a 50 °C durante 16 horas. Después de este tratamiento, se convirtieron las citosinas no metiladas en uracilo y las citosinas metiladas permanecieron intactas. Después de la purificación, se usó inmediatamente el ADN modificado con bisulfito para PCR o se almacenó a -70 °C.

20 Se usó ADN modificado con bisulfito (20 ng) como molde para PCR para determinar el estado de metilación del motivo CpG/A en posición -389 usando el conjunto de cebadores: 5'-ATAAATGTGAAGTTGTAGAT-5' (SEC ID N°: 11) y 5'-TAATTACCTATTAATTCTAAC-3' (SEC ID N°: 12). Se reamplificó a continuación el producto de amplificación usando el conjunto de cebadores: 5'-GAATAGTTGTTAGGGGAAG-3' (SEC ID N°: 13) y 5'-ATAAATGTGAAGTTGTAGAT-3' (SEC ID N°: 14). Se usó ADN modificado con bisulfito (20 ng) como molde para PCR para determinar el estado de metilación del motivo CpG/A en posición -241 usando el conjunto de cebadores: 5'-TGGGTTTATTGTAATfTfGTTTTTT-3' (SEC ID N°: 15) y 5'-CTAACCAACATAATAAATCCCCATC-3' (SEC ID N°: 16). Se clonaron los fragmentos de PCR de individuos portadores de los genotipos GG o AA (4 individuos por genotipo) para ambos SNP del promotor de *OTC* en un pGEM-T Easy Vector (Promega) y se secuenciaron al menos 5 clones con insertos de tamaño apropiado para cada individuo.

30 *Estudio de casos y controles de EA.* Las muestras de EA y control francesas eran de raza blanca (casos de EA n= 600, edad= 72,4±7,2 años, edad de inicio= 69,5±7,4 años, 39,5 % de varones; controles n= 664, edad= 72,5±7,9 años, 36 % de varones). Se definió una edad temprana de inicio como ≤ 65 años. Se estableció un diagnóstico de EA probable según los criterios del DSM-III-R y NINCDS-ADRDA. Se incorporan los controles de raza blanca y se definieron como sujetos sin los criterios de demencia del DMS-III-R, con integridad de la función cognitiva y una puntuación de MMS ≥ 25. La presencia de un historial familiar de demencia era un criterio de exclusión. Se incorporaron los controles de residencias de ancianos o del censo electoral (voluntarios altruistas). Cada individuo o familiar más cercano dio su consentimiento informado.

35 *Análisis estadístico.* Se usó el software SAS, edición 8.0, (SAS institute, Cary, Carolina del N°rte, EE.UU.). Se efectuaron análisis univariados con la prueba χ^2 de Pearson o la prueba exacta de Fisher cuando fuera apropiado. En el análisis multivariado, se usó el criterio de información de Akaike (AIC) para determinar el modelo genético de mejor ajuste (dominante, codominante o recesivo) (Akaike, 1978; Bozdogan, 1987). El modelo con el menor AIC refleja el mejor equilibrio de bondad de ajuste y parsimonia. Los genotipos del polimorfismo de promotor -389 G/A se codificaron finalmente como variable ficticia según la hipótesis para un modelo recesivo, concretamente, genotipo AA frente a AG+GG. Se estimaron los efectos de esta variable sobre la enfermedad mediante múltiples modelos de regresión logística ajustados para la edad y estado del alelo $\epsilon 4$ de *APOE*. Se estimaron las frecuencias de haplotipo extendidas de los diferentes marcadores usando el software Thesias. El objetivo del software Thesias es efectuar un análisis de asociación basado en haplotipo en individuos no relacionados. Este programa está basado en el modelo de probabilidad máxima descrito en (Bozdogan, 1987) y está ligado al algoritmo de SEM (Tregouet y Tired, 2004).

1.2. Resultados

Se valoraron los niveles de expresión génica en ARN total de tejido cerebral *post-mortem* de 12 controles y 12 pacientes de EA. En el presente estudio, se comparó el perfil de expresión cerebral de cada uno de los pacientes de EA con un agrupamiento de muestras de control para minimizar la influencia de la variabilidad individual en los controles. De los 2741 genes estudiados, 36 se sobreexpresaban y 70 se subexpresaban en los cerebros de pacientes con EA en comparación con el agrupamiento de controles (umbral de selección, $p < 10^{-5}$). La distribución de estos genes en los diferentes loci de interés se indica en la Tabla 4.

