

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ANALISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACION
DE LA CARDIOMIOPATIA DILATADA LIGADA
AL CROMOSOMA X

POR

MC. ROCIO ORTIZ LOPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

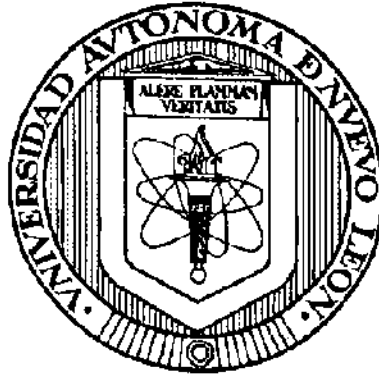
Agosto, 1999

TD
RC685
.M9
O7
c.1



1080095048

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DE LA CARDIOMIOPATÍA
DILATADA LIGADA AL CROMOSOMA X**

POR

MC. ROCIO ORTÍZ LÓPEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética**

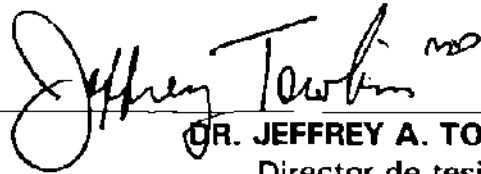
Monterrey, N.L. Agosto, 1999

RC685
-M9
07
C1

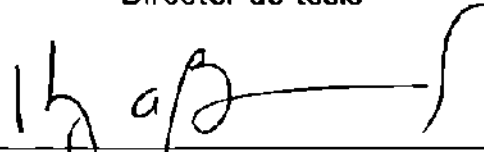


**ANALISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACION DE LA
CARDIOMIOPATIA DILATADA LIGADA AL CROMOSOMA X**

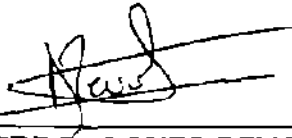
Aprobación de la Tesis:



DR. JEFFREY A. TOWBIN
Director de tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de tesis



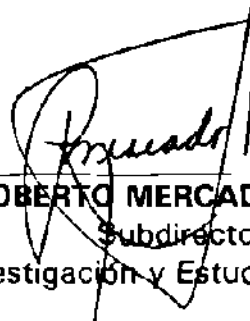
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ



DR. OSCAR DE LA GARZA CASTRO



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el departamento de Pediatría, en la Sección de Cardiología, del Baylor College of Medicine, en Houston, Texas; bajo la dirección del Dr. Jeffrey A. Towbin, y siguiendo la normatividad del programa de posgrado del que forma parte el Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética, de la UANL, el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña fungió como co-director.



Texas Children's Hospital

Pediatric Cardiology
MC2,2280
6621 Fannin
Houston, Texas 77030

Day (713) 770-5600 • Night (713) 770-2099
Appointments (713) 770-5601 & 1-800-80-HEART
FAX (713) 770-5630



BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

The Lillie Frank Abercrombie
Section of Cardiology
Department of Pediatrics

J. Timothy Bricker, M.D.
Chief of Cardiology
Dan G. McNamara, M.D.
Chief Emeritus
Charles E. Mullins, M.D.
Associate Director
Carolyn A. Altman, M.D.
Nancy A. Ayres, M.D.
Louis I. Bezold, M.D.
Neil Bowles, Ph.D.
Susan W. Denfield, M.D.
W. Jeffrey Dreyer, M.D.
Timothy F. Feltes, M.D.
Arnold L. Ferrich, Jr., M.D.

Richard A. Friedman, M.D.
Robert J. Gajarski, M.D.
Arthur Garson, Jr., M.D., M.P.H.
Ronald G. Grifka, M.D.
Mary Hamra, Ph.D.
Frank F. Ing, M.D.
Naomi Kertes, M.D.
John P. Kovalchin, M.D.
Michael R. Nihill, M.D.
Ricardo Pignatelli, M.D.
Jeffrey A. Towbin, M.D.
Thomas A. Vargo, M.D.
G. Wesley Vick, III, M.D., Ph.D.
Qing Wang, Ph.D.

