



Sección patrocinada por Menarini Diagnostics

Seminarios de diabetes

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y DE INGENIERÍA GENÉTICA APLICADAS A LA MEDICINA

¿Cómo diseñar un estudio genético? Extracción de ADN y ARN

How to design a genetic study? DNA and RNA extraction

F.J. Chaves, S. Martínez-Hervás^a, A.B. García-García

Laboratorio de Estudios Genéticos. Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

^aServicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Clínico Universitario de Valencia

Resumen

Un gran número de enfermedades tienen origen genético o están influidas por variantes genéticas. Algunas formas de diabetes son de origen monogénico (MODY y síndromes diabéticos) pero la más común, la diabetes mellitus tipo 2, es una enfermedad multifactorial causada por una interrelación entre variantes genéticas y ambientales. Hasta la fecha, se conoce poco acerca de la genética de la diabetes y sobre qué factores genéticos están implicados en su regulación y en el daño orgánico que se origina. El conocimiento de la genética de la diabetes mejorará la comprensión de esta enfermedad tan importante en nuestra sociedad, permitiendo una mejor prevención y tratamiento. El presente seminario pretende exponer los principales puntos que deben tenerse en cuenta cuando se diseña un estudio genético sobre diabetes (entre ellos el tipo de investigación, la patogenicidad de las variaciones o las asociaciones genotipo-fenotipo), así como explicar el fundamento para la extracción de ADN y ARN y las pautas para su almacenamiento.

Palabras clave: genética, mutación, polimorfismo, ARN, ADN.

Abstract

A wide number of diseases have a genetic origin or are influenced by genetic variants. Some forms of diabetes are monogenic (MODY and diabetic syndromes) but the most common one, type 2 diabetes, is a multifactorial disease caused by an interrelation of genetic variants and the environment. Up to date, little is known about the genetics of diabetes and genetic factors involved in its regulation and the associated organ damage. Understanding diabetes genetics will improve our understanding of such an important disease in our society, allowing a better prevention and treatment. The current seminar will try to point out the keys to take into account when planning a genetic study in diabetes research, such as the study type, variant pathogenicity, genotype-phenotype associations, etc., and will explain the DNA and RNA extraction methodology and storage guidelines.

Keywords: genetics, mutation, polymorphism, RNA, DNA.

Introducción

El conocimiento del genoma humano no sólo ha aumentado la información disponible sobre la secuencia de nuestro ácido desoxirribonucleico (ADN), sino que ha abierto las puertas a estudios muy variados que permitirán conocer mejor la genética de una patología y de sus variantes.

Fecha de recepción: 6 de noviembre de 2007
Fecha de aceptación: 15 de noviembre de 2007

Correspondencia:

Ana-Bárbara García-García. Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario. Avenida Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia.
Correo electrónico: a.barbara.garcia@uv.es

Lista de acrónimos citados en el texto:

ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; ARNm: ARN mensajero; DEPC: dietilpírocarbonato; DM: diabetes mellitus; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR: retro-PCR.

Se ha demostrado que en muchas enfermedades monogénicas la gravedad está relacionada con el tipo de mutación responsable. En otras ocasiones, variaciones del ADN que no son patogénicas pueden modular cómo se presenta la enfermedad e incluso la respuesta del paciente al tratamiento farmacológico. Finalmente, ciertas enfermedades y numerosos aspectos fenotípicos tienen un origen multifactorial en el que intervienen factores genéticos y ambientales, así como la interacción de ambos.

Existen dos tipos de ácidos nucleicos: el ADN y el ácido ribonucleico (ARN). Gran parte de la información de nuestro ADN se encuentra formando los genes. Un gen consta de un promotor (que regula la expresión del gen), de exones (que contienen información necesaria para codificar la proteína) y de intrones (zonas no codificantes pero que inclu-

yen las secuencias necesarias para el procesado del ARN mensajero [ARNm]). Básicamente, el ADN se transcribe a ARN, y éste se procesa (mediante la eliminación de las secuencias intrónicas y otras modificaciones) a ARNm, a partir del cual se sintetiza la proteína. Cada secuencia de tres nucleótidos (o codón) codifica un aminoácido, si bien algunos codones codifican señales de parada. El ADN de un individuo no varía entre tejidos, mientras que el ARN que codifica un determinado gen se expresa sólo en los tejidos donde la proteína deberá ejercer su función.