Tabla 4: Número de genes que exhiben una expresión diferencial significativa en al menos 6 cerebros de EA en comparación con los controles

Locus	cM	ORF	Genes expresados
		seleccionados	diferencialmente
Cr. 1	50	393	13
Cr. 5	50	174	6
Cr. 6	40	535	24
Cr. 9	55	230	12
Cr. 10	95	415	15
Cr. 12	40	306	11
Cr. 20	50	239	9
Cr. 21	58	267	6
Cr. X	25	182	11

A partir de un agrupamiento de 11 genes expresados diferencialmente en el cromosoma X, se seleccionó el gen *OTC* humano para análisis adicionales porque no se observó señal en absoluto para *OTC* en las micromatrices del agrupamiento de control, mientras que se observó una hibridación específica en todas las 12 muestras de EA. Los inventores confirmaron por RT-PCR que el gen *OTC* se expresaba en la corteza frontal de pacientes de EA y no se expresaba en la mayoría de los cerebros de control (solo una muestra de cerebro de control exhibía expresión de *OTC* en las presentes condiciones, Figura 1).

Se investigó a continuación la expresión de *OTC* a nivel proteico en el cerebro de casos de EA y controles. El epitelio de capilares exhibía inmunorreactividad hacia un anticuerpo policlonal humano anti-*OTC* en la corteza de 6 de los 12 casos de EA (Figura 2C y D), mientras que no se observaba marcaje en absoluto en ninguno de los cerebros de control (Figura 2B). Como se esperaba, en las secciones de hígado de control, se observó una fuerte señal en hepatocitos, pero no en los vasos y conductos biliares intrahepáticos (Figura 2A). No se observó señal cuando se aplicó suero de conejo preinmune en lugar de anticuerpo anti-*OTC* en todas las muestras ensayadas (datos no mostrados).

Después de esta observación, se valoró si el gen *OTC* podría ser un determinante genético de EA. Los inventores buscaron polimorfismos en este gen usando la base de datos internacional NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp>). Se describieron numerosas mutaciones, siendo la mayoría responsables de la enfermedad de deficiencia por *OTC*; se describieron otros polimorfismos mononucleotídicos (SNP) frecuentes. Se seleccionaron 6 SNP en la región promotora y otros 2 SNP no sinónimos (Figura 4). Los SNP -146 C/T y -69 C/T no pudieron detectarse en 185 ancianos sanos. Además, el SNP Glu270Arg exhibía una baja frecuencia (2,3 %) y por consiguiente se excluyó de análisis adicionales. Los 5 SNP seleccionados restantes estaban todos en fuerte desequilibrio de ligamiento (DL) (Figura 4b). Finalmente, los SNP -389 G/A y -241 A/G, que destruyen o crean potencialmente un motivo CpG en el promotor de *OTC*, respectivamente, se investigaron en estudios de asociación. Es más, dicha modificación potencial del estado de metilación del promotor puede ser particularmente relevante para el control de la expresión génica.

Se evaluó el efecto de estos dos SNP sobre el riesgo de desarrollar EA usando un estudio de casos y controles franceses que comprende 583 casos de EA esporádica y 639 controles. Debido a que el gen *OTC* está localizado en el cromosoma X, el equilibrio de Hardy-Weinberg pudo ensayarse solo en mujeres. No se observó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para ningún SNP estudiado. La distribución genotípica del SNP -389 G/A era significativamente diferente entre las poblaciones de EA y de control en mujeres ($p = 0,015$) pero no en hombres (Tabla 5). Las mujeres portadoras del genotipo -389 AA tenían un riesgo aumentado de desarrollar EA (OR= 2,3, IC del 95 % 1,3 a 4,1, $p = 0,005$). Este efecto parecía ser independiente del estado del $\epsilon 4$ de APOE y la edad. El SNP -241 A/G no estaba asociado a EA para ningún género.

Tabla 5: Distribuciones de alelos y genotipos para los SNP de *OTC* -389 G/A, -241 A/G Lys46Arg (a) en hombres y (b) en mujeres. ¹ ns; ² p= 0,015

(a) Hombres		Distribución alélica¹ (%)				
-389 G/A	n	G	A			
Control	232	172 (0,74)	60 (0,26)			
Casos de EA	215	153 (0,71)	62 (0,29)			
-241 AG	n	A	G			
Control	232	167 (0,72)	65 (0,28)			
Casos de EA	215	158 (0,73)	57 (0,27)			
(b) Mujeres		Distribución alélica (%)		Distribución genotípica (%)		
-389 G/A	n	G	A¹	GG	AG	AA²
Control	407	615 (0,76)	199 (0,24)	227 (0,56)	161 (0,39)	19 (0,05)
Casos de EA	368	526 (0,71)	210 (0,29)	195 (0,53)	136 (0,37)	37 (0,10)
-241 A/G	n	A	G¹	AA	AG	GG¹
Control	407	595 (0,73)	219 (0,27)	210 (0,52)	175 (0,43)	22 (0,05)
Casos de EA	368	532 (0,72)	204 (0,28)	194 (0,53)	144 (0,39)	30 (0,08)

5 Se evaluó a continuación el efecto combinado potencial de estos dos SNP de promotor sobre el riesgo de desarrollar EA. Se calcularon las frecuencias de haplotipo a partir de genotipos sin fase usando el software Thesias en mujeres o se observaron directamente en hombres (Tabla 6). El haplotipo G₋₃₈₉-A₋₂₄₁ más común se definió como referencia. Se observó que el haplotipo G₋₃₈₉-G₋₂₄₁ infrecuente estaba asociado a un riesgo reducido de desarrollar EA (OR= 0,3, IC del 95 % [0,1-0,7], p= 0,001). Por el contrario, el haplotipo A₋₃₈₉-A₋₂₄₁ infrecuente estaba asociado a un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad (OR= 3,0, IC del 95 % [1,2-7,3], p= 0,007).

10

Tabla 6: Distribución de haplotipo de los SNP -389 G/A y -241 A/G en (a) mujeres, (b) hombres y (c) toda la población. ¹ p= 0,03; ² p= 0,001; ³ p= 0,0002

Distribución haplotípica (%)			
(a) Hombres¹			
Haplotipo (-389/-241)	Controles	Casos de EA	OR [IC del 95 %]
G-A	167 (0,72)	11 (0,70)	-
A-A	-	7 (0,03)	+∞, p= 0,006
A-G	60 (0,26)	59 (0,26)	1,1 (0,7-1,7), ns
G-G	5 (0,03)	2 (0,01)	0,4 [0,1-2,6], ns
(b) Mujeres²			
Haplotipo (-389/-241)	Controles	Controles	OR [IC del 95 %]
G-A	587 (0,71)	519 (0,70)	-
A-A	8 (0,01)	14 (0,02)	2,0 [0,8-5,2 ^q],ns
A-G	195 (0,24)	196 (0,27)	1,1 [0,91,4], ns
G-G	28 (0,03)	7 (0,01)	0,3 [0,1-0,7], p= 0,003
(c) Todos³			
Haplotipo (-389/-241)	Controles	Casos de EA	OR [IC del 95 %]
G-A	754 (0,72)	670 (0,70)	-
A-A	8 (0,01)	21 (0,02)	3,0 [1,2-7,2], p= 0,007
A-G	255 (0,24)	255 (0,27)	1,1 (0,9-1,4), ns
G-G	33 (0,03)	9 (0,01)	0,3 [0,1-0,7], p= 0,001

5 Para evaluar la relevancia biológica potencial de los SNP -389 G/A y -241 A/G, los inventores investigaron si estos SNP pueden modificar el estado de metilación del promotor de *OTC*. El alelo A infrecuente del SNP -389 G/A destruye un motivo CpG. Se determinó el estado de metilación del residuo de citosina en los motivos CpG y CpA en posición -389 mediante secuenciación directa de los productos de PCR clonados amplificados a partir de ADN genómico tratado con bisulfito. Se muestran electroferogramas de secuenciación representativos en la Figura 3.

10 La citosina en el motivo CpG en posición -389 estaba sistemáticamente metilada, mientras que la citosina en el motivo CpA en la misma posición no lo estaba. Valoraron de forma similar si el SNP -241 A/G puede modificar el estado de metilación del promotor de *OTC* ya que el alelo G infrecuente creaba un motivo CpG. La citosina en el motivo CpA en posición -241 no estaba sistemáticamente metilada, mientras que la metilación de la citosina en el motivo CpG en la misma posición variaba para un mismo individuo. Todas estas observaciones indicaban que el estado de metilación del promotor de *OTC* puede depender de los SNP -389 G/A y -241 A/G. De forma interesante, el haplotipo G₋₃₈₉-G₋₂₄₁ infrecuente estaba asociado a un riesgo reducido de desarrollo de EA y puede corresponder a un alto nivel de metilación del promotor de *OTC*, al contrario que el haplotipo A₋₃₈₉-A₋₂₄₁ infrecuente, que aumenta el riesgo de desarrollar EA y está potencialmente asociado a un menor nivel de metilación.

Ejemplo 2: OTC en el líquido cefalorraquídeo es un indicador de daños cerebrales que probablemente conduzcan a deterioro cognitivo y demencia

20 **2.1. Materiales y procedimientos**

Muestras de LCR:

Se obtuvo LCR por el servicio del "Centre de Mémoire du Service de Neurologie de l'Hôpital Salengro, CHRU de Lille" con el acuerdo informado inicial del paciente o de un pariente o tutor legal. Fueron necesarios 200 µl para llevar a cabo las medidas enzimáticas.

Este estudio comprende 14 pacientes de "deterioro cognitivo leve (DCL)", 30 pacientes que padecen demencia sin EA (demencia vascular, demencia mixta, demencia frontotemporal, con cuerpos de Lewy, etc.) y 16 que padecen una probable EA.

Medida enzimática de la actividad de OTC:

- 5 Brevemente, se cuantifica la actividad de OTC mediante la determinación del índice de citrulina producida durante un tiempo dado en presencia de sus sustratos en exceso (Figura 5).

Se mide el índice de citrulina colorimétricamente mediante una reacción de diacetilmonoxima-tiosemicarbazida como se describe en Ohshita, Takeda *et al.* (1976). Se midió la actividad enzimática de OTC según la técnica descrita en Lee y Nussbaum, (1989), pero ligeramente modificada con el objetivo de poder llevar a cabo este experimento en
10 placas de 96 pocillos. Se tomaron para cada muestra dos medidas, con o sin sustratos añadidos, y esto para poder medir la cantidad de citrulina presente naturalmente en las muestras y para restarla de la cantidad total de citrulina presente después inducir la actividad de OTC por la adición de sus sustratos, y se mantuvo durante 30 minutos. En resumen, se añadieron 50 µl de LCR a 140 µl de una solución que contiene los sustratos con concentraciones
15 finales de ornitina 5 mM, carbamilfosfato de litio 15 mM y trietanolamina 270 nM o con 140 µl de agua destilada. Se incubó la unidad durante 30 minutos a 37 °C. Se detuvo entonces la reacción enzimática mediante la adición de 50 µl de una solución 3:1 (v/v) de ácido fosfórico/ácido sulfúrico. Finalmente, se activó la reacción colorimétrica que posibilita cuantificar el índice de citrulina presente en la muestra mediante la adición de 10 µl de 2,3-butanodiona al 3 % y se mantuvo a 95 °C en la oscuridad durante 15 minutos. Se llevó a cabo la lectura en un lector de microplacas (E1x800 -Biotek) a 490 nm de longitud de onda.

20 Se llevaron a cabo controles en dos intervalos para cada experimento, incluyendo uno cantidades crecientes (de 0 a 150 nmoles/50 µl) de citrulina comercial, e incluyendo el otro cantidades crecientes (de 0 a 3×10^{-3} unidades/50 µl) de OTC comercial. Para estos controles de intervalos, se realizaron también dos medidas, en ausencia o en presencia de sustratos, como se describe anteriormente para las muestras (Figuras 7 y 8). Además, se llevó a cabo otro control preincubando la enzima OTC comercial con una cantidad saturante de anticuerpos policlonales dirigidos
25 contra la OTC desarrollados para este estudio por Proteogenix SA, Francia; el objetivo era demostrar que la inhibición de la enzima por un anticuerpo evita la producción de citrulina incluso en presencia de sustratos de OTC (Figura 8).

Los valores de DO se refirieron al correspondiente intervalo de control de citrulina para determinar la cantidad de nmoles de citrulina presentes en cada pocillo. Para cada muestra, se restó la cantidad de nmoles de citrulina medida en ausencia de sustratos de la cantidad de nmoles de citrulina medida en presencia de sustratos, representando la
30 cantidad resultante el nivel de citrulina que se ha producido por la OTC presente en la muestra durante 30 minutos. Debería observarse que la transferencia de este valor al intervalo de control de OTC permitiría también determinar el nivel de unidad de OTC presente en la muestra. Sin embargo, se eligió expresar la actividad de OTC en nmoles de la citrulina producida *de novo*/30 minutos/50 µl de LCR.

35 **2.2 Resultados**

Los resultados mostrados en la Figura 6 indican que la cantidad de citrulina producida *de novo*, correspondiente a la actividad de OTC medida durante 30 minutos, es de media al menos 10 veces mayor entre pacientes que presentan DCL, demencia sin EA o con EA, en comparación con los controles ($p < 0,0001$).

40 El nivel de actividad de OTC en el LCR sería por ello una herramienta eficaz para detectar la presencia de un declive cognitivo objetivo, incluso menor, y susceptible de conducir a demencia. Esta medida se propone por tanto como ayuda para el diagnóstico muy temprano de alteración cognitiva y demencia.

REFERENCIAS

- Akaike, H. (1978). "A Bayesian analysis of the minimum AIC procedure". *Ann. Inst. Statist. Math.* 30, 9-14.
- 45 Blalock, E. M., Geddes, J. W., Chen, K. C., Porter, N. M., Markesbery, W. R., and Landfield, P. W. (2004). "Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2173-2178.
- Bozdogan, H. (1987). "Model-selection and Akaike's information criterion (AIC): the general theory and its analytical extensions". *Psychometrika* 52, 345-370.
- 50 Braak, H. y Braak, E. (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes". *Acta Neuropathol. (Berl)* 82, 239-259.
- Brown, V. M., Ossadtchi, A., Khan, A. H., Cherry, S. R., Leahy, R. M. y Smith, D. J. (2002). "High-throughput imaging of brain gene expression". *Genome Res.* 12, 244-254.

- Colangelo, V., Schurr, J., Ball, M. J., Peláez, R. P., Bazan, N. G. y Lukiw, W. J. (2002). "Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and upregulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling". J. Neurosci. Res. 70, 462-473.
- Cruts, M. y Van Broeckhoven, C. (1998). "Molecular genetics of Alzheimer's disease". Ann. Med. 30, 560-565.
- 5 Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Watzet, A., Maurage, C. A., Lebert, F., Pasquier, F. y David, J. P. (2002). "Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease". Neurology 59, 398-407.
- Felipo, V. y Butterworth, R. F. (2002). "Neurobiology of ammonia". Prog. Neurobiol. 67, 259-279.
- Gordon, N. (2003). "Ornithine transcarbamylase deficiency: a urea cycle defect". Eur. J. Paediatr. Neurol. 7, 115-121.
- 10 Ihaka, R. y Gentleman, R. (1996). "A language for data analysis and graphics". Journal of Computational and Graphical Statistics 5, 299-314.
- Ishikawa, H., Matsuzawa, T., Ohashi, K. y Nagamura, Y. (2003). "A novel method for measuring serum ornithine carbamoyltransferase". Ann. Clin. Biochem. 40, 264-268.
- Kamboh, M. I. (2004). "Molecular genetics of late-onset alzheimer's disease". Ann. Hum. Genet. 68, 381-404.
- 15 Lahiri, D. K., Ge, Y. W., Maloney, B., Wavrant-De Vrieze, F. y Hardy, J. (2005). "Characterization of two APP gene promoter polymorphisms that appear to influence risk of late-onset alzheimer's disease". Neurobiol. Aging 26, 1329-1341.
- Lambert, J. C., Araria-Goumidi, L., Myllykangas, L., Ellis, C., Wang, J. C., Bullido, M. J., Harris, J. M., Artiga, M. J., Hernández, D., Kwon, J. M., *et al.* (2002). "Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk". Neurology 59, 59-66.
- 20 Lambert, J. C., Testa, E., Cognat, V., Soula, J., Hot, D., Lemoine, Y., Gaypay, G. y Amouyel, P. (2003). "Relevance and limitations of public databases for microarray design: a critical approach to gene predictions". Pharmacogenomics J. 3, 235-241.
- Lee, J. T. y Nussbaum, R. L. (1989). "An arginine to glutamine mutation in residue 109 of human ornithine transcarbamylase completely abolishes enzymatic activity in Cos1 cells". J. Clin. Invest. 84, 1762-1766.
- 25 Li, Y. J., Oliveira, S. A., Xu, P., Martin, E. R., Stenger, J. E., Scherzer, C. R., Hauser, M. A., Scott, W. K., Small, G. W., Nance, M. A., *et al.* (2003). "Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease". Hum. Mol. Genet. 12, 3259-3267.
- Lönnstedt, I. y Speed, T. p. (2002). "Replicated Microarray Data". Statistica Sinica 12, 31-46.
- 30 Loring, J. F., Wen, X., Lee, J. M., Seilhamer, J. y Somogyi, R. (2001). "A gene expression profile of Alzheimer's disease". DNA Cell. Biol. 20, 683-695.
- Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., Vogel, F. S., Hughes, J. P., van Belle, G. y Berg, L. (1991). "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease". Neurology 41, 479-486.
- 35 Murayama, H., Igarashi, M., Mori, M., Fukuda, Y., Ikemoto, M. y Nagata, A. (2006). "A sensitive ELISA for serum ornithine carbamoyltransferase utilizing the enhancement of immunoreactivity at alkaline pH". Clin. Chim. Acta.
- Ohshita, M., Takeda, H., Kamiyama, Y., Ozawa, K. y Honjo, I. (1976). "A direct method for the estimation of ornithine carbamoyltransferase activity in serum. Clin. Chim. Acta 67, 145-152.
- Riazanskaia, N., Lukiw, W. J., Grigorenko, A., Korovaitseva, G., Dvoryanchikov, G., Moliaka, Y., Nicolaou, M., Farrer, L., Bazan, N. G. y Rogaev, E. (2002). "Regulatory region variability in the human presenilin-2 (PSEN2) gene: potential contribution to the gene activity and risk for AD". Mol. Psychiatry 7, 891-898.
- 40 Roberts, S. B., MacLean, C. J., Neale, M. C., Eaves, L. J. y Kendler, K. S. (1999). "Replication of linkage studies of complex traits: an examination of variation in location estimates". Am. J. Hum. Genet. 65, 876-884.
- Smyth, G. K., Yang, Y. H. y Speed, T. (2003). "Statistical issues in cDNA microarray data analysis". Methods Mol. Biol. 224, 111-136.
- 45 Theuns, J., Del-Favero, J., Dermaut, B., van Duijn, C. M., Backhovens, H., Van den Broeck, M. V., Serneels, S., Corsmit, E., Van Broeckhoven, C. V. y Cruts, M. (2000). "Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression". Hum. Mol. Genet. 9, 325-331.

Tregouet, D. A. y Tiret, L. (2004). "Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm". Eur. J. Hum. Genet. 12, 971-974.

Wiesinger, H. (2001). "Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system". Prog. Neurobiol. 64, 365-391.

- 5 Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J. y Speed, T. P. (2002). "Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation". Nucleic Acids Res. 30, e15.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GENOSCREEN
- 10 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
 AMOUYEL Philippe
 LAMBERT Jean-Charles
 FERREIRA Stéphanie
- 15 <120> USO DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC) COMO MARCADOR PARA DIAGNOSTICAR DAÑOS CEREBRALES
- <130> BLOcpF1971/1PCT
- <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> cebador
- 25 <400> 1
- ctcctgaggt ggccatagtt g 21**
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 30 <213> Artificial
- <220>
- <223> cebador
- <400> 2
- ccaacatggt gaatccccgt c 21**
- 35 <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 3
atctgggctc actgcaacct 20
 5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 4
gagaccagcc tggccaacag 20
 <210> 5
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 5
 20 **gtggagacgg ggattcacca t** 21
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
gggcacggtg gctcacgact 20
 <210> 7
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 7

gtgtggacaa ccactacaaa 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
tgttacatac ctctccttc 20
 10 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 9
atggtaccaa gctgttgctg 20
 <210> 10
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 10
 25 **cgcttttct tctcctgctc** 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
ataaatgtga agttgtagat 20
 <210> 12
 35 <211> 21

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 12
taattaccta ttaattctaa c 21
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
gaataggtg ttaggggaag 20
 15 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 14
ataaatgtga agttgtagat 20
 <210> 15
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 30 **tgggtttatt gtaattttg ttttt 26**
 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador

<400> 16

ctaaccaaca taataaatcc cccatc 26

<210> 17

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido

<400> 17

Met Lys Thr Ala Lys val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys
1 5 10 15

10 **Leu Pro Arg Lys**
20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 18

aagacctggc atcaggctcc 20

<210> 19

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

25 <400> 19

tggtagccag ccagtggtg 20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 20

tccaattat caatgggctg 20
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
catgctatc caaagtgtct g 21
 10 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 22
cagtctgct ctgccgctg 20
 <210> 23
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 25 **ccggccagat gaactcctcc a** 21
 <210> 24
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 24
gaggaaccgc ccaacatg 18
 <210> 25
 35 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 449 573 T3

<213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 25
5 **ccacctgtc taggcatgg** 20
<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> cebador
<400> 26
cctacagtat tgagaaaggc 20
<210> 27
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
20 <400> 27
ttccacttgt ggtgtcagt 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de una alteración cerebral seleccionada del grupo constituido por deterioro cognitivo leve, demencia por enfermedad de Alzheimer y demencia sin enfermedad de Alzheimer en un individuo, que comprende la etapa de detectar ornitina transcarbamilasa (OTC) en una muestra de líquido cefalorraquídeo de dicho individuo, en el que la presencia de ornitina transcarbamilasa en el líquido cefalorraquídeo es indicativa de enfermedad cerebral.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de ornitina transcarbamilasa (OTC) en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo se efectúa detectando la actividad de OTC.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la actividad de OTC se detecta y cuantifica midiendo la producción de citrulina después de la adición de fosfato de carbamilo y ornitina a dicha muestra.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de ornitina transcarbamilasa (OTC) de dicha muestra de líquido cefalorraquídeo se efectúa mediante inmunoensayo con un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra OTC.
- 15 5. Un procedimiento para diagnosticar una alteración cerebral seleccionada del grupo constituido por deterioro cognitivo leve, demencia por enfermedad de Alzheimer y sin enfermedad de Alzheimer en un individuo fallecido, que comprende la etapa de marcar una biopsia cerebral de dicho individuo con un anticuerpo anti-OTC, en el que la presencia de ornitina transcarbamilasa en las células endoteliales cerebrovasculares es indicativa de una alteración cerebral.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 4 o el procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal obtenido contra un polipéptido específico de OTC humana.
7. El procedimiento según la reivindicación 5 o 6, en el que la presencia de ornitina transcarbamilasa en células endoteliales cerebrovasculares es indicativa de enfermedad de Alzheimer.
- 25 8. Uso de un anticuerpo dirigido contra ornitina transcarbamilasa humana para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad cerebral seleccionada del grupo constituido por deterioro cognitivo leve, demencia por enfermedad de Alzheimer y sin enfermedad de Alzheimer, en el que dicho anticuerpo se usa en un inmunoensayo en una muestra de líquido cefalorraquídeo.

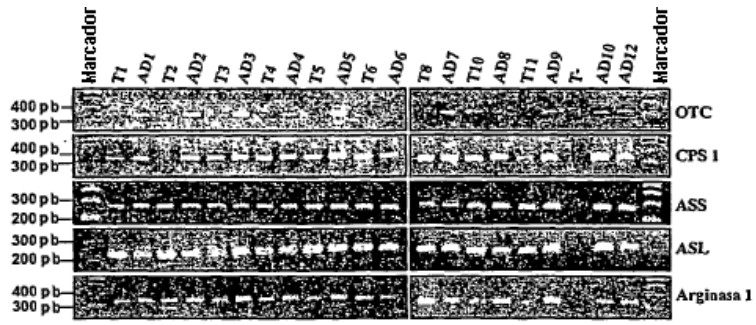


Figura 1

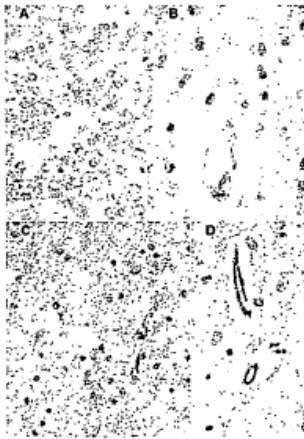


Figura 2

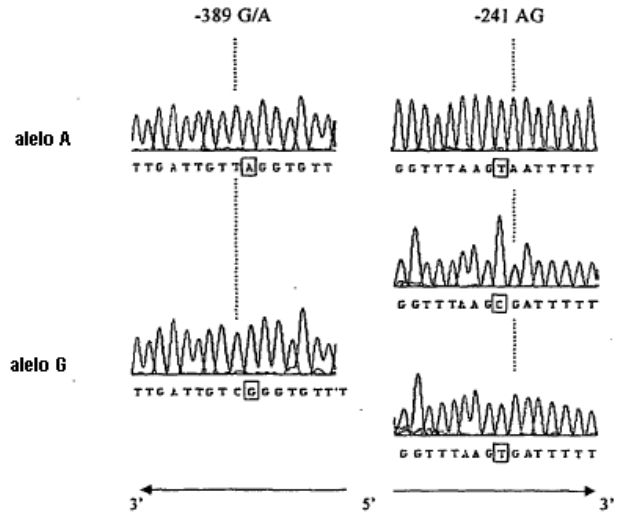


Figura 3

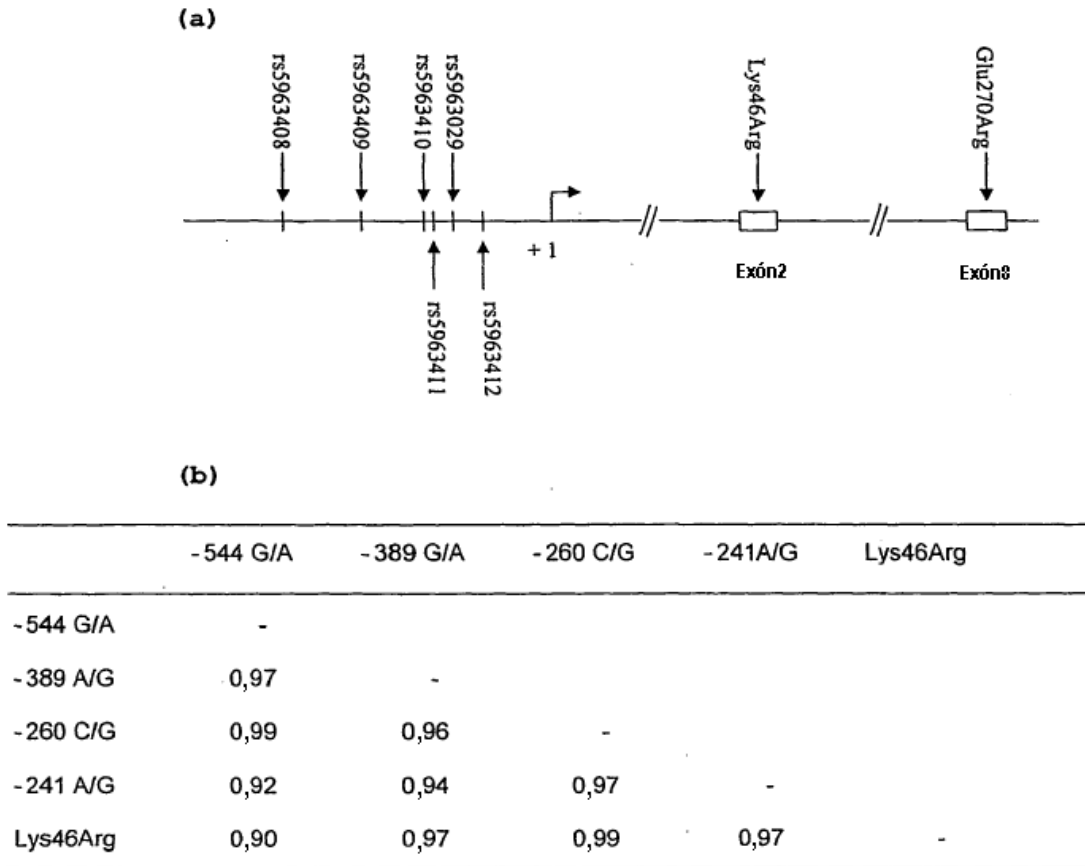
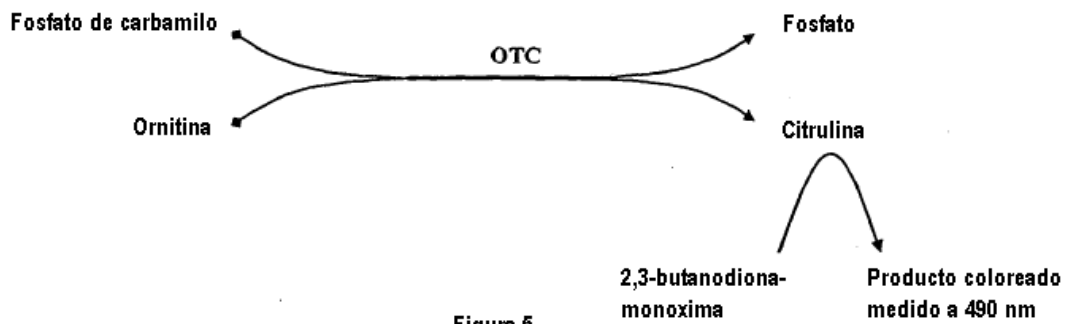


Figura 4



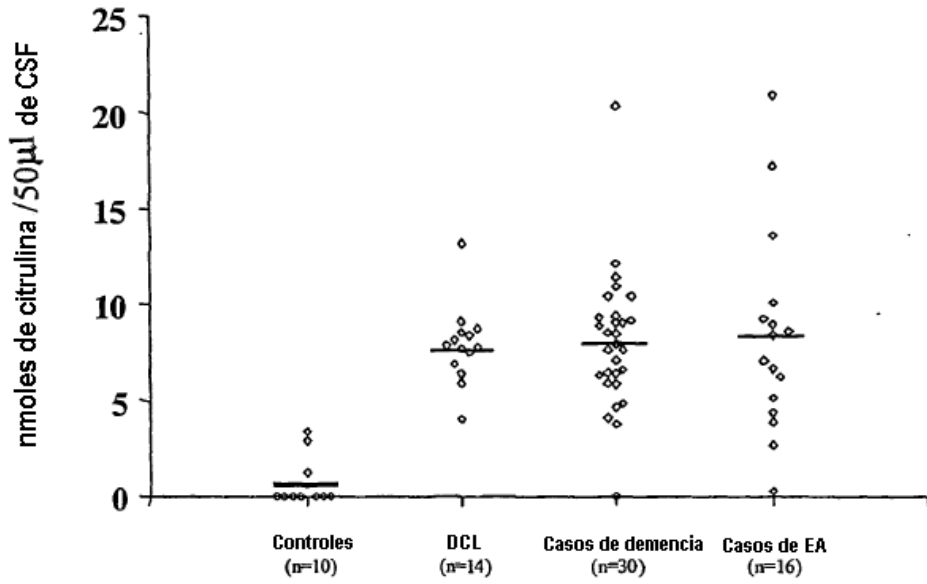


Figura 6

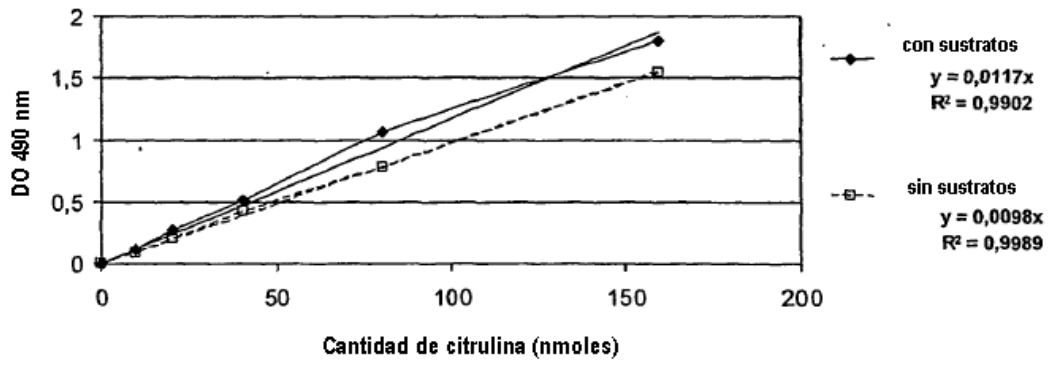


Figura 7

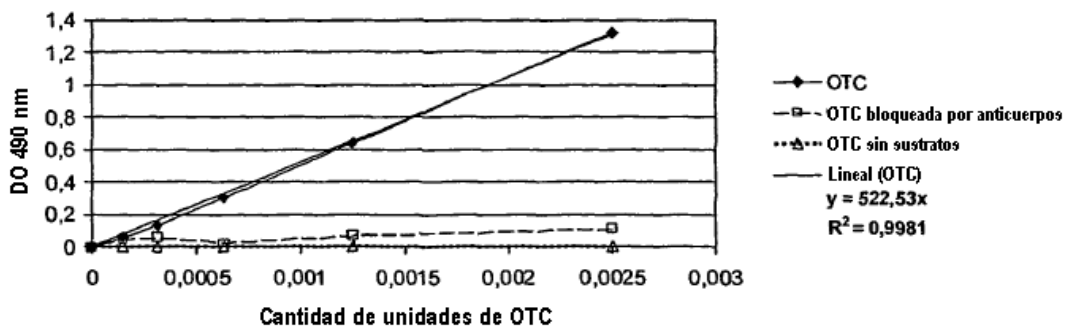


Figura 8