February 8, 1999

To Whom It May Concern:

This letter confirms that Rocio Ortiz-Lopez, Ph.D. has completed her work in my laboratory on X-linked dilated cardiomyopathy. She will return to Mexico to assume a faculty position with your institution but will continue to collaborate closely with me. She leaves my laboratory with my fullest support, respect and blessings after a productive five years of training. She will do well!

Sincerely yours,

Jeffrey A. Towbin, M.D.
Professor of Pediatrics (Cardiology)
Molecular and Human Genetics, and Cardiovascular Services
Associate Chief, Pediatric Cardiology
Baylor College of Medicine
Director, Phoebe Willingham Muzzy Pediatric Molecular
Cardiology Laboratory and
Texas Children's Hospital Foundation Chair of
Pediatric Cardiac Research
Director, Heart Failure Program and Cardiovascular Genetics
Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital

JAT:rma

DEDICATORIA:

A mi amor

A mis reyes

A mi familia

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jeffrey A. Towbin: Mi asesor, mi maestro y mi jefe, por la oportunidad que me dió, cuando creí que no había oportunidades.

Al Dr. Hugo Barrera: Por todo y por la oportunidad que nos dió de regresar.

A la Dra. Herminia Martínez y a la Dra. Agnes Revol: por su amistad y apoyo moral en esta loca carrera.

A mi comisión de tesis.

A mis amigos: Ramón y Ana, Xavi y Mateo, Diego, Manuel, Felipe y Catty, Marisela, Odila y Roberto.

A los chicos del laboratorio del Baylor y a todos mis nuevos (y viejos) compañeros de la ULIEG.

A todo el personal administrativo y técnico que participa silenciosamente, pero que sin ellos este trabajo no saldría adelante.

Muy especialmente a mi Madre y mi hermano: mis compañeros de siempre y mi familia, por todo el apoyo que me han brindado.

A Augusto por quererme, aún después de descubrir que no se nada de Geografía, y a mis hijos que son mi luz, Gracias mil.

INDICE

CONTENIDO:	PAGINA:
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xii
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
1.1 DISTROFINA	5
1.2 DMD Y DMB	14
1.3 CDLX	17
CAPITULO II	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
2.1 HIPÓTESIS	22
2.2 OBJETIVO	22
2.2.1. Objetivo General	22
2.2.2. Objetivos específicos	22
CAPITULO III	
ESTRATEGIA GENERAL	24
CAPITULO IV	
MATERIALES Y METODOS	25
4.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS	25
4.2 FAMILIAS	26
4.3 CONTROLES	27
4.4 ESPECÍMENES BIOLÓGICOS	27
4.5 LINEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES	28

4.6	REPARACION DEL DNA GENÓMICO (DNAg)	29
4.7	PREPARACION DEL RNA	29
4.8	OLIGONUCLEÓTIDOS	31
4.9.	MÉTODOS	31
4.9.1.	ANÁLISIS DE LIGAMIENTO	31
4.9.1.1.	Polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción (PLFR) detectados mediante Southern-blot	32
4.9.1.2.	Polimorfismos Mae III	33
4.9.1.3.	Análisis de ligamiento	35
4.9.2.	ANÁLISIS DE DNAg	35
4.9.2.1.	Southern-blot	35
4.9.2.2.	PCR-Multiplex	35
4.9.2.3.	Análisis de los promotores del gen de la distrofina	36
4.9.2.4.	Análisis individual de los exones (2 al 10) e intrones (8 y 9)	37
4.9.3.	ANÁLISIS DE DNAc	39
4.9.3.1.	Síntesis de DNAc	39
4.9.3.2.	RT-PCR	39
4.9.4.	DETECCIÓN DE MUTACIONES	42
4.9.4.1.	Análisis mediante polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP, por las siglas en inglés)	42
4.9.4.2.	Clonación y Secuenciación	44
4.9.5.	ANÁLISIS DE PROTEINAS	45
4.9.5.1.	Western-blot	45
4.9.5.2.	Análisis estructural de la proteína	46