El ADN varía entre unos individuos y otros. Una mutación es un cambio en la secuencia del ADN, y en conjunto son responsables de la variabilidad genética entre los individuos. La mayoría de estos cambios no tienen efecto y se localizan en los intrones o en las secuencias extragénicas. Cuando una variación del ADN está presente en más del 1% de la población se le suele llamar «polimorfismo». Por otro lado, muchos autores identifican como «mutación» sólo aquellas variantes que causan una enfermedad.

Diversos estudios genéticos realizados sobre algunas formas de diabetes y síndromes relacionados han identificado genes directamente responsables de éstas o bien genes que confieren susceptibilidad para padecerlas¹. No obstante, la cantidad de genes conocidos hasta el momento es mucho menor de lo que cabría esperar dado el gran número de genes implicados, particularmente en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Actualmente se sabe más sobre genes responsables de fenotipos relacionados con un defecto de la función beta pancreática que de fenotipos de insulinoresistencia. En el caso de la DM1, en población caucásica se ha relacionado con combinaciones de varios polimorfismos genéticos (o haplotipos) en una región del cromosoma 6 denominada HLA². Asimismo, se han descrito genes responsables de diabetes monogénicas o relacionados con riesgo de DM2³⁻¹³ (tabla 1). También se han encontrado asociaciones entre genes responsables de formas monogénicas de DM y de DM2, como es el caso de la diabetes tipo MODY, ya que variaciones comunes en los genes *HNF1α* y *HNF4α* se han asociado con DM2, mientras que mutaciones raras son responsables de la forma MODY¹. La expresión de ciertos genes como el *UCP2* y el *UCP3* se ha asociado con obesidad y diabetes¹⁴.

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios genéticos en diabetes que permitan aumentar los conocimientos sobre las bases genéticas de la enfermedad y también acerca de qué factores modulan la expresi-

Tabla 1. Diabetes y genes relacionados

Tipos de diabetes		Genes implicados
Monogénicas	Diabetes neonatal transitoria	<i>ZAC</i>
		<i>HYMA 1</i>
		<i>KCNJ11</i>
		<i>ABCC8</i>
	Diabetes neonatal temprana	<i>KCNJ11</i>
		<i>ABCC8</i>
		<i>MODY</i>
	MODY	<i>GCK</i>
		<i>HNF1α</i>
		<i>HNF1β</i>
<i>HNF4α</i>		
Insulinoresistencia monogénica		<i>LMNA</i>
		<i>LMNB2</i>
	<i>PPARγ</i>	
Poligénicas	Diabetes mellitus tipo 2	<i>TCF7L2</i>
		<i>KCNJ11</i>
		<i>PPARγ</i>
		<i>CAPN10</i>
		<i>LMNA</i>
		<i>HNF1α</i>
		<i>HNF4α</i>
		<i>ENPP1</i>

ón de esta patología tan prevalente en la sociedad. Asimismo es fundamental conocer la importancia de la genética en la aparición del daño orgánico asociado a la diabetes, y en el riesgo cardiovascular^{15,16}.

Diseño de un estudio genético

El estudio genético de cualquier aspecto de la DM puede seguir el diseño de un estudio clínico. Podemos clasificarlos en varias categorías:

- Cuando existe manipulación de la variable que queremos investigar: estudios de observación o intervención.
- Cuando existe (o no) seguimiento de la población en el tiempo. Esta aproximación permite separar mejor la exposición del efecto. Los estudios se dividen en transversales (en los que no hay seguimiento y que permiten establecer la prevalencia de la enfermedad y del efecto en un momento determinado) y longitudinales (cuando sí se lleva a cabo un seguimiento de la población).

- Si la información que se pretende obtener es posterior o anterior al inicio del estudio, hablaremos de estudios retrospectivos (cuando comienza el estudio, el efecto y la exposición ya han sucedido) o prospectivos (en los que la variable que interesa se recoge tras haber comenzado el estudio).
- En función de si la población se selecciona atendiendo a la exposición o al efecto, tendremos estudios de cohorte o estudios «hacia delante», en los que la población ha sido seleccionada en función de una exposición en un periodo de tiempo y se quiere estudiar el efecto. Permiten estudiar varios resultados por factor de exposición, así como determinar la incidencia y el riesgo relativo, de modo que el control sobre la selección de los sujetos es mejor. Ahora bien, son estudios largos, costosos y pueden requerir grandes tamaños muestrales. Por otra parte, en los estudios caso-control la población se selecciona según esté presente (caso) o no (control) el efecto. Son más cortos y baratos que los anteriores, necesitan menor tamaño muestral y permiten estudiar episodios raros.

Dentro de los estudios genéticos, los estudios familiares son especialmente relevantes. Así por ejemplo, en el caso de las enfermedades monogénicas permite estudiar la transmisión de la enfermedad y su asociación con la presencia de una mutación patogénica concreta en familias amplias debidamente caracterizadas. La cosegregación de una posible mutación patogénica en familias más pequeñas puede no aportar información acerca de la patogenicidad, pero sí servir para identificar marcadores de riesgo. Por otro lado, los estudios en pares de gemelos monocigóticos permiten determinar cuánto de la enfermedad es aportado por la carga genética y cuánto por factores ambientales, ya que al poseer un ADN idéntico deberían desarrollar, teóricamente, las mismas enfermedades. Las diferencias en el fenotipo presentado por gemelos dicigóticos, en cambio, pueden ser debidas también a factores genéticos¹⁷.

La población debe encontrarse adecuadamente caracterizada (historia familiar, datos clínicos y bioquímicos de interés para el objetivo del estudio, etc.). Para llevar a cabo un estudio genético, debemos saber diferenciar entre un estudio diagnóstico (en el que vamos a buscar la causa de la enfermedad) y un estudio de asociación, como los que analizan relaciones genotipo-fenotipo (y en los que se buscarán asociaciones entre polimorfismos y rasgos clínicos, bioquímicos, antropométricos u otros de la enfermedad), ya que la forma de abordarlo será distinta en ambos casos. Finalmente, otros estudios buscan analizar las consecuencias de algunos factores sobre la expresión de genes.

Estudios para diagnosticar genes o mutaciones responsables de una enfermedad

En ellos se pretende identificar genes o mutaciones que sean responsables de la enfermedad de los pacientes. Este diagnóstico debe complementarse con el diagnóstico clínico y el estudio familiar. El diagnóstico genético puede ser indirecto o directo. En el diagnóstico genético indirecto se identifican haplotipos o marcadores asociados con la presencia de la enfermedad, pero no el defecto responsable en sí. En cambio, en el diagnóstico genético directo se identifica la mutación responsable de la patología. En el caso de familias con antecedentes de la enfermedad, el diagnóstico genético (tanto indirecto como directo) es muy útil porque permite la identificación rápida de posibles portadores y un inicio temprano del tratamiento, o bien la educación del niño en cuanto a hábitos de vida, e incluso el diagnóstico preimplantacional o prenatal.

Si sólo se pretende identificar una mutación, un marcador o un haplotipo asociado con la enfermedad, se necesitará ADN. Ahora bien, debe tenerse en cuenta una cuestión muy importante, sobre todo en el caso del diagnóstico genético directo: la presencia de una variación en un gen no implica que sea la causa de la enfermedad. Las mutaciones que tienen un efecto claro sobre la función final del gen son aquellas que suponen un gran reordenamiento del gen (alteran diferentes exones, modificando la estructura y secuencia de la proteína), un codón de parada temprano, o deleciones o inserciones de una o unas pocas bases en el ADN que modifiquen la pauta de lectura. Aquellas que producen el cambio de un aminoácido por otro, como las mutaciones puntuales o de cambio de sentido, pueden ser más difíciles de justificar teóricamente.

Existen bases de datos de mutaciones genéticas patogénicas. Para enfermedades hereditarias humanas, puede consultarse la Human Gene Mutation Database (Cardiff)¹⁸. Si nuestra mutación no está descrita, es recomendable analizar su presencia en una muestra amplia de población sana y estudiar su cosegregación en la familia. Para ello es necesario disponer de una población control para la enfermedad, así como de las familias de los individuos analizados.

Estudios de asociación genotipo-fenotipo

Se conoce como genotipo la información genética de un individuo, y como fenotipo la expresión visible, medible y funcional del genotipo de una persona. En estos estu-

dios se pretende establecer relaciones entre un rasgo genético y un rasgo que se manifiesta en el paciente; sería un ejemplo el estudio de polimorfismos genéticos que puedan modular la aparición de una enfermedad. Otro tipo de estudios de asociación son aquellos que analizan factores genéticos que se relacionan con factores de riesgo para una determinada enfermedad.

Para realizar este tipo de estudios de asociación genotipo-fenotipo, será necesario disponer de muestras de ADN. Asimismo, y puesto que se trata de estudios poblacionales, el tamaño de la muestra deberá ser el adecuado para obtener asociaciones estadísticamente significativas.

Es necesario seleccionar los genes y polimorfismos que se van a estudiar. También se pueden seleccionar polimorfismos distribuidos por todo el genoma, de forma que dispongamos de una muestra representativa de éste (sería el caso de los microchips de polimorfismos disponibles en diferentes casas comerciales). Polimorfismos candidatos a tener efecto son, en general, los que se encuentran en las zonas del gen responsables de su regulación (promotores) o los que originan algún cambio estructural (como los que cambian un aminoácido por otro). Existen diferentes técnicas para el análisis de polimorfismos que permiten analizarlos individualmente, o incluso varios o miles a la vez. Una introducción a estas técnicas se expondrá en otro artículo incluido próximamente en estos seminarios. En cualquier caso, es importante la selección de los genes y/o polimorfismos que se van a investigar antes de diseñar un estudio genético. En la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> pueden consultarse bases de datos sobre genes, con sus secuencias de ARN y ADN y las proteínas a las que dan lugar, enfermedades y genes implicados, polimorfismos identificados, etc. Otra dirección interesante para obtener esta información es <http://www.ensembl.org>.

Como en cualquier estudio clínico, es necesario que el paciente otorgue su consentimiento, que a su vez debe haber sido aceptado por el comité ético del centro donde se va a realizar. Desde el momento de la obtención de la muestra, ésta recibirá un código por el cual será conocida en el futuro, no figurando el nombre ni ningún otro dato confidencial en los mismos archivos que se generen con los resultados.

Estudios de expresión

Los estudios de expresión génica analizan si un gen expresa ARN en un tejido determinado. También es posible

cuantificar los niveles de un determinado ARN en un tejido o de todos los genes que se expresan en un tipo celular. Estos estudios son interesantes porque el nivel de ARN puede ser indicador de la enfermedad, o asociarse con un efecto o consecuencia de ésta. Una explicación más detallada de estos estudios requeriría un seminario propio, por lo que nos limitaremos a citarlos.

Extracción de ADN y ARN

Al plantearnos una extracción de ácidos nucleicos, los puntos que deben tenerse en cuenta son el tipo de ácido nucleico que queremos obtener y el tejido a partir del cual se va a extraer, así como las posibilidades de extracción y conservación de las muestras en condiciones óptimas. Podemos obtener ADN a partir de cualquier célula nucleada del individuo. La muestra de partida puede ser cualquier tejido o fluido. Sin embargo, no todos los genes expresan su ARN en todos los tejidos, con lo cual es necesario disponer de muestras de tejidos donde se expresen los genes que queremos estudiar.

En el caso de los adultos, el ADN se suele obtener a partir de la sangre, un fluido fácil de extraer y poco traumático para el paciente; en niños, puede obtenerse a partir de la saliva. Sin embargo, la extracción de ARN a partir de la sangre se complica debido a que el cociente proteína total/ARN en sangre es mucho mayor que en los tejidos sólidos, hecho que dificulta la obtención de ARN puro de alta calidad. Por otro lado, de todos los componentes celulares sanguíneos, sólo los leucocitos son nucleados y, por tanto, transcripcionalmente activos¹⁹. No obstante, debemos tener en cuenta que los eritrocitos inmaduros (reticulocitos) contienen algunos niveles de ácidos nucleicos que pueden dar falsos resultados²⁰. Este último problema puede evitarse con el aislamiento previo de algunos tipos celulares, por ejemplo con centrifugaciones en gradiente con Ficoll-Hypaque[®]. Otro punto importante que debe tenerse en cuenta en la extracción de ARN a partir de sangre es el anticoagulante empleado, ya que muchos genes pueden variar ampliamente su nivel de expresión a las pocas horas de la obtención de la muestra cuando se utiliza EDTA²¹. Por último, mediante el estudio del ARN de los leucocitos de pacientes diabéticos podremos conocer el efecto que tiene sobre ellos la propia enfermedad o el aumento de la glucemia, pero no cómo se ha desarrollado la DM.

La extracción del ácido nucleico debe efectuarse tan pronto como sea posible, con independencia de si el origen es sangre o tejido, y especialmente si lo que se pre-

tende es la obtención de ARN. Este requisito es difícil de cumplir en las biopsias de tejidos. En este caso, dichos tejidos deben congelarse rápidamente en nitrógeno líquido y almacenarse a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. De esta forma se consigue disminuir la actividad de las nucleasas (que podrían degradar el ADN y ARN) y evitar la modificación de los niveles de ARNm con el paso del tiempo debida a los cambios en la situación de la célula (se altera la expresión y degradación del ARN). También pueden homogeneizarse y almacenarse a esta temperatura en reactivos comerciales que lisan las membranas e inactivan las nucleasas estabilizando el ARN. En este caso, debe procederse a la extracción de los ácidos nucleicos dentro de un periodo determinado de tiempo, que variará en función del reactivo utilizado. Los tejidos más ricos en ARNasas son el páncreas y el bazo, por lo que se debe tener especial cuidado en su manejo.

El procedimiento general de obtención de ADN o ARN conlleva varios pasos: aislamiento de las células, ruptura de la membrana celular, aislamiento del ácido nucleico y purificación de éste. Existen varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos cuya elección dependerá del ácido nucleico concreto que se quiera obtener, del material de partida que se vaya a emplear (tejidos o fluidos, cultivos celulares, etc.), de la calidad que se necesite obtener y del uso al que se destine el ADN o ARN obtenidos, es decir, si se va a utilizar en PCR (reacción en cadena de la polimerasa), en RT-PCR (retro-PCR), en clonación, para marcaje, etc.

Otro aspecto que influye en la elección del procedimiento de extracción concreto es el organismo de partida, ya se trate de virus, vegetales, mamíferos u otros. Existen procedimientos comerciales basados en columnas o en partículas magnéticas muy sencillos de ejecutar y que permiten la obtención de ADN y ARN de muy buena calidad a partir de cualquier muestra que los contenga.

La calidad del ácido nucleico obtenido puede evaluarse de varias formas, por ejemplo, mediante espectrometría, evaluando el cociente A_{260}/A_{280} . Así, un ADN con un cociente mayor a 1,9 se considera de calidad adecuada para PCR, ensayos de restricción o Southern-Blot. En el caso del ARN, un cociente entre 1,6 y 2 es aceptable para RT-PCR, Northern-Blot, *microarrays* y otras aplicaciones. También puede evaluarse mediante electroforesis en geles de agarosa, biofotómetros, etc., técnicas todas ellas que permiten observar si existe degradación del ARN o si éste ha sido contaminado con ADN.

Tanto en la extracción de ácidos nucleicos como en su manejo es necesario adoptar una serie de precauciones. En primer lugar, el material empleado para la extracción debe ser estéril. Deben usarse guantes en todo momento para evitar contaminaciones. Una vez precipitado el ácido nucleico, debe prevenirse su fragmentación, evitando agitaciones muy fuertes (vórtex) o pipeteos violentos. En el caso del ARN hay que tomar más precauciones que con el ADN, debido a que las ARNasas degradan muy fácilmente el ARN y además tienen una presencia ubicua. Por ello, todo el material que esté en contacto con las células, además de ser estéril, deberá haber sido tratado previamente con agentes caotrópicos, como clorofórmico o dietilpirocarbonato (DEPC). Finalmente, aunque se haya descontaminado de ARNasas la superficie de trabajo y el material, cualquier roce con otra superficie o material no tratado puede reintroducir estas enzimas en la zona de trabajo.

Almacenamiento de muestras

Los ácidos nucleicos pueden almacenarse en un tampón apropiado o en agua. En el caso del ADN, el uso de tampones o agua pura no es de gran importancia si la muestra se va a utilizar en un periodo corto. Pero se recomienda la adición de tampones con Tris, EDTA poco concentrado y pH básico para tiempos de almacenamiento más largos, ya que un pH ligeramente ácido puede degradar el ADN, principalmente cuando éste se encuentra en baja concentración. Por supuesto, tanto el agua como el tampón deben ser estériles y estar libres de nucleasas, al igual que las puntas de pipetas utilizadas en su manejo. El ADN puede conservarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cortos periodos (meses), pero para tiempos más amplios se recomienda su congelación a -20 o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que de este modo se reduce su degradación y evaporación. Por el mismo motivo, es recomendable almacenar los ácidos nucleicos en alícuotas de poco volumen para evitar sucesivos ciclos de congelación y descongelación que podrían afectar a su calidad²². Con el fin de no perder las muestras, se recomienda almacenar varias alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por duplicado en dos congeladores conectados a grupos electrógenos distintos, para mayor seguridad, principalmente en el caso del ARN.

Conclusiones

En el planteamiento de un estudio genético debemos tener en cuenta si sus objetivos son diagnósticos, de asociación genotipo-fenotipo o de expresión.

No todas las variaciones del ADN son responsables de enfermedad: algunas son patogénicas, otras modulan el fenotipo presentado y otras no tienen ningún efecto.

En la extracción de ADN y ARN deben tomarse las precauciones adecuadas para evitar contaminaciones y la degradación por nucleasas. Una vez obtenida la muestra, es conveniente realizar la extracción de ARN lo más rápidamente posible.

Agradecimientos

REDIMET (RETIC Metabolismo y Nutrición RD06/0015/0015), Instituto de Salud «Carlos III». Proyectos SAF2005-02883 y CIT300100-2007-36 (Ministerio de Educación y Ciencia), y Acomp07-075 (Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia; Generalitat Valenciana). Los contratos de A.B. García-García, S. Martínez-Hervás y F.J. Chaves han sido subvencionados mediante los contratos «Juan de la Cierva» (MEC; Ref. 2004-998) y post-Formación Sanitaria Especializada (FIS; Ref. CM06/0060), y el de Investigadores para el SNS (FIS; Ref. 01/3047).■

Consideraciones prácticas

- El diseño de los estudios genéticos comparte muchas características con los estudios clínicos. Para llevar a cabo estudios de asociación genotipo-fenotipo será necesario disponer de muestras de ADN.
- En la búsqueda de genes o mutaciones responsables de una enfermedad, el diagnóstico genético debe complementarse con el diagnóstico clínico y el estudio familiar. En el caso de familias con antecedentes de la enfermedad, el diagnóstico genético permite la identificación rápida de portadores, un tratamiento precoz, e incluso el diagnóstico preimplantacional o prenatal.
- Para los estudios genéticos se necesitan muestras de células nucleadas. Es necesario tomar las precauciones establecidas para la conservación y tratamiento de las muestras, con el fin de evitar su contaminación y deterioro.

Bibliografía

- Owen KR, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:239-44.
- Gorodezky C, Alaez C, Murguía A, Rodríguez A, Balladares S, Vázquez M, et al. HLA and autoimmune diseases: type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmun Rev.* 2006;5:187-94.
- Hattersley AT, Pearson ER. Pharmacogenetics and beyond: the interaction of therapeutic response, beta-cell physiology, and genetics in diabetes. *Endocrinology.* 2006;147:2657-63.
- Pearson ER, Pruhova S, Tack CJ, Johansen A, Castleden HA, Lumb PJ, et al. Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4-alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia.* 2005;48:878-85.
- Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med.* 2007;4:E118.
- Reynisdóttir I, Thorleifsson G, Benediktsson R, Sigurdsson G, Emilsson V, Einarsson AS, et al. Localization of a susceptibility gene for type 2 diabetes to chromosome 5q34-q35.2. *Am J Hum Genet.* 2003;73:323-35.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdóttir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006;38:320-3.
- Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdóttir S, et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet.* 2007;39:218-25.
- Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, et al. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med.* 2006;84(suppl 12):1-10.
- Zeggini E, McCarthy MI. TCF7L2: the biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia.* 2007;50:1-4.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52:568-72.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARGgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2000;26:76-80.
- Tsuchiya T, Schwarz PE, Bosque-Plata LD, Geoffrey Hayes M, Dina C, Froguel P, et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes in Europeans: results of pooled and meta-analyses. *Mol Genet Metab.* 2006;89:174-84.
- Bao S, Kennedy A, Wojciechowski B, Wallace P, Ganaway E, Garvey WT. Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. *Diabetes.* 1998;47:1935-40.
- Broeckel U, Shiozawa M, Kissebah AH, Provoost AP, Jacob HJ. Susceptibility genes for end-organ damage. New strategies to understand diabetic and hypertensive nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:840-2.
- Sjakste T, Poudziunas I, Ninio E, Perret C, Pirags V, Nicaud V, et al. SNPs of PSMA6 gene – Investigation of possible association with myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus. *Genetika.* 2007;43:553-9.
- Beck-Nielsen H, Vaag A, Poulsen P, Gaster M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects – Experiences from relatives and twin studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17:445-67.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;21:577-81.
- Fan H, Hegde PS. The transcriptome in blood: challenges and solutions for robust expression profiling. *Curr Mol Med.* 2005;5:3-10.
- Lakshmi V, Madabusi LV, Latham GJ, Andruss BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol.* 2006;411:1-14.
- Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem.* 2002;48:1883-90.
- Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res.* 2003;543:217-34.