

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 995**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2013 PCT/US2013/035138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13152114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2013 E 13717121 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2834370**

54 Título: **Biomarcadores asociados con el síndrome del intestino irritable y la enfermedad de Crohn**

30 Prioridad:

**03.04.2012 US 201261619753 P**

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

**18.06.2019**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)  
1600 Huron Parkway 2nd Floor  
Ann Arbor, Michigan 48109, US**

72 Inventor/es:

**MERCHANT, JUANITA L. y  
GRASBERGER, HELMUT**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 716 995 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

Biomarcadores asociados con el síndrome del intestino irritable y la enfermedad de Crohn

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo DK055732 otorgado por los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención

### 5 **Material enviado electrónicamente**

Esta solicitud contiene, como una parte separada de la descripción, un Listado de Secuencias en forma legible por ordenador (nombre de archivo: 46907PCT\_SeqListing.txt; creado el 3 de Marzo de 2013, 1404 byte – archivo de texto ASCII) que se incorpora por referencia en su totalidad.

Referencias cruzadas a aplicaciones relacionadas

10 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Publicación de la Solicitud de Patente U.S. 2015/0065530 A1.

### **Campo de la invención**

15 La presente descripción proporciona composiciones y métodos para caracterizar un síndrome del intestino irritable. En particular, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para determinar polimorfismos asociados con IBS-D y la enfermedad de Crohn. La presente descripción proporciona además composiciones y métodos para determinar un tratamiento de acción en sujetos con IBS-D y enfermedad de Crohn.

### **Antecedentes**

20 Las anomalías en la señalización de serotonina (5-HT) se han implicado en la patogénesis de IBS. Cuando se inducen mediante señales lumbales químicas y mecánicas, las células enterocromafines (EC) liberan 5-HT, que estimula los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en neuronas aferentes primarias, que se alimentan en los reflejos peristálticos y secretomotores, regulando la motilidad intestinal y la secreción. <sup>1</sup> En pacientes con IBS con predominio de diarrea (IBS-D), las concentraciones de 5-HT en plasma postprandial empobrecidas en plaquetas son mayores en comparación con los pacientes con estreñimiento (IBS-C) y los controles sanos, <sup>2-5</sup> mientras que los pacientes con IBS-C tienen un aumento postprandial mitigado del 5-HT plasmático en comparación con los controles. <sup>3-6</sup> El 5-HT plasmático se deriva casi exclusivamente de las células EC del intestino que secretan 5-HT, <sup>7</sup> lo que sugiere que son paralelos a la biodisponibilidad de 5-HT de la mucosa en el intestino. En conjunto, estos hallazgos sugieren que las diferencias en los niveles de 5-HT de la mucosa están implicadas en el fenotipo clínico del hábito intestinal en IBS. Este concepto está respaldado indirectamente por los efectos beneficiosos de los agonistas del receptor 5-HT<sub>4</sub> en IBS-C y los antagonistas de 5-HT<sub>3</sub> en IBS-D.<sup>8</sup>

30 Un factor que podría modular la disponibilidad de 5-HT de la mucosa es la actividad o la expresión del transportador de recaptación selectiva (SERT) de 5-HT, que termina la acción hormonal y previene la desensibilización del receptor al eliminarlo del espacio intersticial. Si bien el mRNA del SERT se expresa ampliamente, las cantidades encontradas en el epitelio del intestino son muy bajas, particularmente en el colon. Por lo tanto, puede que no sea sorprendente que se hayan reportado resultados contradictorios con respecto al mRNA del SERT del colon en IBS.<sup>9-12</sup>

40 Posiblemente, la biosíntesis de 5-HT es otro proceso que influye potencialmente en la señalización de la mucosa. La triptófano hidroxilasa-1 (TPH1) es la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de 5-HT en las células EC y mastocitos. Tanto TPH1 como TPH2 se expresan en el intestino, pero TPH2 se expresa mediante neuronas entéricas y centrales, mientras que TPH1 es la enzima predominante en las células EC. <sup>13</sup> Aunque la actividad de TPH1 se controla a múltiples niveles incluyendo la regulación postraduccional, <sup>14</sup> pruebas recientes de estudios en animales indican que los cambios en la transcripción de TPH1 pueden afectar a los cambios proporcionales en los niveles de 5-HT intestinal y plasmático. <sup>15</sup> Por lo tanto, TPH1 es un gen candidato intrigante para las afecciones con la biodisponibilidad de 5-HT alterada según lo propuesto para los distintos subtipos de hábito intestinal en IBS.

45 Esta idea es la base para el desarrollo de un inhibidor de TPH oral que actúa localmente en la mucosa GI. <sup>15</sup> Un ensayo clínico reciente de fase II demostró la eficacia de este nuevo compuesto para aliviar los síntomas del IBS sin estreñimiento. <sup>16-18</sup> La respuesta clínica a la terapia se correlacionó con una disminución en la excreción de orina de 24 horas del metabolito ácido 5-hidroxiindolacético que refleja la biosíntesis de 5-HT reducida, lo cual es particularmente prometedor, ya que actualmente hay una falta de biomarcadores establecidos para predecir la respuesta al tratamiento en IBS.

50 Ravic et al. (2009), serotonin transporter gene polymorphisms in Crohn's disease. Polymorphisms in patients with Crohn's colitis and ulcerative colitis, Gastroenterology, Vol. 136, No. 5, p. A-212, Abstract S1204, describen un estudio para evaluar el posible papel de los polimorfismos de la proteína transportadora de la recaptación selectiva de serotonina (SERT) en la patogénesis de la enfermedad de Crohn y la posible diferencia en la expresión de los polimorfismos de SERT según diferentes fenotipos colónicos.

**Compendio de la invención**

La presente descripción proporciona composiciones y métodos para caracterizar un síndrome de intestino irritable. En particular, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para determinar los polimorfismos asociados con la IBS-D y la enfermedad de Crohn. La presente descripción proporciona además composiciones y métodos para determinar un tratamiento de acción en sujetos con IBS-D y enfermedad de Crohn.

La presente invención proporciona un método que comprende: a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de ácidos nucleicos para determinar que el sujeto tiene un polimorfismo del alelo A en rs7130929, y/o polimorfismo del alelo C en rs4537731, generando así un resultado del análisis genético de la triptófano hidroxilasa 1 (TPH1); y b) procesar el resultado del análisis genético de la TPH1 con un sistema informático para generar un resultado que indique que dicho sujeto debe recibir un medicamento antagonista de la serotonina.

En otras variantes se determina que el sujeto tiene el polimorfismo -347C. En algunas variantes, la SNP en el desequilibrio de ligamiento es -1066T/C. En otras variantes, el polimorfismo -347C es indicativo de IBS-D, y el polimorfismo -347A es indicativo de la enfermedad de Crohn en el sujeto. En realizaciones particulares, el método comprende además la etapa de determinar la presencia de uno o más polimorfismos seleccionados del grupo que consiste en rs10444225, rs10766452, rs10766453, rs1079785, rs11024462, rs11024465, rs12361971, rs2403246, rs4757610, rs4757611, rs6486403, rs7106970, rs7110238, rs7122118, rs7936469, rs7937368, rs7939791, rs7943526, rs7944348, rs7950705, y rs7950928 en el sujeto. El procesamiento se procesa con un sistema informático. En otras realizaciones, el sujeto es de ascendencia Caucásica y/o Asiática.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona métodos que comprenden: a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de SNP para determinar que el sujeto tiene un polimorfismo de -347 C/A en el promotor del gen de la TPH1, y/o un SNP en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo de -347 C/A, generando así un resultado del análisis genético de la TPH1; y b) procesar el resultado del análisis genético de la TPH1 con un sistema informático para generar un resultado que indica que el sujeto debería recibir un medicamento antagonista de la serotonina.

En aspectos adicionales, el medicamento antagonista de la serotonina se dirige a TPH. En otros aspectos, el medicamento es LX1031. En algunos aspectos, se determina que el sujeto tiene el polimorfismo de -347C. En aspectos adicionales, se determina que el sujeto tiene el polimorfismo de -1066T. En aspectos adicionales, el polimorfismo de -347C es indicativo de IBS-D, y el polimorfismo de -347A es indicativo de la enfermedad de Crohn en el sujeto.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto identificado como que tiene un polimorfismo de -347C en el promotor del gen de la TPH1, y/o un SNP en el desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo de -347C, que comprende: administrar al sujeto un medicamento antagonista de la serotonina. En aspectos particulares, el medicamento antagonista de la serotonina se dirige a TPH. En otras realizaciones, el medicamento es LX1031.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona métodos que comprenden: a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de ácidos nucleicos para determinar que el sujeto tiene un polimorfismo de -347 C/A en el promotor del gen de la TPH1, y/o un SNP en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo de -347 C/A; y b) administrar al sujeto un medicamento antagonista de serotonina.

En aspectos adicionales, la presente descripción proporciona equipos o sistemas de reactivos que comprenden: a) un medicamento antagonista de la serotonina, y b) un ensayo de detección de ácidos nucleicos para determinar que un sujeto tiene un polimorfismo de -347 C/A en el promotor del gen de la TPH1, y/o un SNP en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo de -347 C/A.

La presente invención proporciona un método que comprende: a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de ácidos nucleicos para determinar que el sujeto tiene un polimorfismo del alelo A en rs7130929, y/o un polimorfismo del alelo C en rs4537731; y b) identificar el sujeto como que tiene la enfermedad de Crohn y/o informar al paciente o al médico del paciente que el sujeto tiene la enfermedad de Crohn.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona métodos que comprenden: a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de ácidos nucleicos para determinar que el sujeto tiene un polimorfismo de -347C en el promotor del gen de la TPH1, y/o un SNP en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo de -347C; y b) identificar el sujeto como que tiene IBS-D y/o informar al paciente o al médico del paciente que el sujeto tiene IBS-D.

**Descripción de las figuras**

Figura1. Unión específica de alelo de EGR-1 al polimorfismo de -347 C/A del núcleo del promotor de la TPH1. (A) Ensayo de cambio de movilidad electroforética utilizando sondas específicas de alelo (-347C y -347A) y el extracto de proteína nuclear (NE) preparado a partir de células BON. La flecha abierta marca la posición de un complejo de proteínas con una unión preferencial al alelo -347A. La competencia específica (comp) se llevó a cabo por co-incubación con un exceso molar de 100 veces de sondas frías. (B) La expresión de la actividad de unión específica

de alelo -347 A en células BON sin suero (sin FBS) tratadas durante una hora con suero de bovino fetal al 20% (FBS), éster de forbol activante de la PKC (TPA), forskolina activadora de la adenilil ciclasa (FSK). (C) Experimentos de super-shift para determinar el factor nuclear inducido por TPA (200 nM; 1h) con unión preferencial al alelo -347 A. (D) Análisis de transferencia de Western de la expresión de EGR-1 en las células BON tratadas con FBS o TPA. Las cinéticas de la expresión de EGR-1 son compatibles con la inducción del factor nuclear que se une preferentemente al alelo A. (E) La localización de SNP de -347C/A en la posición -1 en relación con un motivo de reconocimiento de EGR noamericano de consenso. El alelo -347A corresponde al nucleótido preferido según la matriz de unión de EGR extendida determinada por la selección de un sitio de unión de DNA in vitro (representada como logotipo de secuencia).

Figura 2. Actividad específica de alelo del promotor proximal de la TPH1 (-568/+19) que comprende o el alelo C o el A en la posición -347. Los constructos informadores de luciferasa específicos de alelos se co-transfectaron con un plásmido de expresión vacío, el vector de expresión que codifica EGR-1, siRNA de control mezclado, o siRNA específico de EGR1 seguido de una estimulación con 200 nM de TPA durante 4 horas. Un vector de luciferasa de Renilla co-transfectado sirvió como control interno para la normalización. Los datos provienen de tres experimentos independientes, cada uno de ellos se llevó a cabo en transfecciones por triplicado y representan la actividad relativa del alelo A (como fracción de la actividad del alelo C).

Figura 3. Distribución de la frecuencia del genotipo del polimorfismo de -347C/A TPH1 en controles sanos y en pacientes con IBS y dentro de los subtipos del hábito intestinal de IBS definido por los criterios de Rome III. También se muestra la distribución de las frecuencias de genotipos con respecto a la raza y el origen étnico.

Figura 4. Expresión colónica del mRNA de TPH1 en pacientes con IBS. El nivel relativo de mRNA de TPH1 se determinó utilizando una qRT-PCR en tiempo real normalizada para la expresión de RNA ribosomal 18S. Los valores de expresión siguieron una distribución log-normal (ensayo de Kologorov-Smirnov). Las barras promedio y de error corresponden a las medias geométricas  $\pm$  95% CI (CI-margen de confianza). (A) Expresión de TPH1 en subtipos de hábitos intestinales de IBS. (B) Segregación de los niveles de mRNA de TPH1 en controles y pacientes con IBS con el genotipo 347C/-347C o -347C/-347A. Hay que tener en cuenta que solo se identificaron tres sujetos con el genotipo -347A/-347A entre los pacientes con biopsias de colon e información de genotipo (datos no mostrados).

Figura 5. Unión específica de alelo de EGR-1 al polimorfismo de -347C/A en el promotor del núcleo de TPH1. Análisis de EMSA utilizando extracto nuclear (NE\*) de células BON estimuladas con TPA (1 hora, 200 nM). Las reacciones de unión se realizaron con sondas específicas de alelo (-347C y -347A) e incluyeron anticuerpos (Ab) frente a SP1, SP3, ZBP-89 o GATA1.

## Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la presente invención, un número de términos y frases se definen a continuación:

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “detectar”, “que detectan” o “detección” pueden describir el acto general de descubrir o discernir o la observación específica de una composición marcada de manera detectable.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a cualquier organismo que se selecciona utilizando los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria. Dichos organismos incluyen preferiblemente, pero no se limitan a, mamíferos (por ejemplo, murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares), y lo más preferiblemente incluyen seres humanos.

El término “diagnosticado” como se utiliza en la presente memoria, se refiere al reconocimiento de una enfermedad por sus signos y síntomas, o el análisis genético, análisis patológico, análisis histológico, y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “molécula de ácido nucleico” se refiere a cualquier molécula que contiene ácido nucleico, incluyendo pero no limitado a, DNA o RNA. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de DNA y RNA conocidos incluyendo, pero no limitado a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

El término “gen” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, DNA) que comprende las secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o RNA (por ejemplo, rRNA, tRNA). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante siempre y cuando la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad

enzimática, unión de ligandos, transducción de la señal, inmunogenicidad, etc) de la longitud completa o de los fragmentos se mantenga. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y de las secuencias localizadas junto a la región codificante tanto en el extremo 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1Kb o más en cualquier extremo, de manera que el gen corresponda a la longitud del mRNA de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región codificante y presentes en el mRNA se denominan como secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en 3' o posteriores de la región codificante y presentes en el mRNA se denominan como secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto el cDNA como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en RNA nuclear (hnRNA); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "se empalman" desde el transcrito nuclear o primario; por lo tanto, los intrones están ausentes en el transcrito del RNA mensajero (mRNA). El mRNA funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido", se refiere a una cadena corta de una cadena de polinucleótidos monocatenaria. Los oligonucleótidos tienen típicamente menos de 200 residuos de largo (por ejemplo, entre 15 y 100), sin embargo, como se utiliza en la presente memoria, el término también pretende abarcar cadenas de polinucleótidos más largas. Los oligonucleótidos se refieren a menudo por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 residuos se denomina "24-mer". Los oligonucleótidos pueden formar estructuras secundarias y terciarias mediante autohibridación o mediante hibridación con otros polinucleótidos. Tales estructuras pueden incluir, pero no están limitadas a, dúplex, horquillas, cruciformes, curvas y triplex.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos "complementario" o "complementariedad" se utilizan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'," es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'.". La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se combinan según las reglas de emparejamiento de bases. O bien, puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácidos nucleicos. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre los ácidos nucleicos.

El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber una homología parcial o una homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que, al menos parcialmente, inhibe la hibridación de una molécula de ácido nucleico completamente complementaria a un ácido nucleico diana que es "sustancialmente homóloga". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana se puede examinar utilizando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga a una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede probar mediante el uso de una segunda diana que es sustancialmente no complementaria (por ejemplo, menos de aproximadamente 30% de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará a la segunda diana no complementaria.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "hibridación" se utiliza en referencia al emparejamiento de los ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ven afectadas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, el rigor de las condiciones involucradas, el  $T_m$  del híbrido formado, y la relación G:C dentro de los ácidos nucleicos. Una molécula individual que contiene el emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios dentro de su estructura se dice que está "auto-hibridada".

Como se utiliza en la presente memoria, el término "rigurosidad" se utiliza en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, bajo las cuales se realizan las hibridaciones de los ácidos nucleicos. En "condiciones de baja rigurosidad", una secuencia de ácidos nucleicos de interés se hibridará con su complemento exacto, secuencias con emparejamientos erróneos de bases individuales, secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, secuencias con una homología del 90% o más) y secuencias que tienen solo una homología parcial (por ejemplo, secuencias con una homología del 50-90%). En "condiciones de rigurosidad del medio", una secuencia de ácido nucleicos de interés se hibridará solo con su complemento exacto, secuencias con emparejamientos erróneos de bases individuales y secuencias de relación estrecha (por ejemplo, una homología del 90% o más). En "condiciones de alta rigurosidad", una secuencia de ácidos nucleicos de interés se hibridará solo a su complemento exacto, y (dependiendo de las condiciones de dicha temperatura) las secuencias con emparejamientos erróneos de bases individuales. En otras palabras, en condiciones de alta rigurosidad, la temperatura puede elevarse para excluir la hibridación a las secuencias con emparejamientos erróneos de bases individuales.

El término “aislado” cuando se utiliza en relación a un ácido nucleico, como en “un oligonucleótido aislado” o “polinucleótido aislado” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se identifica y se separa de al menos un componente o contaminante con el que está normalmente asociado en su origen natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o entorno diferente al que se encuentra en la naturaleza. En contraste, los ácidos nucleicos no aislados como ácidos nucleicos tales como DNA y RNA se encuentran en el estado en el que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de DNA dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped en las proximidades de los genes vecinos; las secuencias de RNA, tales como una secuencia de mRNA específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con muchos otros mRNAs que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que expresan normalmente la proteína dada cuando el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o está flanqueado por una secuencia de ácidos nucleicos diferente a la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado se puede presentar en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando se va a utilizar un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la cadena con sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener tanto cadenas con sentido como anti-sentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido pueden ser bicatenarios).

Como se utiliza en la presente memoria, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la eliminación de componentes (por ejemplo, contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos se purifican mediante la eliminación de proteínas no-inmunoglobulinas contaminantes; también se purifican mediante la eliminación de la inmunoglobulinas que no se unen a la molécula objetivo. La eliminación de proteínas no-inmunoglobulinas y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a la molécula objetivo da como resultado un aumento en el porcentaje de inmunoglobulinas reactivas de la diana en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células huésped bacterianas y los polipéptidos se purifican mediante la eliminación de las proteínas de la célula huésped; el porcentaje de polipéptidos recombinantes aumenta así en la muestra.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “muestra” se utiliza en su sentido más amplio. En un sentido, pretende incluir un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas o ambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener de animales (incluyendo seres humanos) y abarca fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. Dichos ejemplos, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

### Descripción detallada

La presente descripción proporciona composiciones y métodos para caracterizar un síndrome de intestino irritable. En particular, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para determinar polimorfismos asociados con IBS-D (diarrea asociada con IBS). La presente descripción proporciona además composiciones y métodos para determinar un tratamiento de acción en sujetos con IBS-D.

Las alteraciones en la señalización de 5-hidroxitriptamina (5-HT) se han implicado en hábitos intestinales alterados en el síndrome de intestino irritable (IBS). La triptófano hidroxilasa 1 (TPH1) es la enzima limitante de la velocidad para la síntesis de 5-HT en células enterocromafines. El trabajo realizado durante el desarrollo de los aspectos de la presente descripción buscó evaluar la función de la única variante promotora proximal de la TPH1 común (-347C/A; rs7130929) y su asociación con el predominio del hábito intestinal y la expresión de la TPH1 colónica en IBS. Como se describe en el siguiente ejemplo, se utilizaron los siguientes métodos. Se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética y ensayos indicadores de luciferasa para evaluar la función de -347C/A in vitro. La distribución del genotipo se determinó para 219 pacientes con IBS subtipificados utilizando los criterios Rome III y 312 controles sanos. La asociación con el hábito intestinal se probó utilizando un modelo de regresión logística multinomial que controla la raza y la ansiedad. La expresión del mRNA de la TPH1 de la mucosa colónica se midió en un subconjunto de sujetos (62 pacientes con IBS y 50 controles). Los ejemplos muestran que el factor de respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1) se unió a un sitio específico de alelo que comprende SNP de -347C/A y actividad promotora de la TPH1 modulada. Hubo una mayor prevalencia del genotipo CC en el subtipo IBS-D (56%) en comparación con los subtipos IBS-C (31%) y IBS-M (38%) ( $P=,05$ ) así como en los controles normales (42%). La expresión mucosal colónica de la TPH1 tendió a ser mayor en IBS-diarrea (IBS-D) versus IBS-estreñimiento (IBS-C) y en los pacientes con IBS que eran homocigotos para el alelo C. Esta palabra demostró que un promotor de la TPH1 funcional SNP de -347C/A está asociado con los subtipos del hábito intestinal IBS y la expresión de la TPH1 colónica compatible con un papel de la TPH1 en la modulación de la señalización de 5-HT intestinal.

### Métodos de diagnóstico y detección

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para detectar o diagnosticar IBS, en particular IBS-D. Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para identificar polimorfismos en el gen de la TPH1 asociado con IBS-D.

La presente descripción no está limitada a un polimorfismo de la TPH1 particular. En la presente invención, se analizan los polimorfismos en el promotor de la TPH1. El polimorfismo es una C en -347C/A (rs7130929), y/o una T en -1066T/C; (rs4537731). Polimorfismos adicionales útiles en las realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a SNPs en desequilibrio de ligamiento con -347C/A, y rs10444225, rs10766452, rs10766453, rs1079785, rs11024462, rs11024465, rs12361971, rs2403246, rs4757610, rs4757611, rs6486403, rs7106970, rs7110238, rs7122118, rs7936469, rs7937368, rs7939791, rs7943526, rs7944348, rs7950705, y rs7950928.

La presencia de un polimorfismo dado se puede determinar utilizando cualquier método adecuado. Ejemplos de métodos de análisis se describen a continuación.

#### A. Secuenciación

Los ejemplos ilustrativos no limitantes de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del terminador de cadena (Sanger) y secuenciación del terminador de colorante. Los expertos en la técnica reconocerán que debido a que el RNA es menos estable en la célula y más propenso al ataque de las nucleasas, el RNA se suele transcribir de manera inversa al DNA antes de la secuenciación.

La secuenciación del terminador de cadena utiliza la terminación específica de secuencia de una reacción de síntesis de DNA utilizando sustratos de nucleótidos modificados. La extensión se inicia en un sitio específico de la plantilla de DNA mediante el uso de un cebador oligonucleotídico radiactivo corto y otro marcado complementario a la plantilla en esa región. El cebador oligonucleotídico se extiende utilizando una DNA polimerasa, cuatro bases de desoxinucleótidos estándar y una concentración baja de un nucleótido de terminación de cadena, más comúnmente un di-desoxinucleótido. Esta reacción se repite en cuatro tubos separados con cada una de las bases escogiendo turnos como el di-desoxinucleótido. La incorporación limitada del nucleótido de terminación de cadena por la DNA polimerasa da como resultado una serie de fragmentos de DNA relacionados que se terminan solo en las posiciones donde se utiliza ese di-desoxinucleótido particular. Para cada tubo de reacción, los fragmentos se separan por tamaño mediante electroforesis en un gel de poliácridamida en placa o un tubo capilar lleno con un polímero viscoso. La secuencia se determina mediante la lectura de que carril produce una marca visualizada desde el cebador marcado a medida que se escanea desde la parte superior del gel hasta la parte inferior.

La secuenciación del terminador de colorante marca alternativamente los terminadores. La secuenciación completa se puede realizar en una sola reacción marcando cada uno de los terminadores de cadena de los di-desoxinucleótidos con un colorante fluorescente separado, que presenta fluorescencia a una longitud de onda diferente.

Se contempla una variedad de métodos de secuenciación de ácidos nucleicos para su uso en los métodos de la presente descripción incluyendo, por ejemplo, la secuenciación del terminador de cadena (Sanger), la secuenciación del terminador de colorante, y métodos de secuenciación de alto rendimiento. Muchos de estos métodos de secuenciación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1997); Maxam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560-564 (1977); Drmanac, et al., Nat. Biotechnol. 16:54-58 (1998); Kato, Int. J. Clin. Exp. Med. 2:193-202 (2009); Ronaghi et al., Anal. Biochem. 242:84-89 (1996); Margulies et al., Nature 437:376-380 (2005); Ruparel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5932-5937 (2005), y Harris et al., Science 320:106-109 (2008); Levene et al., Science 299:682-686 (2003); Korlach et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:1176-1181 (2008); Branton et al., Nat. Biotechnol. 26(10):1146-53 (2008); Eid et al., Science 323:133-138 (2009).

En algunas variantes, la tecnología proporcionada en la presente memoria encuentra su uso en una tecnología de secuenciación de Segunda Generación (también conocida como Next Generation o Next-Gen), Tercera Generación (también conocida como Next-Next-Gen), o Cuarta Generación (también conocida como N3-Gen) incluyendo, pero no limitado a, pirosecuenciación, secuenciación por ligación, secuenciación de una sola molécula, secuenciación por síntesis (SBS), clonal paralelo masivo, SBS de molécula única paralelo masivo, molécula única paralelo masiva en tiempo real, tecnología de nanoporos de moléculas únicas paralelo masivas en tiempo real, etc. Morozova y Marra proporcionan una revisión de algunas de dichas tecnologías en Genomics, 92: 255 (2008). Los expertos en la técnica reconocerán que debido a que el RNA es menos estable en la célula y más propenso al ataque de las nucleasas, experimentalmente el RNA se suele transcribir de manera inversa al DNA antes de la secuenciación.

Un número de técnicas de secuenciación del DNA se conocen en la técnica, incluyendo metodologías de secuenciación basadas en fluorescencia (Véase, por ejemplo, Birren et al., Genome Analysis: Analyzing DNA, 1, Cold Spring Harbor, N.Y.; incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad). En algunas variantes, la tecnología encuentra su uso en técnicas de secuenciación automatizadas entendidas en esa técnica. En algunas realizaciones, la presente tecnología encuentra su uso en la secuenciación paralela de amplicones particionados (Publicación de Patente PCT No: WO2006084132 por Kevin McKernan et al. En algunas variantes, la tecnología encuentra su uso en la secuenciación de DNA mediante la extensión paralela de oligonucleótidos (Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,750,341 de Macevicz et al.). Ejemplos adicionales de técnicas de secuenciación en las que la tecnología encuentra su uso incluyen la tecnología polony de Church (Mitra et al., 2003, Analytical Biochemistry 320, 55-65; Shendure et al., 2005 Science 309, 1728-1732; documentos de Patente U.S. Pat. No. 6,432,360, U.S. Pat. No. 6,485,944, U.S. Pat. No. 6,511,803), tecnología de pirosecuenciación 454 de

picotitros (Margulies et al., 2005 Nature 437, 376-380; documento de Patente US 20050130173), tecnología de adición de una sola base de Solexa (Bennett et al., 2005, Pharmacogenomics, 6, 373-382; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,787,308; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,833,246), tecnología de secuenciación paralela masiva de la firma de Lyns (Brenner et al., (2000). Nat. Biotechnol. 18:630-634; documento de Patente U.S. Pat. No. 5,695,934; documento de Patente U.S. Pat. No. 5,714,330), y la tecnología de colonias de PCR de Adessi (Adessi et al. (2000). Nucleic Acid Res. 28, E87; documento de Patente WO 00018957).

Los métodos de secuenciación Next-generation (NGS) comparten la característica común de las estrategias paralelas masivas y de alto rendimiento, con el objetivo de reducir los costes en comparación con los métodos de secuenciación más antiguos (véase, por ejemplo, Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296). Los métodos NGS se pueden dividir en términos generales en los que normalmente utilizan la amplificación de plantilla y los que no. Los métodos que requieren amplificación incluyen la pirosecuenciación comercializada por Roche como las plataformas de tecnología 454 (por ejemplo, GS 20 y GS FLX), la plataforma Solexa comercializada por Illumina, y la plataforma de ligamiento y detección de oligonucleótidos soportados (SOLiD) comercializada por Applied Biosystems. Los enfoques de no-amplificación, también conocidos como secuenciación de una sola molécula, se ejemplifican mediante la plataforma HeliScope comercializada por Helicos BioSciences, y las plataformas emergentes comercializadas por VisiGen, Oxford Nanopore Technologies Ltd., Life Technologies/Ion Torrent, y Pacific Biosciences, respectivamente.