CAPITULO V

RESULTADOS	48
5.1. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO	48
5.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL DNAg	50
5.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS POR SSCP	55
5.3.1. Familia CDLX 1	55
5.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LOS DNAc	60
5.4.1. Familia CDLX 3	60
5.5 ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA	65

CAPITULO VI	
DISCUSIÓN	69
CAPITULO VII	
CONCLUSIONES	74
CAPITULO VIII	
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXO 1: ÁRBOLES GENEALÓGICOS	80
ANEXO 2: ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS	84
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	85

LISTA DE TABLAS

TABLA 1:	ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TRANSCRITOS DE DITROFINA, EN DIFERENTES TIPOS DE TEJIDOS HUMANOS	6
TABLA 2:	ANÁLISIS DE LABORATORIO REALIZADOS A LOS PACIENTES CON CDLX	28
TABLA 3:	SONDAS EMPLEADAS EN LAS HIBRIDACIONES EN FILTRO	33
TABLA 4:	CONDICIONES ESTÁNDARES DE LA PCR	34
TABLA 5:	SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS	37
TABLA 6:	OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACION DE REGIONES DEL GEN DE LA DITROFINA A PARTIR DE DNA_g	38
TABLA 7:	SECUENCIA Y POSICIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DEL DNA_c	40
TABLA 8:	SECUENCIAS DEL EXÓN 9 OBTENIDAS DE BANDAS GENERADAS POR SSCP	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA CONSTITUCIÓN DEL MÚSCULO CARDIACO, DEPENDIENDO DEL TIPO DE LA CARDIOMIOPATÍA ESTABLECIDA.....	4
FIGURA 2:	LOCALIZACIÓN DE LOS PROMOTORES DEL GEN DE LA DISTROFINA	8
FIGURA 3:	LOCALIZACIÓN DEL LOCUS DEL GEN DE LA DISTROFINA.....	10
FIGURA 4:	REPRESENTACIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A DISTROFINA (DAG).....	12
FIGURA 5:	ESQUEMA DE LA REGIÓN 5' DEL GEN DE LA DISTROFINA, QUE MUESTRA LA DELECIÓN DESCRITA POR MUNTONI Y COLS EN UN PACIENTE CON CDLX.....	21
FIGURA 6:	SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DE MÚSCULO Y EL EXÓN 1	41
FIGURA 7:	AUTORRADIOGRAFÍA DE LA FAMILIA CDLX-2	49
FIGURA 8:	AMPLIFICACION MÚLTIPLE DE LOS EXONES 7,8 Y 9	52
FIGURA 9:	AMPLIFICACION DE LOS INTRONES 8 Y 9	53
FIGURA 10:	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL EXÓN 8, INTRÓN 8 Y EXÓN 9	54
FIGURA 11:	ANÁLISIS POR SSCPS.....	56
FIGURA 12:	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR SSCP.....	57
FIGURA 13:	ANÁLISIS DEL EXÓN 9 EN CDLX-1.....	59
FIGURA 14:	ANÁLISIS DEL DNAC	61
FIGURA 15:	AMPLIFICACION DEL EXÓN 1-INTRÓN 1.....	63
FIGURA 16:	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL SITIO DE EMPALME DEL EXÓN1-INTRÓN 1 CON LA ENZIMA <i>Mse I</i>	64
FIGURA 17:	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE MUESTRAS DEL AFECTADO DE LA FAMILIA CDLX-3.....	66
FIGURA 16:	PREDICCIÓN GRÁFICA DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEINA DE LA DISTROFINA MUTANTE COMPARADA CON LA DISTROFINA NORMAL	68

NOMENCLATURA

%	Porcientos
µg	Microgramos
µM	Concentración Micromolar
°	Grados
°C	Grados centígrados
a.a.	Aminoácidos
CD	Cardiomiopatía dilatada
CDLX	Cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X
cols.	Colaboradores
CR	Cardiomiopatía restrictiva
CH	Cardiomiopatía hipertrófica
DAG	Complejo asociado a distrofina (de las siglas en inglés: Distrophin associated complex)
DMB	Distrofia muscular de Becker
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
dNTP's	Trifosfato de desoxinucleósidos
EDTA	Acido Etilen-diamino-tetra-acético
g	Gramos
h	Hora
hrs	Horas
M	Concentración Molar
mg	Miligramos
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
Pc	Promotor de cerebro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	log[H ⁺], logaritmo de la concentración de hidrogeniones
Pm	Promotor de músculo
Pp	Promotor de las células de Purkinje
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
USA	Estados Unidos de América
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Veces la concentración

