

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS SNPS ESPECÍFICOS DEL HAPLOTIPO 1 (H1) DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL RECEPTOR ENDOTELIAL DE LA PROTEÍNA C (EPCR)

P. Medina^a, F. España^b, H.L. Vos^a, R.M. Bertina^a

^aDepartment of Hematology, Hemostasis and Thrombosis Research Centre, Leiden University Medical Centre, Leiden, Holanda. ^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia

Introducción: El haplotipo H1 del EPCR está asociado con niveles elevados de proteína C activada circulante (APC), lo que podría ser debido a la expresión alterada del EPCR. El objetivo de este estudio fue analizar *in vitro* la funcionalidad de los SNPs específicos del H1 para identificar el(los) SNP(s) responsable(s) de la asociación observada en estudios previos. El H1 contiene 10 SNPs específicos de haplotipo, 4 en el intrón 1, 3 en el intrón 2, 1 en la región 3' no traducida (UTR) y 2 en la región flanqueante en 3'.

Métodos: Preparamos 3 series de construcciones utilizando un vector derivado de pGL3basic con el promotor CMV en el que clonamos los intrones 1 ó 2 del EPCR en la posición del primer intrón del DNA de la luciferasa, y clonamos la 3'UTR del EPCR y la región flanqueante *downstream* del DNA de la luciferasa. Los insertos se obtuvieron de individuos portadores del H1 ó H2 del EPCR, este último como control puesto que contiene la forma común de todos los SNPs. Transfectamos estas construcciones tanto en la línea celular endotelial ECRF24 como en células hepáticas HepG2, cotransfectando con una construcción de luciferasa de Renilla para corregir la eficiencia de transfección. Tras 24-48 horas de cultivo, medimos la actividad luciferasa de las células.

Resultados: Las construcciones que contienen el intrón 1 del H1 mostraron una reducción del 45% en la actividad luciferasa respecto de las construcciones que contienen el intrón 1 del H2 ($p=0.0286$). Las construcciones que contienen el intrón 2 del H1 mostraron un 29% menos de actividad luciferasa que las construcciones del H2 ($p=0.0712$). Finalmente, la actividad luciferasa de las construcciones que contienen la 3'UTR del H1 fue similar a la de las construcciones del H2. Los resultados en células HepG2 fueron similares a los obtenidos en células ECRF24.

Conclusiones: Los SNPs del H1 en el intrón 1 del gen del EPCR modulan su expresión, como sugiere la reducción significativa en actividad luciferasa de la construcción del intrón 1 del H1. La presencia de estos SNPs podría influir en la activación de la proteína C.

Ayudas FIS (PI050844, RED RECAVA RD06/0014/0004), Fundación Mutua Madrileña y Generalitat Valenciana (BE-02/06).