En pirosecuenciación (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,210,891; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,258,568), el DNA plantilla se fragmenta, se repara en el extremo, se liga a los adaptadores y se amplifica clonalmente in situ al capturar moléculas de una sola plantilla con perlas que contienen oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. Cada perla que lleva un tipo de plantilla única se compartimenta en una microvesícula de agua en aceite, y la plantilla se amplifica por clonación utilizando una técnica denominada PCR de emulsión. La emulsión se rompe después de la amplificación y las perlas se depositan en pocillos individuales de una placa de picotitración que funciona como una célula de flujo durante las reacciones de secuenciación. La introducción iterativa ordenada de cada uno de los cuatro reactivos dNTP se produce en la célula de flujo en presencia de las enzimas de secuenciación y los informadores luminiscentes como la luciferasa. En el caso de que se agregue un dNTP apropiado en el extremo 3' del cebador de secuenciación, la producción resultante de ATP provoca una explosión de luminiscencia dentro del pocillo, que se registra con una cámara CCD. Es posible lograr longitudes de lectura mayores o iguales a 400 bases, y se pueden lograr  $10^6$  lecturas de secuencia, lo que da como resultado hasta 500 millones de pares de bases (Mb) de secuencia.

En la plataforma Solexa/Illumina (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7:287-296; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,833,246; documento de Patente U.S. Pat. No. 7,115,400; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,969,488), los datos de secuenciación se producen en forma de lecturas de menor duración. En este método, el DNA fragmentado monocatenario se repara para generar extremos romos fosforilados en 5'; seguido de la adición mediada por Klenow de una sola base A al extremo 3' de los fragmentos. La adición de A facilita la adición de los oligonucleótidos adaptadores de voladizo de T, que se utilizan posteriormente para capturar las moléculas adaptadoras de plantilla en la superficie de una célula de flujo que está tachonada con anclajes de oligonucleótidos. El anclaje se utiliza como un cebador de PCR, pero debido a la longitud de la plantilla y su proximidad a otros oligonucleótidos de anclaje cercanos, la extensión por PCR da como resultado "encima del arco" de la molécula para hibridar con un nucleótido de anclaje adyacente para formar una estructura de puente en la superficie de la célula de flujo. Estos bucles de DNA están desnaturalizados y escindidos. Las cadenas delanteras se secuencian después con terminadores de colorantes reversibles. La secuencia de nucleótidos incorporada se determina mediante la detección de la fluorescencia posterior a la incorporación, con cada flúor y bloque eliminado antes del siguiente ciclo de adición de dNTP. La longitud de lectura de la secuencia varía de 36 nucleótidos a más de 50 nucleótidos, con un rendimiento general superior a 1 billón de pares de nucleótidos por serie analítica.

La secuenciación de moléculas de ácidos nucleicos utilizando la tecnología SOLiD (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; documento de Patente U.S. Pat. No. 5,912,148; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,130,073) implica también la fragmentación de la plantilla, el ligamiento a los adaptadores de oligonucleótidos, la unión a las perlas y la amplificación clonal por PCR de emulsión. Después de esto, las perlas que llevan la plantilla se inmovilizan sobre una superficie derivatizada de una célula de flujo de vidrio, y se hibrida un cebador complementario al oligonucleótido adaptador. Sin embargo, en lugar de utilizar este cebador para la extensión de 3', en su lugar se utiliza para proporcionar un grupo fosfato 5' para la ligadura de las sondas de interrogación que contienen dos bases específicas de la sonda, seguidas de 6 bases degeneradas y una de cuatro etiquetas fluorescentes. En el sistema SOLiD, las sondas de interrogación tienen 16 posibles combinaciones de las dos bases en el extremo 3' de cada sonda, y uno de los cuatro flúores en el extremo 5'. El color del flúor, y por lo tanto la identidad de cada sonda, corresponde a esquemas que codifican espacios de color especificados. Múltiples vueltas (generalmente 7) de hibridación de sondas, ligamientos y detección de flúor son seguidas por desnaturalización, y luego una segunda vuelta de secuenciación utilizando un cebador que está compensado por una base con respecto al cebador inicial. De esta manera, la secuencia de plantillas se puede reconstruir computacionalmente, y las bases de plantillas se interrogan dos veces, lo que da como resultado una mayor precisión. La longitud de lectura de secuencia promedia 35 nucleótidos, y la producción general supera los 4

billones de bases por ejecución de secuenciación.

En ciertas realizaciones, se utiliza la secuenciación de nanoporos (véase, por ejemplo, Astier et al., J. Am. Chem. Soc. 2006 Feb 8; 128 (5):1705-10). La teoría por detrás de la secuenciación de nanoporos tienen que ver con lo que ocurre cuando un nanoporo se sumerge en un fluido conductor y se aplica un potencial (voltaje) a través de él. En estas condiciones, se puede observar una ligera corriente eléctrica debida a la conducción de iones a través del nanoporo, y la cantidad de corriente es extremadamente sensible al tamaño del poro. A medida que cada base de un ácido nucleico pasa a través del nanoporo, esto causa un cambio en la magnitud de la corriente a través del nanoporo que es distinto para cada una de las cuatro bases, lo que permite determinar, por lo tanto, la secuencia de la molécula de DNA.

En ciertas realizaciones, se utiliza la tecnología de HeliScope por Helicos BioSciences (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7:287-296; documento de Patente U.S. Pat. No. 7,169,560; documento de Patente U.S. Pat. No. 7,282,337; documento de Patente U.S. Pat. No. 7,482,120; documento de Patente U.S. Pat. No. 7,501,245; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,818,395; documento de Patente U.S. Pat. No. 6,911,345; documento de Patente U.S. Pat. No. 7,501,245). El DNA de plantilla se fragmenta y poliadenila en el extremo 3', con la adenosina final con un marcador fluorescente. Los fragmentos de plantilla poliadenilados desnaturalizados se ligan a oligonucleótidos poli (dT) en la superficie de la célula de flujo. Las localizaciones físicas iniciales de las moléculas de la plantilla capturada se registran con una cámara CCD, y después se separa la etiqueta y se lava. La secuenciación se logra mediante la adición de polimerasa y la adición en serie de reactivos de dNTP marcados fluorescentemente. Los sucesos de incorporación dan como resultado una señal de flúor correspondiente al dNTP, y la señal se captura mediante una cámara CCD antes de cada vuelta de adición de dNTP. La longitud de lectura de la secuencia varía de 25 a 50 nucleótidos, con una salida general superior a 1 billón de pares de nucleótidos por serie analítica.

La tecnología Ion Torrent es un método de secuenciación de DNA basado en la detección de iones hidrógeno que son liberados durante la polimerización del DNA (véase, por ejemplo, Science 327 (5970):1190 (2010); solicitudes de Patente U.S. Appl. Nos. 20090026082, 20090127589, 20100301398, 20100197507, 20100188073, y 20100137143). Un micropocillo contiene una cadena de DNA de plantilla para secuenciarse. Debajo de la capa de micropocillos está el sensor de iones ISFET hipersensible. Todas las capas están contenidas dentro de un chip semiconductor CMOS, similar al utilizado en la industria electrónica. Cuando se incorpora un dNTP a la cadena complementaria en crecimiento, se libera un ion de hidrógeno, lo que activa un sensor de iones hipersensible. Si las repeticiones de homopolímeros están presentes en la secuencia de la plantilla, se incorporarán múltiples moléculas dNTP en un solo ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados y una señal electrónica proporcionalmente más alta. Esta tecnología difiere de otras tecnologías de secuenciación en que no se utilizan nucleótidos u ópticas modificadas. La precisión por base de secuenciador Ion Torrent es de -99,6% para lecturas de 50 bases, con -100 Mb generados por ejecución. La longitud de lectura es de 100 pares de bases. La precisión para las repeticiones de homopolímero de 5 repeticiones de longitud es de -98%. Los beneficios de secuenciación de semiconductores iónicos son la velocidad de secuenciación rápida y los bajos costes iniciales y operativos.

En algunos aspectos, se utiliza el enfoque de secuenciación de ácidos nucleicos desarrollado por Stratos Genomics, Inc. e implica el uso de Xpandomers. Este proceso de secuenciación incluye típicamente proporcionar una cadena hija producida por una síntesis dirigida por la plantilla. La cadena hija generalmente incluye una pluralidad de subunidades acopladas en una secuencia correspondiente a una secuencia de nucleótidos contigua del todo o una porción de un ácido nucleico diana en el que las subunidades individuales comprenden un enlace, al menos una sonda o un residuo de nucleobase, y al menos un enlace selectivamente escindible. El enlace(s) selectivamente escindible (s) se escinde para producir un Xpandomer de una longitud más larga que la pluralidad de las subunidades de la cadena hija. El Xpandomer incluye típicamente los enlaces y los elementos indicadores para analizar la información genética en una secuencia correspondiente a la secuencia de nucleótidos contigua del todo o una parte del ácido nucleico diana. Después se detectan los elementos del informador de Xpandomer.

Los detalles adicionales relacionados con los enfoques basados en Xpandomer se describen, por ejemplo, en el documento de Patente U.S. Pat. Pub No. 20090035777, titulado "High Throughput Nucleic Acid Sequencing by Expansion," presentada el 19 de Junio de 2008.

Otros métodos de secuenciación de una sola molécula emergentes incluyen la secuenciación en tiempo real mediante síntesis utilizando una plataforma VisiGen (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-58, 2009; el documento de Patente U.S. Pat. No. 7,329,492; la solicitud de Patente U.S. Pat. App. Ser. No. 11/671956; la solicitud de Patente U.S. Pat. App. Ser. No. 11/781166) en la que se somete una plantilla de DNA cebada inmovilizada a una extensión de cadena utilizando una polimerasa modificada con fluorescencia y moléculas aceptoras fluorescentes, dando como resultado la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia detectable (FRET) tras la adición de nucleótidos.

## B. Hibridación

Los ejemplos ilustrativos no limitantes de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, hibridación *in situ* (ISH), micromatrices, y transferencia Southern o Northern.

La hibridación *in situ* (ISH) es un tipo de hibridación que utiliza una cadena de DNA o RNA complementaria marcada como una sonda para localizar una secuencia de DNA o RNA específica en una parte o sección de tejido (*in situ*), o, si el tejido es bastante pequeño, el tejido entero (base entera ISH). La ISH del DNA se puede utilizar para determinar la estructura de los cromosomas. La ISH del RNA se utiliza para medir y localizar mRNAs y otros transcritos (por ejemplo, TPH1) en secciones de tejido o bases completas. Las células y los tejidos de la muestra se tratan generalmente para fijar los transcritos diana en su lugar y para aumentar el acceso de la sonda. La sonda hibrida a la secuencia diana a una temperatura elevada, y luego el exceso de sonda se elimina por lavado. La sonda que se marcó con radio-, fluorescente- o bases marcadas con antígeno se localizan y cuantifican en el tejido utilizando autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente. La ISH también puede utilizar dos o más sondas, marcadas con radioactividad y otras etiquetas no radiactivas, para detectar simultáneamente dos o más transcritos.

En algunos aspectos, los polimorfismos se detectan utilizando hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH). En algunas realizaciones, los ensayos FISH utilizan cromosomas artificiales bacterianos (BAC). Estos se han utilizado ampliamente en el proyecto de secuenciación del genoma humano (véase Nature 409: 953-958 (2001)) y los clones que contienen BACs específicos están disponibles a través de distribuidores que pueden localizarse a través de muchas fuentes, por ejemplo NCBI. Cada clon BAC del genoma humano ha recibido un nombre de referencia que lo identifica de forma inequívoca. Estos nombres se pueden utilizar para encontrar una secuencia de GenBank correspondiente y para solicitar copias del clon a un distribuidor.

#### C. Micromatrices

Diferentes tipos de ensayos biológicos se denominan micromatrices, incluyendo, pero no limitado a: micromatrices de DNA (por ejemplo, micromatrices de cDNA y micromatrices de oligonucleótidos); micromatrices de proteínas; micromatrices de tejidos; transfección o micromatrices celulares; micromatrices de compuestos químicos; y micromatrices de anticuerpos. Una micromatriz de DNA, comúnmente conocida como chip genético, chip de DNA o biochip, es una colección de puntos microscópicos de DNA unidos a una superficie sólida (por ejemplo, chip de vidrio, plástico o silicio) que forman una matriz con el propósito de perfilar la expresión o controlar los niveles de expresión para miles de genes simultáneamente. Los segmentos de DNA adheridos se conocen como sondas, miles de las cuales se pueden utilizar en una sola micromatriz de DNA. Las micromatrices se pueden utilizar para identificar genes o transcritos de enfermedades (por ejemplo, TPH1) mediante la comparación de la expresión génica o el estado de mutación en la enfermedad y células normales. Las micromatrices se pueden utilizar utilizando una variedad de tecnologías, que incluyen pero no se limitan a: la impresión con alfileres de punta fina en portaobjetos de vidrio; fotolitografía utilizando máscaras prefabricadas; fotolitografía utilizando dispositivos de espejos dinámicos; impresión por chorro de tinta; o electroquímica en matrices de microelectrodos.

La transferencia de Southern y Northern se utiliza para detectar secuencias específicas de DNA o RNA, respectivamente. El DNA o RNA extraído de una muestra se fragmenta, se separa electroforéticamente en un gel de matriz, y se transfiere a un filtro de membrana. El DNA o RNA unido al filtro se somete a hibridación con una sonda marcada complementaria a la secuencia de interés. Se detecta la sonda hibridada unida al filtro. Una variante del procedimiento es la transferencia Northern inversa, en la que el ácido nucleico del sustrato que se adhiere a la membrana es una colección de fragmentos de DNA aislados y la sonda es RNA extraído de un tejido y marcado.

#### D. Amplificación

Los ácidos nucleicos (por ejemplo, TPH1) se pueden amplificar antes o simultáneamente con la detección. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), amplificación mediada por la transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). Los expertos en la materia reconocerán que ciertas técnicas de amplificación (por ejemplo, PCR) requieren que el RNA se transcriba de manera inversa al DNA antes de la amplificación (por ejemplo, RT-PCR), mientras que otras técnicas de amplificación amplifican directamente el RNA (por ejemplo, TMA y NASBA).

La reacción en cadena de la polimerasa (documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159 y 4,965,188), conocida comúnmente como PCR, utiliza múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de pares de cebadores en cadenas opuestas, y la extensión del cebador para aumentar exponencialmente los números de copias de una secuencia de ácidos nucleicos diana. En una variación llamada RT-PCR, la transcriptasa inversa (RT) se utiliza para crear un DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA, y el cDNA se amplifica después mediante PCR para producir múltiples copias de DNA. Para otras diversas permutaciones de la PCR, véase, por ejemplo, los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159; Mullis et al., Meth. Enzymol. 155: 335 (1987); y, Murakawa et al., DNA 7: 287 (1988).

La amplificación mediada por la transcripción (documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,480,784 y 5,399,491), denominados comúnmente como TMA, sintetiza copias múltiples de una secuencia de ácido nucleico diana autocatalíticamente en condiciones de temperatura sustancialmente constante, fuerza iónica, y pH en el que múltiples copias de RNA de la secuencia diana generan copias adicionales autocatalíticamente. Véase, por ejemplo,

los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,399,491 y 5,824,518. En una variación descrita en el documento de Patente U.S. Publ. No. 20060046265, TMA incorpora opcionalmente el uso de restos de bloqueo, restos de terminación, y otros restos de modificación para mejorar la sensibilidad y precisión del proceso de TMA.

5 La reacción en cadena de la ligasa (Weiss, R., Science 254: 1292 (1991), denominada comúnmente como LCR, utiliza dos conjuntos de oligonucleótidos de DNA complementarios que hibridan a regiones adyacentes del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de DNA se unen covalentemente mediante una DNA ligasa en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y ligación para producir un producto de oligonucleótido ligado bicatenario detectable.

10 La amplificación por desplazamiento de cadena (Walker, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396 (1992); documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,270,184 y 5,455,166), denominada comúnmente como SDA, utiliza ciclos de hibridación de pares de secuencias de cebadores para cadenas opuestas de una secuencia diana, extensión del cebador en presencia de un dNTPαS para producir un producto de extensión de un cebador hemifosforotido dúplex, corte por medio de endonucleasa de un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción hemimodificada, y extensión del cebador mediada por polimerasa desde el extremo 3' del corte para desplazar una  
15 cadena existente y producir una cadena para la siguiente vuelta de hibridación del cebador, cortando y desplazando la cadena, dando como resultado la amplificación geométrica del producto. La SDA termofílica (tSDA) utiliza endonucleasas termofílicas y polimerasas a temperaturas más altas en esencialmente el mismo método (documento de Patente EP No. 0 684 315).

20 Otros métodos de amplificación incluyen, por ejemplo: amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (documento de Patente U.S. Pat. No. 5,130,238), denominada comúnmente NASBA; una que utiliza una RNA replicasa para amplificar la propia molécula de la sonda (Lizardi et al., BioTechnol. 6: 1197 (1988)), denominada comúnmente como replicasa Qβ; un método de amplificación basado en la transcripción (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989)); y, replicación de la secuencia autosostenida (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874 (1990)). Para una discusión más detallada de los métodos de amplificación conocidos, véase Persing,  
25 David H., "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" in Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications (Persing et al., Eds.), pp. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC (1993)).

#### E. Métodos de detección

Los ácidos nucleicos no-amplificados o amplificados se pueden detectar por cualquier medio convencional. Por ejemplo, los polimorfismos de la TPH1 se pueden detectar por hibridación con una sonda marcada de forma  
30 detectable y la medición de los híbridos resultantes. A continuación se describen ejemplos ilustrativos no limitantes de métodos de detección.

Un método de detección ilustrativo, el ensayo de protección de hibridación (HPA) implica hibridar una sonda de oligonucleótido quimioluminiscente (por ejemplo, una sonda marcada con un éster de acridinio (AE)) a la secuencia diana, hidrolizando selectivamente el marcador quimioluminiscente presente en la sonda no hibridada, y midiendo la quimioluminiscencia producida a partir de la sonda restante en un luminómetro. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,283,174 y Norman C. Nelson et al., Nonisotopic Probing, Blotting, and Sequencing, ch. 17 (Larry J. Kricka ed., 2d ed. 1995).

Otro método de detección ilustrativo proporciona una evaluación cuantitativa del proceso de amplificación en tiempo real. La evaluación de un proceso de amplificación en "tiempo real" implica determinar la cantidad de amplicón en la  
40 mezcla de reacción de forma continua o periódica durante la reacción de amplificación, y utilizar los valores determinados para calcular la cantidad de secuencia diana inicialmente presente en la muestra. Una variedad de métodos para determinar la cantidad de secuencia diana inicial presente en una muestra basada en la amplificación en tiempo real son bien conocidos en la técnica. Estos incluyen los métodos descritos en los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 6,303,305 y 6,541,205. Otro método para determinar la cantidad de secuencia diana presente  
45 inicialmente en una muestra, pero que no está basado en la amplificación en tiempo real, se describe en el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,710,029.

Los productos de amplificación se pueden detectar en tiempo real mediante el uso de varias sondas de autohibridación, la mayoría de las cuales tiene una estructura de tallo-bucle. Dichas sondas de autohibridación se marcan de manera que emiten señales detectables de manera diferente, dependiendo de si las sondas están en un  
50 estado de autohibridación o un estado alterado a través de la hibridación a una secuencia diana. A modo de ejemplo no limitante, "las antorchas moleculares" son un tipo de sonda de autohibridación que incluye distintas regiones de autocomplementariedad (denominadas "dominio de unión a la diana" y "dominio de cierre de la diana") que están conectadas por una región de unión (por ejemplo, un enlazador no nucleotídico) y que se hibridan entre sí en condiciones de ensayo de hibridación predeterminadas. En una variante preferida, las antorchas moleculares  
55 contienen regiones de base monocatenaria en el dominio de unión diana que tiene una longitud de 1 a aproximadamente 20 bases y son accesibles para la hibridación a una secuencia diana presente en una reacción de amplificación en condiciones de desplazamiento de cadena. En condiciones de desplazamiento de cadena, se favorece la hibridación de las dos regiones complementarias, que pueden ser total o parcialmente complementaria, de la antorcha molecular, excepto en presencia de la secuencia diana, que se unirá a la región monocatenaria

presente en el dominio de unión diana y desplazará todo o una parte del dominio de cierre diana. El dominio de unión diana y el dominio de cierre diana de una antorcha molecular incluyen una etiqueta detectable o un par de etiquetas que interactúan (por ejemplo, luminiscentes/apagadores) colocadas de manera que se produzca una señal diferente cuando la antorcha molecular se autohibrida que cuando la antorcha molecular se hibrida a la secuencia diana, permitiendo, por lo tanto, la detección de la sonda: dúplex diana en una muestra de prueba en presencia de antorchas moleculares no hibridadas. Las antorchas moleculares y una variedad de tipos de pares de etiquetas que interactúan se describen en el documento de Patente U.S. Pat. No. 6,534,274.

Otro ejemplo de una sonda de detección que tiene auto-complementariedad es una "baliza molecular". Las balizas moleculares incluyen moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia complementaria diana, un par de afinidad (o brazos de ácido nucleico) que sostienen la sonda en una conformación cerrada en ausencia de una secuencia diana presente en una reacción de amplificación, y un par de etiquetas que interactúan cuando la sonda está en una confirmación cerrada. La hibridación de la secuencia diana y la secuencia complementaria diana separa los miembros del par de afinidad, desplazando así la sonda a una conformación abierta. El cambio a la conformación abierta es detectable debido a la interacción reducida del par de etiquetas, que puede ser, por ejemplo, un fluoróforo y un apagador (por ejemplo, DABCYL y EDANS). Las balizas moleculares se describen en los documentos de Patente U.S. Pat. Nos. 5,925,517 y 6,150,097.

Otras sondas de auto-hibridación son bien conocidas por los expertos en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, los pares de unión de sondas que tienen etiquetas que interactúan, tales como las descritas en el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,928,862 podrían adaptarse para su uso en la presente invención. Los sistemas de sondas utilizados para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) también podrían utilizarse en la presente invención. Los sistemas de detección adicionales incluyen "interruptores moleculares", como se describe en el documento de Patente U.S. Publ. No. 20050042638. Otras sondas, tales como las que comprenden colorantes intercalantes y/o fluorocromos, también son útiles para la detección de productos de amplificación. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,814,447.

En algunas variantes, los ácidos nucleicos se detectan y caracterizan mediante la identificación de una firma de composición de base única (BCS) utilizando espectrometría de masas (por ejemplo, Abbott PLEX-ID system, Abbot Ibis Biosciences, Abbott Park, Illinois,) descrito en los documentos de Patentes U.S. 7,108,974, 8,017,743, y 8,017,322.

#### F. Análisis de datos

En algunos aspectos, se utiliza un programa de análisis informático para traducir los datos sin procesar generados por el ensayo de detección (por ejemplo, la presencia, ausencia, o cantidad de un polimorfismo) en datos de valor predictivo para un médico. El médico puede acceder a los datos predictivos utilizando cualquier medio adecuado. Por lo tanto, en algunas variantes preferidas, la presente invención proporciona el beneficio adicional de que el médico, que probablemente no esté entrenado en genética o biología molecular, no necesita comprender los datos sin procesar. Los datos se presentan directamente al médico en su forma más útil. El médico puede utilizar inmediatamente la información para optimizar el cuidado del sujeto.

La presente descripción contempla cualquier método capaz de recibir, procesar, y transmitir la información hacia y desde los laboratorios que realizan los ensayos, información proporcionada, personal médico, y sujetos. Por ejemplo, en algunos aspectos de la presente descripción, una muestra (por ejemplo, una biopsia o una muestra de suero u orina) se obtiene de un sujeto y se envía a un servicio de perfiles (por ejemplo, laboratorio clínico en una instalación médica, negocios de perfiles genómicos, etc), localizados en cualquier parte del mundo (por ejemplo, en un país diferente al país donde reside el sujeto o donde se utiliza la información) para generar datos sin procesar. Cuando la muestra comprende un tejido u otra muestra biológica, el sujeto puede visitar un centro médico para obtener la muestra y enviarla al centro de perfil, o los sujetos pueden recoger la muestra ellos mismos (por ejemplo, una muestra de frotis de mejilla) y enviarla directamente a un centro de perfil. Cuando la muestra comprende información biológica determinada previamente, la información puede ser enviada directamente al servicio de perfiles por el sujeto (por ejemplo, una tarjeta de información que contiene la información puede ser escaneada por un ordenador y los datos transmitidos a un ordenador del centro de perfiles utilizando un sistema de comunicación electrónica). Una vez recibido por el servicio de perfiles, la muestra se procesa y se produce un perfil (es decir, datos de expresión), específico para la información de diagnóstico o pronóstico deseada por el sujeto.

Los datos del perfil se preparan después en un formato adecuado para la interpretación por parte de un médico tratante. Por ejemplo, en lugar de proporcionar datos de expresión sin procesar, el formato preparado puede representar un diagnóstico o evaluación de riesgo (por ejemplo, presencia o ausencia de un polimorfismo de la TPH1) para el sujeto, junto con recomendaciones para opciones de tratamiento particulares. Los datos pueden ser mostrados al médico por cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunos aspectos, el servicio de perfiles genera un informe que puede imprimirse para el médico (por ejemplo, un punto de atención) o mostrarlo al médico en un monitor de ordenador.

En algunos aspectos, la información se analiza primero en el punto de atención o en una instalación regional. Luego, los datos sin procesar se envían a un centro de procesamiento central para un análisis adicional y/o para convertir

los datos sin procesar en información útil para un médico o paciente. La instalación de procesamiento central proporciona la ventaja de la privacidad (todos los datos se almacenan en una instalación central con protocolos de seguridad uniformes), la velocidad y la uniformidad del análisis de los datos. La instalación de procesamiento central puede controlar entonces el destino de los datos después del tratamiento del sujeto. Por ejemplo, al utilizar un sistema de comunicación electrónico, la instalación central puede proporcionar datos al médico, al sujeto o a los investigadores.

En algunos aspectos, el sujeto puede acceder directamente a los datos utilizando el sistema de comunicación electrónico. El sujeto puede elegir una intervención adicional o asesoramiento basado en los resultados. En algunos aspectos, los datos se utilizan para uso de investigación. Por ejemplo, los datos se pueden utilizar para optimizar aún más la inclusión o eliminación de marcadores como indicadores útiles de una condición o etapa particular de la enfermedad o como un diagnóstico complementario para determinar el tratamiento de acción.

#### G. Composiciones y equipos de reactivos

Las composiciones para su uso en métodos de diagnóstico descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, sondas, oligonucleótidos de amplificación, y similares. La sonda y las composiciones de anticuerpos se pueden proporcionar también en la forma de una matriz.

#### H. Aplicaciones de diagnóstico complementarias

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para determinar un tratamiento de acción. Por ejemplo, en algunos aspectos, se determina el estado del polimorfismo de la TPH1 de un individuo (por ejemplo, utilizando los métodos descritos anteriormente). En algunos aspectos, a los sujetos que se encuentra que tienen un polimorfismo indicativo de IBS-D (por ejemplo, uno o más de los polimorfismos descritos en la presente memoria) se les administra un medicamento antagonista de la serotonina. En algunos aspectos, los medicamentos antagonistas de la serotonina se dirigen a la TPH. Los fármacos dirigidos a TPH son conocidos en la técnica. Los ejemplo incluyen, pero no se limitan a, LX1031 (disponible en, por ejemplo, Lexicon Pharmaceuticals, Woodland, TX).

### 25 Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### Identificación de SNP asociado con IBS-D

Este ejemplo describe la identificación del SNP de -347A/C como asociado con una diarrea crónica en pacientes con síndrome de intestino irritable.

### 30 Métodos

#### Sujetos de estudio humanos

Se reclutaron consecutivamente pacientes masculinos y femeninos con IBS y sujetos de control sanos que tenían al menos 18 años de edad y que participaban en estudios de investigación clínica en el Oppenheimer Family Center for Neurobiology of Stress en UCLA para proporcionar saliva para el análisis de DNA. Para el estudio de biopsia de colon, se reclutaron pacientes con IBS y controles sanos entre las edades de 18 y 55 años, aunque los sujetos no se reclutaron de forma consecutiva. El diagnóstico de IBS y el subtipo del hábito intestinal se determinó según los criterios de Roma III, <sup>19</sup>la ausencia de otras afecciones gastrointestinales (GI) crónicas que podrían explicar los síntomas de IBS y por un médico con experiencia en IBS. Los sujetos de control sanos se reclutaron mediante publicidad y no tenían antecedentes de IBS u otra GI crónica o afecciones dolorosas, y no estaban tomando medicamentos psicotrópicos o participando en psicoterapia. Se utilizaron cuestionarios validados para evaluar los síntomas de IBS. Los síntomas de depresión y ansiedad se midieron utilizando la escala de Ansiedad y Depresión (HAD) del Hospital. <sup>20</sup>Los sujetos se compensaron por su participación en el estudio. La Junta de Revisión Institucional de UCLA aprobó este estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos.

#### Genotipificación

La saliva para el aislamiento de DNA se recogió utilizando el equipo de reactivos Oragene DNA Self-Collection (DNA Genotek, Inc., Ottawa, Canadá). El DNA se extrajo en el núcleo de procesamiento de muestras biológicas de UCLA. Para la genotipificación de la variante de -347C/A por el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP), se amplificó un fragmento de 484 pares de bases mediante PCR de inicio rápido (Qiagen) con los cebadores

50 5'-CTGCGTGTATCTGACTGGTGT-3' (SEQ ID NO:1) y

5'-GGGATAAGGAGCTAATCGACTGA-3' (SEQ ID NO:2), se digirió con la enzima de restricción Ms/I (New England Biolabs) y se separó en gel de agarosa al 2%. Solo los aplicones del alelo A se cortaron en fragmentos de 207 pares de bases y 277 pares de bases. Los fragmentos de RFLP se confirmaron por secuenciación. Una región de 1149

5 pares de base la región promotora de TPH1 humano se amplificó utilizando Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) y los cebadores de oligonucleótidos 5'-CTGCGTGTATCTGACTGGTGT-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-GAAAGGTCTCTCCCTGACCA-3' (SEQ ID NO: 3) <sup>21</sup> en subconjuntos de las poblaciones de IBS y de control. Los alelos amplificados se secuenciaron después bidireccionalmente en el núcleo de secuenciación del DNA de UM. Se encontró un acuerdo perfecto entre los genotipos de -347C/A por RFLP y la secuenciación del DNA para las 436 muestras analizadas por ambos métodos.

#### Medición del RNA mensajero de la TPH1 en biopsias de colon

10 Se realizó una sigmoidoscopia flexible a al menos 40 cm del borde anal en la Unidad de Procedimientos Médicos de UCLA. Los sujetos se instruyeron para utilizar dos enemas de agua del grifo como la preparación intestinal. Durante la sigmoidoscopia, se tomaron biopsias del colon sigmoide a 30 cm del borde anal.

15 Para la detección del mRNA de la TPH1, 100 ng de RNA aislado de las biopsias del colon se transcribieron de manera inversa en cDNA utilizando el equipo de reactivos de PCR Taqman One-Step (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se incubaron con sondas fluorogénicas dobles (Applied Biosystems, Foster City, CA). El rRNA 18S se utilizó como un control endógeno y se detectó utilizando la sonda fluorogénica marcada doble (sonda 5'-FAM/3'-MGB, #Hs00188220), Applied Biosystems, Foster City, CA). Los niveles de mRNA para la TPH1 se cuantificaron utilizando un ensayo de PCR con 5'-nucleasa fluorogénica con un sistema de detección de secuencia por PCR en tiempo real rápido 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones duplicadas de cada estándar o muestra se desnaturalizaron durante 10 segundos a 95°C, y se sometieron a 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 3 segundos seguido por hibridación y extensión a 60°C durante 30 segundos.

#### 20 Cultivo celular

Se cultivaron células BON, una línea celular carcinoide pancreática humana que produce 5-HT <sup>22</sup> en DME/F-12 (1:1) suplementado con L-glutamina 2,5 mM, Hepes 15 mM, y suero de bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS). En experimentos de estimulación, las células se privaron de suero durante 24 horas, seguido por incubación durante 0,5 a 8 horas con FBS al 20% (20%), 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) 20-200 nM, o forskolina 10 µM.

#### 25 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

30 Los extractos de proteínas nucleares de las células BON se prepararon esencialmente como se describe <sup>23</sup>, y las concentraciones de las proteínas se determinaron mediante el método del ácido bicinonínico (ensayo BCA; Pierce Biotechnology) con curvas estándar de albúmina de suero bovino. Las sondas de cambio de banda se prepararon mediante <sup>32</sup> el marcaje en el extremo P de dos pares específicos de alelos de oligonucleótidos complementarios purificados con PAGE que corresponden a la región -361/-326 del promotor de la TPH1 (5'-CAGAAGCACAGAGA(g/t)GTGTGGGAGGTGGGGGATTC-3' – SEQ ID NO:4) utilizando Polinucleótido quinasa T4. El DNA dúplex ensamblado por hibridación de los oligonucleótidos complementarios marcados se purificó en una columna de centrifugación G50. Los DNAs bicatenarios competidores específicos se prepararon por hibridación de los oligonucleótidos no marcados. Las reacciones de unión contenían una sonda 0,5 pmol, 2 µg de extracto de proteína nuclear, 0,5 µg de DNA de esperma de salmón sonificado, y 0,5 µg de poli(dI-dC) (Amersham Biosciences) en un volumen total de 20 µl. Todas las reacciones de unión se llevaron a cabo en un tampón de unión que consiste en Hepes 20 mM (pH 7,9), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 50 mM, ZnSO<sub>4</sub> 100 µM, ditiotretitol 0,5 mM, y glicerol al 10%. Después de la incubación (10 minutos a temperatura ambiente seguido por 20 minutos en hielo), las muestras se cargaron en un gel de poli(acrilamida) al 5% (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1) y se separaron a 10 V/cm en 0,5 x TBE (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). Los geles secos se analizaron mediante autoradiografía. Para interferencia de anticuerpos, las mezclas de reacción que carecen de la sonda se incubaron durante 20 minutos en hielo con anticuerpos contra Sp1 (clon H225), Sp3 (D20), EGR-3 (C-24), EGR-1 (588 policlonal de conejo), GATA-1 (N6; todos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.), o ZBP-89, <sup>24</sup> antes de la adición de la sonda y el procesamiento adicional como se indicó anteriormente. Para los experimentos de competición, los DNAs competidores sin marcar en un exceso molar de 100 veces sobre la sonda marcada se incluyeron en las reacciones de unión.

#### Transferencia de Western

50 Las células BON se homogeneizaron en un tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, dodecil sulfato de sodio al 0,1%, deoxicolato de sodio al 0,5%, NP40 al 1%) que contenía una mezcla inhibitoria de proteasa (Complete; Roche, Indianapolis, IN). Se separaron cincuenta microgramos de proteína/pocillo en geles de SDS-poliacrilamida con gradiente de 4-20% en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de PVDF. Las transferencias se sondaron con anti-EGR-1 (S-25, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti-GAPDH (MAB374, Millipore).

#### Ensayos informadores de luciferasa

55 La región promotora de -568/+19 del gen de la TPH1 humano se amplificó utilizando los cebadores hacia adelante 5'-TATGGTACCTTTGGGATAAGGAGCTAATCGA-3' (SEQ ID NO: 5) y reverso 5'-TATCTCGAGTAGGTGCAGGCTGGTTCG-3' (SEQ IN NO: 6) del DNA genómico de sujetos homocigóticos para el alelo A- o C- del SNP de rs7130929 (-347C/A). Los dos productos se clonaron direccionalmente en los sitios de

restricción de *KpnI* y *XhoI* del vector informador de luciferasa sin promotor pGL3-basic (Promega) para generar -347A-Luc y -347C-Luc, respectivamente. Los plásmidos que contienen las secuencias del promotor de la TPH1 fueron inestables cuando se amplificaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* y se prepararon, por lo tanto, en la cepa Stb12 de *E. coli* (Invitrogen) cultivada a 30°C. Ambos constructos se confirmaron mediante secuenciación revelando una diferencia de un solo nucleótido correspondiente a los alelos de SNP de -347C/A esperados.

Un día antes de la transfección, BON se sembraron en placas de 24 pocillos sin antibióticos para obtener una confluencia del 90-95% en el momento de la transfección. Para cada experimento, las células cultivadas se transfectaron de forma transitoria por triplicado con 0,25  $\mu$ g/pocillo de los constructos informadores de la TPH1 utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) diluido en OptiMEM I libre de suero. Se cotransfectaron veinte ng/pocillo del plásmido pRL-Tk (Promega), que expresaba luciferasa de Renilla a partir de un promotor de la timidina quinasa, como un control interno. El medio se reemplazó por DME/F-12 fresco 8 horas después de la transfección. Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de EGR-1, las células se cotransfectaron con 0,2  $\mu$ g/pocillo de un vector de expresión de EGR-1 humano (Origene) o un vector pCMV6 vacío como el control, y la actividad de la luciferasa se midió a las 24 horas después de la transfección. En los experimentos de noqueo de EGR1, las células BON se cotransfectaron con 20 pmol/pocillo de siRNA de EGR1 (Silencer Select s4538; Invitrogen) o siRNA de control mezclado (control siRNA No. 2; Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección con siRNA, las células se estimularon durante 4 horas con TPA 200 nM antes de analizar la actividad de la luciferasa.

#### Análisis estadístico

Se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg para el SNP de la TPH1. Se probó un modelo genético de efecto aditivo entre los casos de IBS y los controles utilizando un ensayo de Cochran-Armitage para determinar la tendencia. Se utilizó una prueba exacta de Fisher para comparar los genotipos de la TPH1 con el hábito intestinal de Rome 3. La regresión logística multinominal se utilizó para predecir el hábito intestinal de Roma 3 del SNP de la TPH1 que controla la raza/etnia y la ansiedad de HAD en el conjunto completo de muestras y solo en los caucásicos. La razón de probabilidades ajustada (OR) y los intervalos de confianza del 95% correspondientes se reportaron a partir de los modelos. Los datos de mRNA de la TPH1 se transformaron logarítmicamente para lograr una normalidad aproximada y se reportaron los medios geométricos y el 95% CI. Se utilizó una prueba-t de dos muestras para comparar la expresión del mRNA de la TPH1 entre los casos de IBS y los controles, se utilizó ANOVA para comparar los niveles de mRNA de la TPH1 en el hábito intestinal, y se utilizó la correlación de Spearman para comparar la expresión génica a través de los genotipos de la TPH1 codificados de forma aditiva. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión 9.2 de SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) o la versión 2.14.0 de R. La significación se evaluó a un nivel de 0,05.

#### Resultados

##### Unión de proteínas nucleares específicas de alelo a la variante promotora de la TPH1 proximal

En este ejemplo, el promotor de la TPH1 humano se analizó para los elementos reguladores de consenso ZBP-89. Se identificaron varios sitios putativos en el promotor proximal con uno cerca de un SNP bialélico (en la posición -347 en relación con el sitio de inicio de la transcripción). Por lo tanto, se utilizó EMSA para evaluar la unión de proteínas nucleares a secuencias que comprenden el SNP de -347C/A del promotor de la TPH1. Las proteínas nucleares se extrajeron de las células BON, una línea celular carcinoide pancreática humana que produce 5-HT. Se encontró que las sondas EMSA para el alelo C- o A- en -347 estaban específicamente unidas mediante tres complejos proteicos (Figura 1A). Además, la EMSA reveló un complejo proteico distinto que se unía preferentemente a la sonda -347A. Dado que el elemento de DNA que contenía el SNP estaba flanqueado por un elemento rico en GC, se probó si los factores de transcripción con dedos de zinc representaban la unión diferencial de los complejos de proteínas al alelo A. Spl y en menor medida, ZBP-89 disminuyó la intensidad de los complejos superior e inferior respectivamente, mientras que parecía haber un pequeño efecto de los anticuerpos Sp3 y GATA1 (Figura 1A y Figura 5). Sin embargo, ninguno de estos factores explicaba el nuevo complejo de unión preferentemente al alelo A. Por lo tanto, se examinó si la unión al DNA fue inducida mediante vías de señalización comunes, por ejemplo, PKA activada por forskolina o PKC activada por ésteres de forbol. Se encontró que la actividad de unión específica del alelo se indujo de manera robusta en las células BON privadas de suero tratadas durante una hora con FBS o TPA, pero no con FSK (Figura 1B).

##### El factor de respuesta de crecimiento temprano 1 se une diferencialmente al sitio -347 de SNP de la TPH1

Dado que la rápida inducción por FBS y TPA es un rasgo característico de los genes tempranos inmediatos, se consideró la posibilidad de que la nueva proteína de unión al sitio -347A fuera un factor de transcripción temprano inmediato que reconozca las secuencias ricas en GC. Se sabe que pocos factores de transcripción con dedos de zinc aumentan rápidamente su unión en respuesta a señales proliferativas. Sin embargo, se sabe que los miembros de la familia EGR de factores de transcripción cumplen con estos requisitos. Por lo tanto, se utilizaron anticuerpos frente a EGR-1 y -3 para determinar la identidad de la actividad de unión específica del alelo. De hecho, los anticuerpos EGR-1, pero no EGR-3, modificaron completamente el complejo específico del alelo A (Figura 1C). Se demostró mediante la transferencia de Western que tanto TPA como FBS estimulan la expresión de la proteína

EGR-1 en células BON (Figura 1D). EGR-1 se indujo fuertemente dentro de una hora de la estimulación, especialmente con TPA, consistente con un aumento de la unión en los EMSA. Por lo tanto, los dos alelos del del SNP promotor de -347 de la TPH1 se unen diferencialmente a EGR-1. Cuando se revisó mediante simulación computacional, la matriz de peso extendida para los sitios de unión de EGR-1, se encontró que el SNP se encuentra adyacente (posición -1) a un sitio de reconocimiento de la familia EGR nonamérico que se superpone a un motivo de reconocimiento Spl (Figura 1E). Los estudios de selección del sitio de unión a DNA *in vitro* indican una fuerte preferencia por la adenina en -1 de la matriz de unión de EGR-1 extendida, <sup>25</sup> que es consistente con nuestros resultados de EMSA que muestran una unión preferente de EGR-1 al alelo A.

La actividad promotora de los alelos -347C/A de la TPH1 se modula diferencialmente por EGR-1

Habiendo establecido que el SNP de -347C/A común en el promotor de la TPH1 altera un sitio de unión a EGR1, se examinó a continuación si la unión diferencial de EGR-1 modulaba la actividad promotora de la TPH1. La región promotora proximal de la TPH1 humana (-568/+19) que contiene los alelos C o A se subclonó en un plásmido indicador de luciferasa y se transfectó en células BON. Para comparar la actividad relativa de los dos alelos en diferentes condiciones, la actividad del alelo A se expresó en relación con el alelo C. Los dos alelos de SNP no causaron la expresión del gen informador diferencial en células cultivadas en medio sin suero y se transfectaron con un plásmido de control sin injerto (relación de alelo A- a C--1; Figura 2). Sin embargo, la sobreexpresión de EGR-1 dio como resultado una expresión relativa mayor del alelo A. Para demostrar aún más la modulación diferencial de los alelos SNP de -347 por EGR-1, las células BON se transfectaron durante 48 horas con oligonucleótidos de siRNA combinados frente a EGR1 o siRNA de control mezclados seguido por la estimulación con TPA para activar EGR-1. En relación con el alelo C, el alelo A perdió actividad en las células transfectadas con siRNA de EGR1 pero no con siRNA de control (Figura 2). Así, estos resultados indican que el alelo A pero no el alelo C está fuertemente regulado por EGR-1. De esta manera, la variante -347C/A común modula la función de un elemento cis-regulador auténtico. Sin embargo, dado que los ensayos *in vitro* podrían no replicar completamente el impacto funcional de la variante -347 *in vivo*, se examinó la prevalencia de los dos alelos en pacientes con IBS, un trastorno aparentemente correlacionado con la expresión de la TPH1 y la señalización de 5-HT.

Asociación genética de la variante de -347C/A de la TPH1 con el subtipo del hábito intestinal de IBS

Para probar si la variante funcional del promotor de -347C/A TPH1 está asociada con distintos subtipos de hábito intestinal en IBS, 219 pacientes con IBS (clasificados por su fenotipo de hábito intestinal predominante según los criterios de Roma III) y 312 controles sanos se genotipificaron. Las características demográficas y clínicas pertinentes de los grupos de IBS y de control se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas de los sujetos incluidas en el estudio genético

	Controles (n=312)	IBS (n=219)	Valor de P
Hembras n (%)	232 (74%)	162 (74%)	,92
Edad (media±SEM)	30,53±0,61	37,16±0,85	,001
BMI (media±SEM)	24,3±0,26	25,24±0,38	,05
Raza/Etnia n (%)			,001
Caucásica	112 (36%)	124 (57%)	
Hispanica	61 (20%)	29 (13%)	
Asiática	79 (25%)	20 (9%)	
Afroamericana	41 (13%)	27 (12%)	
Otros/Multiracial	17 (5%)	16 (7%)	
Puntuaciones de HAD (0-21)			
Ansiedad	3,27±0,15	7,22±0,28	,001
Depresión	1,22±0,09	3,92±0,23	,001
Síntomas de IBS			
Gravedad general	-	10,31±0,31	
Subtipo de hábito intestinal n (%)			
IBS-C	-	43 (20%)	
IBS-D	-	43 (20%)	
IBS-M	-	124 (57%)	
IBS-U	-	9 (3%)	

IBS-C: estreñimiento-predominante; IBS-D: diarrea-predominante; IBS-M: patrón de mezcla; IBS-U: subtipo no especificado; BMI: índice de masa corporal; HAD: escala de ansiedad y depresión hospitalaria

En la muestra total, los pacientes con IBS eran mayores y tenían puntuaciones de los síntomas de ansiedad y depresión significativamente más altos que los controles, aunque la mayoría estaban dentro del intervalo normal.

No se encontró una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg para el SNP de -347C/A ( $P > .05$ ). Además, las frecuencias de los genotipos no difirieron entre los pacientes con IBS y los controles en general y dentro de cualquiera de los grupos de raza/etnia (Figura 3), lo que indica que el SNP de -347C/A no fue un factor de riesgo para el IBS.

Hubo una prevalencia significativamente mayor del genotipo CC en el subtipo IBS-D (56%) en comparación con los subtipos IBS-C (31%) e IBS-M (38%) ( $P = .030$ , Figura 3). Estas diferencias en el hábito intestinal siguieron siendo significativas en un modelo de regresión multinomial que predice el hábito intestinal a partir de genotipos de la TPH1 codificados adicionalmente que controlan la raza/etnia y la ansiedad ( $= .050$ ). En caucásicos, el grupo racial más grande dentro de la población de estudio, el alelo C fue más prevalente en los subtipos IBS-D frente a otros subtipos de hábito intestinal después de controlar la ansiedad ( $P = .070$ ). La razón de probabilidades para comparar la prevalencia del alelo C en IBS-D con IBS-C fue 2,3 (95% CI 0,92-5,74). En general, estos resultados indican que el polimorfismo de -347C/A en el promotor de la TPH1 proximal está asociado con predominio del hábito intestinal dentro de la población con IBS.

Para proporcionar una evidencia adicional de que la variante funcional de -347C/A puede desempeñar un papel causante en la asociación observada con el hábito intestinal en IBS, se revisó la estructura de haplotipos de la TPH1 utilizando datos de genotipos para diferentes poblaciones raciales y étnicas del proyecto HapMap. Se encontró que los SNP dentro de TPH1 estaban solo correlacionados débilmente con la región 5' anterior, tal como, -347C/A ( $r^2 < 0,6$ ), lo que indica que las variantes anteriores 5' residen en un bloque de haplotipos distinto. Para detectar la presencia de otras variantes en un fuerte desequilibrio de enlace con -347C/A en la población que puede contribuir a la asociación observada, la región promotora de la TPH1 extendida se secuenció hasta la posición -1292. Esto identificó un SNP adicional (-1066T/C; rs4537731) pero no otras variantes raras en la población racial y étnicamente diversa. Los genotipos para los dos SNP de -347 y -1066 estaban altamente correlacionados ( $r^2 \sim 1$ ) excepto para la subpoblación Afroamericana ( $r^2 \sim 0,45$ ) en la que se observaron tres haplotipos comunes de dos marcadores, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de los genotipos para dos variantes comunes del promotor de la TPH1 (-347C/A; -1066T/C), su correlación y frecuencias de haplotipos de dos marcadores estimadas en una población de pacientes con IBS (n = 158) y controles (n = 281)

	n	-347 (rs7130929)					-1066 (rs4537731)					haplotype frequencies f(-347/-1066)**				$r^2$ (-347/-1066)
		C/C	C/A	A/A	T/T	T/C	C/C	f(CT)	f(AC)	f(CC)	f(AT)					
<b>all ethnicities</b>																
Controls	283	120	129	32	110	132	39	0.626	0.343	0.030	0.000	0.877				
IBS	158	67	70	21	60	70	28	0.601	0.354	0.044	0.000	0.828				
$P^*$		0.742			0.469			0.611	0.917	0.418						
<b>Caucasian</b>																
Controls	103	38	53	12	38	53	12	0.621	0.379	0.000	0.000	1.000				
IBS	98	36	44	18	36	42	20	0.582	0.408	0.010	0.000	0.959				
$P^*$		0.477			0.364			0.611	0.866	0.495						
<b>Hispanic</b>																
Controls	57	22	28	7	21	28	3	0.614	0.377	0.009	0.000	0.964				
IBS	18	8	9	1	8	9	1	0.694	0.306	0.000	0.000	1.000				
$P^*$		0.473			0.367			0.575	0.773	1.000						
<b>Asian</b>																
Controls	68	45	17	6	45	17	6	0.787	0.213	0.000	0.000	1.000				
IBS	16	13	3	0	13	3	0	0.906	0.094	0.000	0.000	1.000				
$P^*$		0.162			0.162			0.505	0.505	-						

Las sondas EMSA que comprenden el alelo C o el alelo T en la posición -1066 no mostraron una unión específica de proteínas nucleares a partir de células BON. Estos resultados respaldan aún más la idea de que la variante de -

347C/A de la TPH1 influyó en el fenotipo del hábito intestinal en la cohorte de pacientes con IBS.

Asociación de la variante de -347C/A de la TPH1 con el mRNA de la TPH1 de la mucosa del colon

El mRNA de la TPH1 se midió en biopsias del colon obtenidas de 62 pacientes con IBS (15 IBS-D, 32 IBS-M, 14 IBS-C, 1 IBS-U) y 50 controles sanos (Tabla 4). De estos sujetos, 48 (77%) pacientes con IBS y 42 (84%) controles tenían la genotipificación de la TPH1.

5

Tabla 4. Características clínicas de sujetos incluidos en el estudio de la Expresión de la TPH1

	Controles (n=50)	IBS (n=62)	
Hembras n (%)	24 (48%)	35 (56%)	,40
Edad	39,79±1,77	40,52±1,61	,78
BMI	25,58±0,60	26,53±0,87	0,73
Raza/Etnia n (%)			
Caucásica	25 (50%)	13 (21%)	
Hispanica	5 (10%)	8 (13%)	
Asiática	6 (12%)	8 (13%)	
Afroamericana	12 (24%)	25 (40%)	
Otras/Multirraciales	2 (4%)	4 (6%)	
Puntuaciones de HAD (0-21)			
Ansiedad	3,41±0,39	7,25±0,69	,001
Depresión	1,59±0,39	4,15±0,56	,001
Síntomas de GI			
Gravedad general	NA	10,91±0,59	
Subtipo de hábito intestinal n (%)			
IBS-C	NA	14 (23%)	
IBS-D	NA	15 (24%)	
IBS-M	NA	32 (52%)	
IBS-U	NA	1 (2%)	

IBS-C: estreñimiento-predominante; IBS-D: diarrea-predominante; IBS-M: patrón de mezcla; IBS-U: subtipo no especificado; BMI: índice de masa corporal; HAD: escala de ansiedad y depresión hospitalaria

Los niveles de transcripción de la TPH1 tendieron a ser más altos en pacientes con IBS-D (media geométrica [CI 95%]; 610 [224-1664]) que en sujetos de control sanos (358 [267-481]; P = ,099) (Figura 4A, y Tabla 5).

10

Tabla 5. Expresión del mRNA de la TPH1 en biopsias de la mucosa del colon

	n	Media geométrica	CI 95%
Todos los sujetos con niveles del mRNA de la TPH1			
Controles*	50	358	267-481
IBS*	62	479	298-769
IBS-C	14	298	133-670
IBS-M	32	521	245-1108
IBS-D	15	610	224-1664
Sujetos con niveles del mRNA de la TPH1 y genotipo de la TPH1			
Controles	42		
-347C/-347C	20	280	172-454
-347C/-347A	19	404	248-659
-347A/-347A	3	423	73-246
IBS	48		
-347C/-347C	20	652	214-1990
-347C/-347A	25	388	193-781
-347A/-347A	3	398	32-5009

\*Ocho controles y 14 pacientes con IBS no tuvieron genotipo TPH1.

IBS-C: estreñimiento-predominante; IBS-D: diarrea-predominante; IBS-M: patrón de mezcla; IBS-U: subtipo no especificado

En controles sanos, hubo una tendencia no significativa para una mayor expresión de la TPH1 en heterocigotos (media geométrica [95% CI]; 404 [248-659] en comparación con los homocigotos CC (280 [172-454];  $P = 0,135$ ; Figura 4B y Tabla 5), consistentes con el análisis del promotor *in vitro* que muestra la expresión mejorada del alelo A después de la unión preferencial de EGR-1. En contraste, entre los pacientes con IBS, los heterocigotos (388 [193-781]) parecieron tener una menor expresión del mRNA de la TPH1 en comparación con los homocigotos CC (652 [214-1990]). Una explicación es la posibilidad de una mayor unión del promotor de EGR-1 en los controles no afectados pero una menor unión de los niveles de EGR-1 en individuos afectados por IBS. Sin embargo, estos resultados pueden confundirse por el predominio de pacientes con IBS que fueron homocigotos para el alelo -347C (8 C/C versus 3 A/C entre pacientes con IBS-D con biopsias de colon e información de genotipo) (Figura 4B), consistente con la asociación del alelo C con el subtipo IBS-D. Sin embargo, también se observó una tendencia hacia un mayor nivel de mRNA de la TPH1 en los homocigotos de alelo C en pacientes con IBS-M, el subtipo de hábito intestinal más predominante en este estudio (1402 [76-26029] para C/C versus 330 [179-609] C/A;  $F=0,141$ ). La segregación del alelo C con una mayor expresión del mRNA de la TPH1 en pacientes con IBS sería consistente con la asociación genética del alelo C con el subtipo IBS-D y la noción de una mayor biodisponibilidad de 5-HT en IBS-D.

#### Discusión

En este ejemplo, se identificó una variante funcional en el promotor de la TPH1 humana que se correlaciona con el subtipo de hábito intestinal en pacientes con IBS y también tiende a asociarse con la expresión del mRNA de la TPH1 en el tejido de la mucosa del colon. Estos resultados apoyan el papel de la TPH1 como un gen candidato para las afecciones con biodisponibilidad de 5-HT de la mucosa anormal, como se infiere previamente de los efectos de la dosificación de genes en modelos de animales.<sup>15</sup>

En la evaluación de las secuencias que comprenden el sitio de SNP de -347 para la unión a proteínas nucleares, se encontró que EGR-1 se unía preferentemente a la secuencia del alelo A. Este hallazgo es consistente con los estudios de selección de sitios de unión *in vitro* que muestran que la posición -1 adyacente a la secuencia de consenso de EGR canónica afecta a la afinidad de la unión de EGR-1.<sup>25</sup> EGR-1 es un importante mediador de una amplia gama de respuestas biológicas a desafíos medioambientales. Como un gen temprano inmediato, la EGR-1 se caracteriza por una fuerte inducción y, por lo tanto, es adecuada para afectar los cambios en la expresión de la TPH1 de la mucosa en respuesta a estresores psicológicos y lumbinales. En las células epiteliales intestinales, EGR-1 es un activador crucial tanto de la expresión génica inducida por la lesión<sup>26</sup> como de la respuesta aguda al estrés por inmersión-restricción del agua en ratas antes de la manifestación de la lesión de la mucosa.<sup>27</sup> La expresión de EGR-1 de la mucosa también se induce durante la inflamación crónica,<sup>28</sup> por agentes infecciosos, tales como, *Salmonella* Typhimurium<sup>29</sup> y *E. coli* enteropatogénico,<sup>30</sup> por una dieta enriquecida en material fermentable,<sup>31</sup> y en respuesta a la alimentación.<sup>32</sup> Todos estos retos medioambientales, así como los factores estresantes psicológicos implicados como desencadenantes de los síntomas de IBS, podrían posiblemente agudizar el desequilibrio de la expresión alélica secundaria al polimorfismo en -347C/A.

Aunque EGR-1 se considera un factor de transcripción activador, el efecto de la unión diferencial de EGR-1 al sitio de SNP de -347C/A es probablemente más complejo. El sitio de unión de EGR-1 se superpone a un motivo de reconocimiento para Sp1 que indica la competencia potencial de ambos factores para la unión del DNA como se muestra para otros motivos de unión EGR-1/Sp1 superpuestos.<sup>33-38</sup> Por lo tanto, se espera que los niveles relativos tanto de EGR-1 como Sp1 modulen la actividad del alelo -347A, que podría ser relativamente mayor (efecto activador de EGR-1 predominante) o menor (desplazamiento del Sp1 unido predominante) en comparación con el alelo -347C. En las células BON, un fragmento del promotor proximal aislado que alberga el alelo A mostró una expresión más fuerte en comparación con el alelo C solo en presencia de EGR-1, lo que indica que bajo estas condiciones experimentales, la transactivación por EGR-1 unido al promotor es el efecto predominante. De acuerdo con los datos *in vitro*, la expresión colónica de la TPH1 pareció ser mayor en sujetos sanos que llevaban el alelo A (heterocigotos -347C/-347A) en comparación con los homocigotos del alelo C (Figura 4B). En contraste, un efecto supresor de EGR-1 en el alelo A sería más congruente con los hallazgos en pacientes con IBS, mostrando una asociación del alelo C con IBS-D y una tendencia hacia una mayor expresión del mRNA de la TPH1 del colon en el alelo C homocigoto en comparación con los heterocigotos. Alternativamente, las señales que inducen síntomas de IBS podrían reducir la unión del promotor de EGR-1 en sujetos con el alelo A que favorecen niveles más bajos de mRNA de la TPH1 y 5-HT.

El único método para dilucidar adicionalmente el impacto de la unión diferencial de EGR-1 en la expresión de la TPH1 *in vivo* sería el análisis de la transcripción de la TPH1 específica del alelo en individuos heterocigóticos. Desafortunadamente, dado que la región promotora de la TPH1 se encuentra en un bloque de haplotipos separado de la estructura génica restante,<sup>39,40</sup> no hay variantes comunes en el mRNA de la TPH1 en correlación suficiente ( $r^2 > 0,8$ ) con el promotor de SNP que podría utilizarse como proxy razonable para -347C/A en el análisis de la expresión específica del alelo.

Mientras que los SNP intragénicos de la TPH1 forman un bloque de haplotipos distinto del SNP de -347C/A, otros SNP comunes en la región anterior 5' de la TPH1 están altamente correlacionados con -347C/A (Tabla 3). Un estudio reportó que para un haplotipo de tres marcadores que comprende los SNP en la posición -347C/A (rs7130929), -1066T/C (rs4537731), y -1605G/A (rs4757619), el haplotipo A-C-A menor tuvo una pérdida

5 pronunciada de actividad basal en comparación con el haplotipo C-T-G en ensayos de información. <sup>41</sup>Este ejemplo probó 1857 pares de bases de la región promotora extendida [-1838/+19] que representaba el C-T-G principal, el A-C-A menor, o el haplotipo C-C-G específico de África y no se observó una actividad basal más baja del haplotipo A-C-A en las células BON (datos no mostrados). El motivo de la discrepancia con el estudio anterior no está claro, pero podría estar relacionado con el uso de diferentes tipos de células.

10 La variante -347C/A no se asoció directamente con el diagnóstico de IBS. Este hallazgo es consistente con los resultados de un estudio reciente por Jun et al. en pacientes con IBS y controles sanos de hembras Caucásicas que muestran que la variante del promotor de -1066T/C, que se une al genotipo de -347C/A en este grupo racial (Tabla 3), no predice la susceptibilidad al IBS.<sup>40</sup> Más bien, el promotor de SNP predice el predominio del hábito intestinal. Sin embargo, Jun et al. encontraron que los pacientes que eran homocigóticos para el alelo menor de la variante del promotor de -1066T/C tenían una mayor gravedad de los síntomas de diarrea diaria en comparación con los otros dos genotipos, pero no había diferencias en el subtipo del hábito intestinal. Esto difiere de este Ejemplo, que mostró que los pacientes que eran homocigóticos para el alelo principal del SNP de -347 tenían más probabilidades de tener IBS-D frente a IBS-C. Este Ejemplo no midió los síntomas de IBS diarios. Es de destacar, que se encontró una asociación del subtipo de hábito intestinal similar de IBS-D con el alelo principal de la variante promotora de -1066T/C en la población de pacientes con IBS (datos no mostrados)

20 La asociación de una variante promotora funcional de la TPH1, que codifica la enzima que limita la velocidad para la síntesis de 5-HT de la mucosa intestinal, con subtipos de hábitos intestinales distintos en IBS sugiere una relación casual. Por lo tanto, la expresión génica diferencial de la TPH1 se predijo en pacientes con IBS según el subtipo (IBS-D > IBS-C) y el genotipo de -347C/A (alelo C > alelo A). Se encontró que la expresión de la mucosa colónica de la TPH1 tendía a ser mayor en pacientes con IBS-D en comparación con IBS-C y en los pacientes con IBS que eran homocigóticos para el alelo C. Este Ejemplo sugiere que los niveles de mRNA de la TPH1 dependen del genotipo de la TPH1, pero su influencia en los síntomas del hábito intestinal probablemente sea modificada por otros factores (por ejemplo, SERT, expresión del receptor de 5-HT).

25 En resumen, el trabajo realizado durante el desarrollo de la presente descripción ha identificado un SNP promotor de la TPH1 proximal que se segrega con consistencia de heces (hábito intestinal predominante) en una población de pacientes con IBS con diversidad racial y étnica. Esta variante afecta diferencialmente a la unión del factor de transcripción EGR-1, un producto génico de respuesta temprana que es suficiente para modular la expresión génica de la TPH1. Como resultado, el SNP fue predictivo de los niveles de mRNA de la TPH1 *in vivo* y podría desempeñar un valioso papel en la predicción de la respuesta de un paciente con IBS a una terapia serotoninérgica. Además, este Ejemplo sugiere que los distintos subtipos de hábito intestinal del IBS pueden verse afectados por el origen racial o étnico y están asociados con otros factores genéticos en los genes de la vía de 5-HT.

Ejemplo 2

35 Este Ejemplo describe la genotipificación en pacientes con la enfermedad de Crohn (CD). Los síntomas que se asemejan al IBS se encuentran frecuentemente en pacientes con la enfermedad de Crohn en remisión. Se encontró que esos pacientes tenían los niveles de Tph1 más altos en el colon en comparación con pacientes CD en remisión sin los síntomas similares a IBS y a controles sanos (Minderhoud et al., Clin Gastroenterol Hepatol. 2007 Jun; 5(6): 714-20).

40 Los resultados mostrados en la Tabla 6 demuestran la asociación de CD con el alelo A en -347. SNP de -347 C/A es, por lo tanto, útil en la estratificación de pacientes con CD para el tratamiento anti-serotoninérgico.

Tabla 6

Rs7130929 (C/A)	N (chr)	A/A	A/C	C/C	A	C
<b>CD (Cho)</b>	<b>100</b>	<b>0,320</b>	<b>0,440</b>	<b>0,240</b>	<b>0,540</b>	<b>0,460</b>
HapMap (CEU)	118	0,186	0,508	0,305	0,441	0,559
HapMap (YRI)	120	0,167	0,517	0,317	0,425	0,575
<b>UC (Cho)</b>	<b>100</b>	<b>0,140</b>	<b>0,400</b>	<b>0,460</b>	<b>0,340</b>	<b>0,660</b>
N-blanco (Chang)	294	0,120	0,480	0,410	0,354	0,646
N-todos (Chang)	610	0,110	0,470	0,420	0,348	0,652
HapMap (HCB)	88	0,068	0,364	0,568	0,250	0,750
SUNLAB (Chino)	388	0,005	0,433	0,562	0,222	0,778
HapMap (JPT)	88	0,023	0,386	0,591	0,216	0,784

		A/A	A/C	C/C	N (casos)	HWE
CD		16	22	12	50	y
HapMap (CEU)		11	30	18	59	y
UC		7	20	23	50	y
N-todos (Chang)		34	144	127	305	y
CD frente N-todos	A=alelo de riesgo					
			OR	95% CI		P
	AA vs CC		4,98	2,15-11,52		7E-05
	AA/ac vs CC		2,26	1,14-4,5		0,0179
	ac vs CC		1,617	0,77-3,4		0,2
	Tendencia de Cochran-Armitage					
			OR común			
			2,21			0,0002

**Referencias**

1. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: From basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007;132:397-414
- 5 2. Bearcroft CP, Perrett D, Farthing MJ. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: A pilot study. *Gut* 1998;42:42-46
3. Atkinson W, Lockhart S, Whorwell PJ, et al. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2006;130:34-43
- 10 4. Houghton LA, Atkinson W, Whitaker RP, et al. Increased platelet depleted plasma 5-hydroxytryptamine concentration following meal ingestion in symptomatic female subjects with diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut* 2003;52:663-670
5. Zuo XL, Li YQ, Yang XZ, et al. Plasma and gastric mucosal 5-hydroxytryptamine concentrations following cold water intake in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:2330-2337
- 15 6. Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, et al. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:349-357
7. Houghton LA, Atkinson W, Lockhart C, et al. Sigmoid-colonic motility in health and irritable bowel syndrome: A role for 5-hydroxytryptamine. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:724-731
- 20 8. Ford AC, Talley NJ, Schoenfeld PS, et al. Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Gut* 2009;58:367-378
9. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:1657-1664
- 25 10. Camilleri M, Andrews CN, Bharucha AE, et al. Alterations in expression of p11 and SERT in mucosal biopsy specimens of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132:17-25
11. Kerckhoffs AP, Ter Linde JJ, Akkermans LM, et al. Trypsinogen iv, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:900-907
- 30 12. Spiller R, Bennett A. Searching for the answer to irritable bowel syndrome in the colonic mucosa: Certainty and uncertainty. *Gastroenterology* 2007;132:437-441
13. Li Z, Chalazonitis A, Huang YY, et al. Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2011;31:8998-9009

14. Huang Z, Liu T, Chatteraj A, Ahmed S, et al. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J Pineal Res* 2008;45:506-514
15. Liu Q, Yang Q, Sun W, et al. Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325:47-55
- 5 16. Brown PM, Drossman DA, Wood AJ, et al. The tryptophan hydroxylase inhibitor LX1031 shows clinical benefit in patients with nonconstipating irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:507-516
17. Tack J, Janssen P, Wouters M, et al. Targeting serotonin synthesis to treat irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:420-422
18. Camilleri M. LX-1031, a tryptophan 5-hydroxylase inhibitor, and its potential in chronic diarrhea associated with increased serotonin. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:193-200
- 10 19. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-1491
20. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 1983;67:361-370
21. Boularand S, Darmon MC, Mallet J. The human tryptophan hydroxylase gene. An unusual splicing complexity in the 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 1995;270:3748-3756
- 15 22. Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., et al. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: Morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 1994;9:83-90
23. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, et al. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989;17:6419
- 20 24. Merchant JL, Iyer GR, Taylor BR, et al. Zbp-89, a kruppel-like zinc finger protein, inhibits epidermal growth factor induction of the gastrin promoter. *Mol Cell Biol* 1996;16:6644-6653
25. Swirnoff AH, Milbrandt J. DNA-binding specificity of ngfi-a and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 1995;15:2275-2287
26. Dieckgraefe BK, Weems DM. Epithelial injury induces egr-1 and fos expression by a pathway involving protein kinase C and ERK. *Am J Physiol* 1999;276:G322-G330
27. Ueyama T, Saika M, Koreeda C, et al. Water immersion-restraint stress induces expression of immediate-early genes in gastrointestinal tract of rats. *Am J Physiol* 1998;275:G287-G295
28. Subbaramaiah K, Yoshimatsu K, Scherl E, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* 2004;279:12647-12658
- 30 29. Bruno VM, Hannemann S, Lara-Tejero M, et al. Salmonella typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000538
30. De Grado M, Rosenberger CM, Gauthier A, et al. Enteropathogenic Escherichia coli infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect Immun* 2001;69:6217-6224
- 35 31. Chen Q, Swist E, Beckstead J, et al. Dietary fructooligosaccharides and wheat bran elicit specific and dose-dependent gene expression profiles in the proximal colon epithelia of healthy Fischer 344 rats. *J Nutr* 2011;141:790-797
32. Holt PR, DuBois RN, Jr. In vivo immediate early gene expression induced in intestinal and colonic mucosa by feeding. *FEBS Lett* 1991;287:102-104
- 40 33. Fukada T, Tonks NK. The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2001;276:25512-25519
34. Raychowdhury R, Schafer G, Fleming J, et al. Interaction of early growth response protein 1 (Egr-1), specificity protein 1 (Sp1), and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate response element binding protein (CREB) at a proximal response element is critical for gastrin-dependent activation of the chromogranin a promoter. *Mol Endocrinol* 2002;16:2802-2818
- 45 35. Bahouth SW, Beauchamp MJ, Vu KN. Reciprocal regulation of beta(1)-adrenergic receptor gene transcription by Sp1 and early growth response gene 1: Induction of EGR-1 inhibits the expression of the beta(1)-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 2002;61:379-390

36. Davis W, Jr., Chen ZJ, Ile KE, et al. Reciprocal regulation of expression of the human adenosine 5'-triphosphate binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2) promoter by the early growth response-1 (EGR-1) and Sp-family transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2003;31:1097-1107
37. Li X, Nie S, Chang C, Qiu T, et al. Smads oppose Hox transcriptional activities. *Exp Cell Res* 2006;312:854-864
- 5 38. Kubosaki A, Tomaru Y, Tagami M, et al. Genome-wide investigation of in vivo EGR-1 binding sites in monocytic differentiation. *Genome Biol* 2009;10:R41
39. Lai TJ, Wu CY, Tsai HW, et al. Polymorphism screening and haplotype analysis of the tryptophan hydroxylase gene (TPH1) and association with bipolar affective disorder in Taiwan. *BMC Med Genet* 2005;6:14
- 10 40. Jun S, Kohen R, Cain KC, et al. Associations of tryptophan hydroxylase gene polymorphisms with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:233-239, e116  
region of the tryptophan hydroxylase gene is associated with alcohol dependence in one aboriginal group in Taiwan. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1-7
42. Schneider TD, Stephens RM. Sequence logos: A new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6097-6100
- 15 43. Gaunt TR, Rodriguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: Implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'cubex'. *BMC Bioinformatics* 2007;8:428

**Listado de secuencias**

20 <110> UNIVERSITY OF MICHIGAN  
Merchant, et al.

<120> Biomarcador asociado con el síndrome del intestino irritable

25 <130> 30275/46907 PCT

<150> US-61/619, 753

<151> 2012-04-03

30 <160> 6

<170> Patente en versión 3.5

<210> 1

35 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador sintético

<400> 1

ctgcgtgtat ctgactggtg t

45 <210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador sintético

<400> 2

gggataagga gctaatcgac tga

55 <210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60 <220>

## ES 2 716 995 T3

<223> Cebador sintético  
<400> 3  
5 gaaaggtctc tccctgacca  
<210> 4  
<211> 36  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador sintético  
15 <400> 4  
cagaagcaca gagakgtgtg ggaggtgggg ggattc  
<210> 5  
20 <211> 31  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> Cebador sintético  
<400> 5  
tatggtacct ttgggataag gagctaatacg a  
30 <210> 6  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial  
35 <220>  
<223> Cebador sintético  
<400> 6  
40 tatctcgagt aggtgcaggc tgggtcg

**REIVINDICACIONES**

1. Un método que comprende:
- a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de ácidos nucleicos para determinar que dicho sujeto tiene un polimorfismo de alelo A en rs7130929, y/o un polimorfismo de alelo C en rs4537731; e
  - 5 b) identificar dicho sujeto como que presenta una enfermedad de Crohn y/o informar a dicho paciente o al médico de dicho paciente que dicho paciente presenta la enfermedad de Crohn.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinar la presencia de uno o más polimorfismos seleccionados del grupo que consiste en rs10444225, rs10766452, rs10766453, rs1079785, rs11024462, rs11024465, rs12361971, rs2403246, rs4757610, rs4757611, rs6486403, rs7106970, rs7110238, rs7122118, rs7936469, rs7937368, rs7939791, rs7943526, rs7944348, rs7950705, y rs7950928 en dicho sujeto.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento es procesado con un sistema informático.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es de ascendencia Caucásica y/o Asiática.
5. Un método que comprende:
- 15 a) analizar una muestra de un sujeto con un ensayo de detección de SNP para determinar que dicho sujeto tiene un polimorfismo del alelo A en rs7130929 y/o un polimorfismo del alelo C en rs4537731, generando así un resultado del análisis genético de la TPH1; y
  - b) procesar dicho resultado del análisis genético de la TPH1 con un sistema informático para generar un resultado que indique que dicho sujeto recibiría un medicamento antagonista de serotonina.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho medicamento antagonista de serotonina se dirige a TPH1.
- 20 7. El método de la reivindicación 5, que comprende además la etapa de determinar la presencia de uno o más polimorfismos seleccionados del grupo que consiste en: rs10444225, rs10766452, rs10766453, rs1079785, rs11024462, rs11024465, rs12361971, rs2403246, rs4757610, rs4757611, rs6486403, rs7106970, rs7110238, rs7122118, rs7936469, rs7937368, rs7939791, rs7943526, rs7944348, rs7950705, y rs7950928 en dicho sujeto.
8. El método de la reivindicación 5, en donde dicho análisis comprende realizar un ensayo in vitro.
- 25 9. Un medicamento antagonista de serotonina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn en un sujeto identificado como que tiene un polimorfismo del alelo A en rs7130929, un polimorfismo del alelo C en rs4537731, o tanto un polimorfismo del alelo A en rs7130929 como un polimorfismo del alelo C en rs4537731.
10. El medicamento antagonista de serotonina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn según la reivindicación 9, en donde dicho medicamento antagonista de serotonina se dirige a TPH1.

30

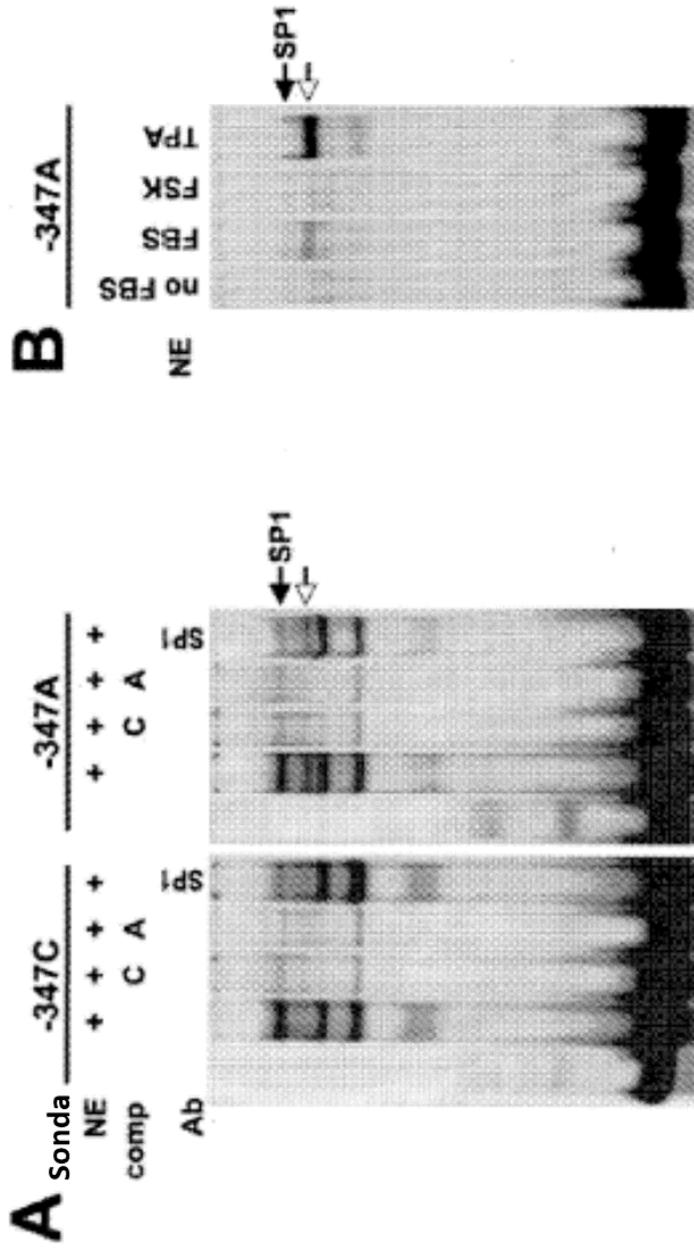


FIGURA 1



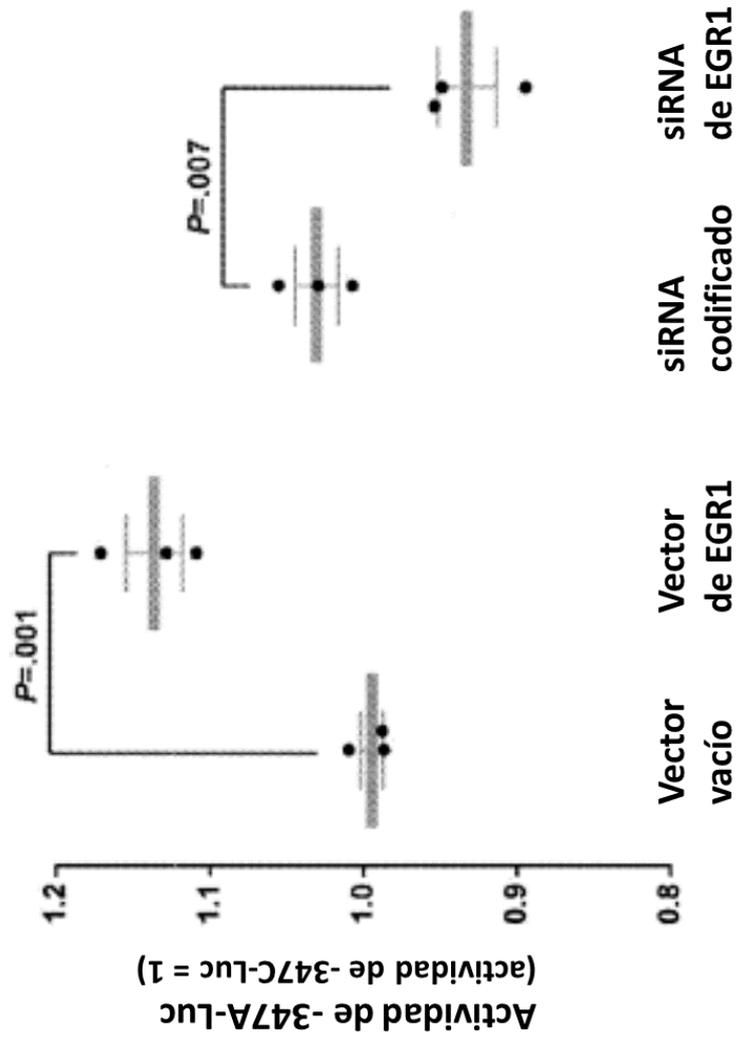


FIGURA 2

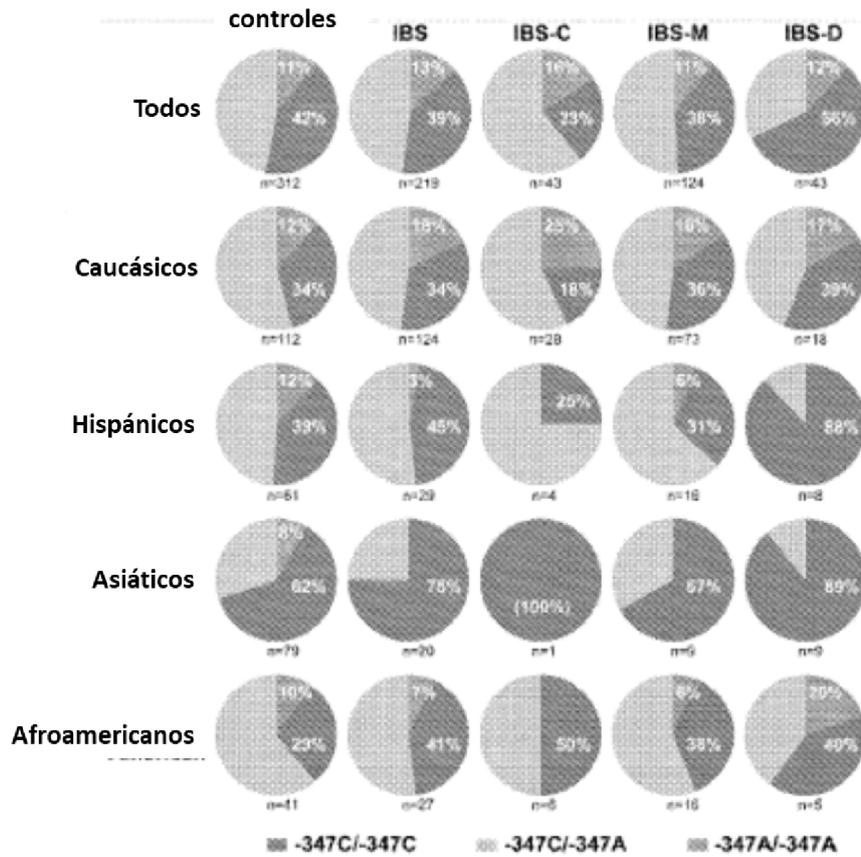


FIGURA 3

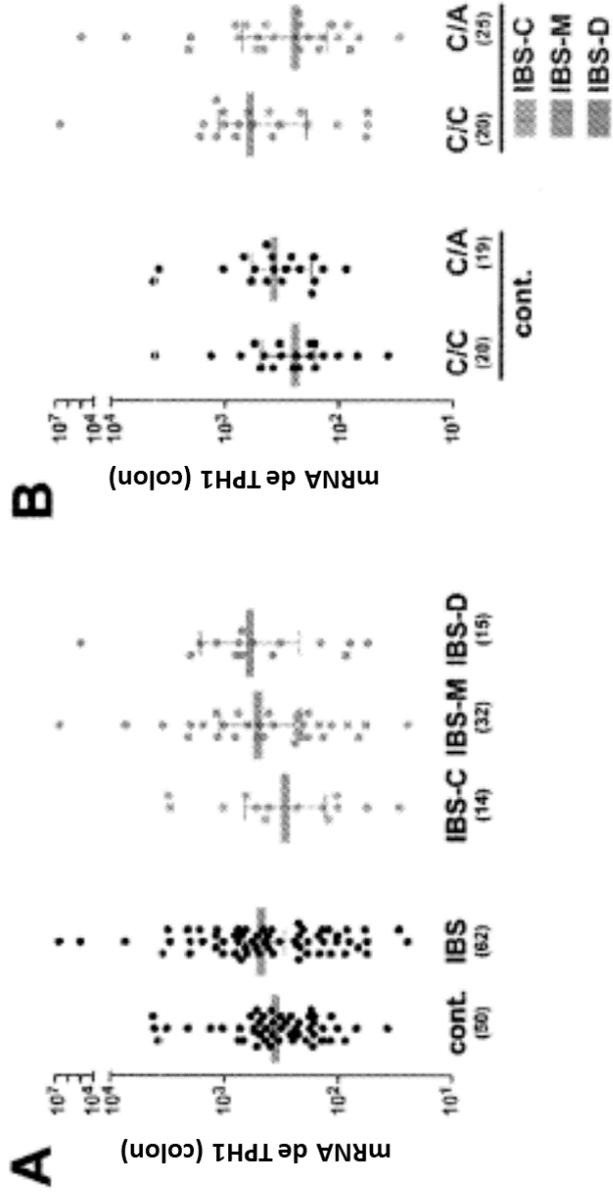


FIGURA 4

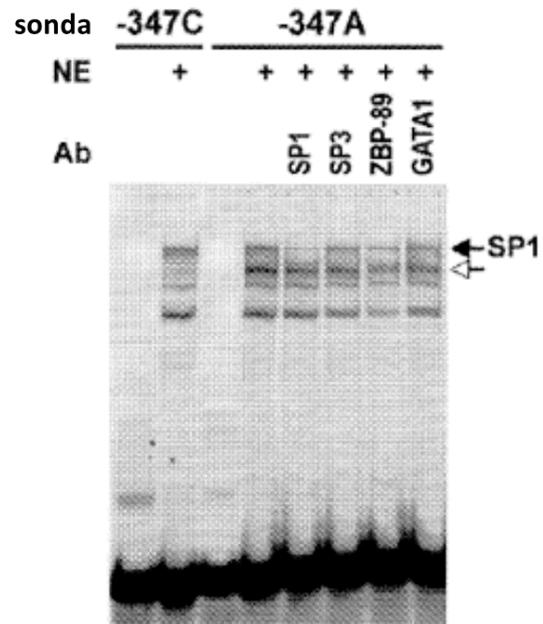


FIGURA 5