RESUMEN

Rocío Ortiz López
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Agosto de 1999

Título del estudio: **ANÁLISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DE LA
CARDIOMIOPATÍA DILATADA LIGADA AL CROMOSOMA X**

Número de páginas: 90

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Propósito y método del estudio: La cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (CDLX) es una enfermedad primaria del miocardio que se presenta en varones jóvenes como una afección cardíaca congestiva sin causa conocida, ni daño aparente del músculo estriado esquelético. El gen para esta cardiomiopatía fue asociado con la región 5' del gen de la distrofina (localizado en Xp21) por el grupo de Towbin y cols., quienes sugirieron que la CDLX era una versión fenotípica adicional del espectro de enfermedades asociadas a mutaciones en la distrofina (DMD y DMB). Posteriormente el grupo de Muntoni y cols. reportaron en un paciente con CDLX, una delección que involucraba al promotor del músculo y al primer exón del gen de la distrofina, sugiriendo que esta mutación era la responsable del cuadro clínico que afectaba selectivamente al corazón.

En un intento por aclarar la etiología molecular de la distrofina en la CDLX, que afecta particularmente al miocardio y no afecta al músculo esquelético, en el presente trabajo se analizó el gen de la distrofina en tres familias diagnosticadas clínicamente con CDLX (CDLX-1, CDLX-2 y CDLX-3).

Se analizó la región 5' del gen de la distrofina, incluyendo la región promotora y los primeros 10 exones. Este análisis incluyó el estudio del DNAg, del RNAm (a través del DNAc) y de la Proteína en los sujetos afectados y en controles normales.

Contribuciones y conclusiones: De las tres familias analizadas, en la familia CDLX-1 se logró caracterizar una mutación en el exón 9, un cambio de Treonina por Alanina (T279A), en el nucleótido 1043, localizado exactamente en la región H1 (primera región de bisagra) de la proteína. Mediante un programa computacional de predicción de la estructura de la proteína, se observó que esta mutación generaba un cambio en la estructura secundaria de una lamina B por una alfa-hélice, que probablemente implique la producción de una proteína inestable.

La mutación en la familia CDLX-2 no se localizó, pero los análisis de ligamiento con marcadores para la región 5' de la distrofina, mostraron que esta familia estaba correctamente clasificada como CDLX.

La mutación en la familia CDLX-3 consistió en una mutación puntual en el intrón 1 que alteraba el sitio de empalme. Este defecto ocasionó la ausencia del empalme entre el exón 1 y el exón 2, produciendo un transcrito anormal y por ende inútil para la producción de distrofina cardíaca. Esta mutación introduce un nuevo sitio de restricción para la enzima *Mse I*, el cual cosegrega con la enfermedad cuando se analizan los demás miembros afectados y portadores de la familia.

Las mutaciones encontradas en las familias CDLX-1 y CDLX-3, son diferentes a la mutación reportada por Muntoni, por lo que confirman la heterogeneidad de las mutaciones en esta enfermedad. Ninguna de estas mutaciones había sido descrita en pacientes con DMD/DMB. Nuestros hallazgos sugieren que alteraciones en la región 5' del gen de la distrofina pueden conducir a un fenotipo diferente al de la DMD o la DMB, que particularmente afecta al corazón y que explica el fenotipo de la CDLX. El mecanismo sugerido es que estas mutaciones desfavorecen la producción de transcritos de distrofina útil en los músculos estriados cardíaco y esquelético. Sin embargo, en éste último, el promotor de la distrofina cerebral permite una producción compensatoria de la proteína que evita el daño en el músculo esquelético, pero este mecanismo no compensa el defecto en las fibras miocárdicas que están sujetas a un trabajo constante sin reposo, como es el caso del corazón.

FIRMA DEL ASESOR:

