

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

Las **cardiomiopatías** son aquellas enfermedades que afectan en forma anatómica y funcional al músculo cardíaco (miocardio). Este cuadro clínico representa un serio problema en niños y adultos que resulta en una morbilidad y mortalidad prematura. Tiene una prevalencia de 37/100,000 habitantes y constituye la causa más común de trasplante de corazón (1,2).

Hasta mediados de los 80s, el conocimiento de las cardiomiopatías fue principalmente clínico y descriptivo, ya que la causa de la mayoría de estas enfermedades del miocardio era desconocida. No fue sino hasta hace algunos 6 años en que la introducción de la biología y la genética molecular en el área de la cardiología generaron conocimientos sobre el entendimiento del establecimiento y fisiopatología de estas afecciones, al conocerse las bases moleculares del crecimiento del músculo cardíaco, de la hipertrofia y de los mecanismos de reparación. De manera que la biología molecular abrió una nueva puerta al entendimiento de estos desórdenes (3).

El término "cardiomiopatía" fue introducido por Brigden (4) en 1957 para distinguir entre una enfermedad del miocardio de causa desconocida, de otras enfermedades del miocardio consecuentes (o secundarias) a otras alteraciones. Esto

significa que, las cardiomiopatías pueden presentarse como consecuencias secundarias de algunas enfermedades como la hipertensión y la enfermedad de válvulas cardíacas, o como secuelas de daños inducidos por toxinas, infecciones virales, autoinmunidad, etc., o también pueden presentarse sin causa objetiva aparente, constituyendo el grupo de las llamadas **Cardiomiopatías Idiopáticas ó Primarias** (3, 5, 6 y 7), las cuales son las que en este trabajo ocupan nuestra atención.

Poder distinguir clínicamente, entre la forma primaria y la forma secundaria es de gran utilidad, como guía para el diagnóstico correcto de la cardiomiopatía. Sin embargo, probar que existe una causa específica, no cardíaca, la que está generando el cuadro de cardiomiopatía, es muy difícil.

Las cardiomiopatías primarias fueron clasificadas de acuerdo a un esquema propuesto por Goodwin y cols. (8) quienes distinguen tres grupos de enfermedad cardíaca primaria, según el defecto anatómico y fisiológico predominante (Figura1).

a) **Cardiomiopatía hipertrófica (CH)**, se caracteriza por hipertrofia y cavidades no dilatadas de los ventrículos derecho y/o izquierdo, pero con las paredes anormalmente engrosadas y conservándose una función sistólica normal. Recientemente se han reportado mutaciones en 7 genes, todos codificadores para proteínas sarcoméricas, identificadas como la causa de la CH Familiar (CHF). Estos genes incluyen a los que codifican para la cadena pesada de la  $\beta$ -Miosina, la  $\alpha$ -Tropomiosina, la Troponina Cardíaca T, la proteína C de unión a Miosina, la cadena ligera de Miosina y la Troponina I. Los avances moleculares han ayudado al

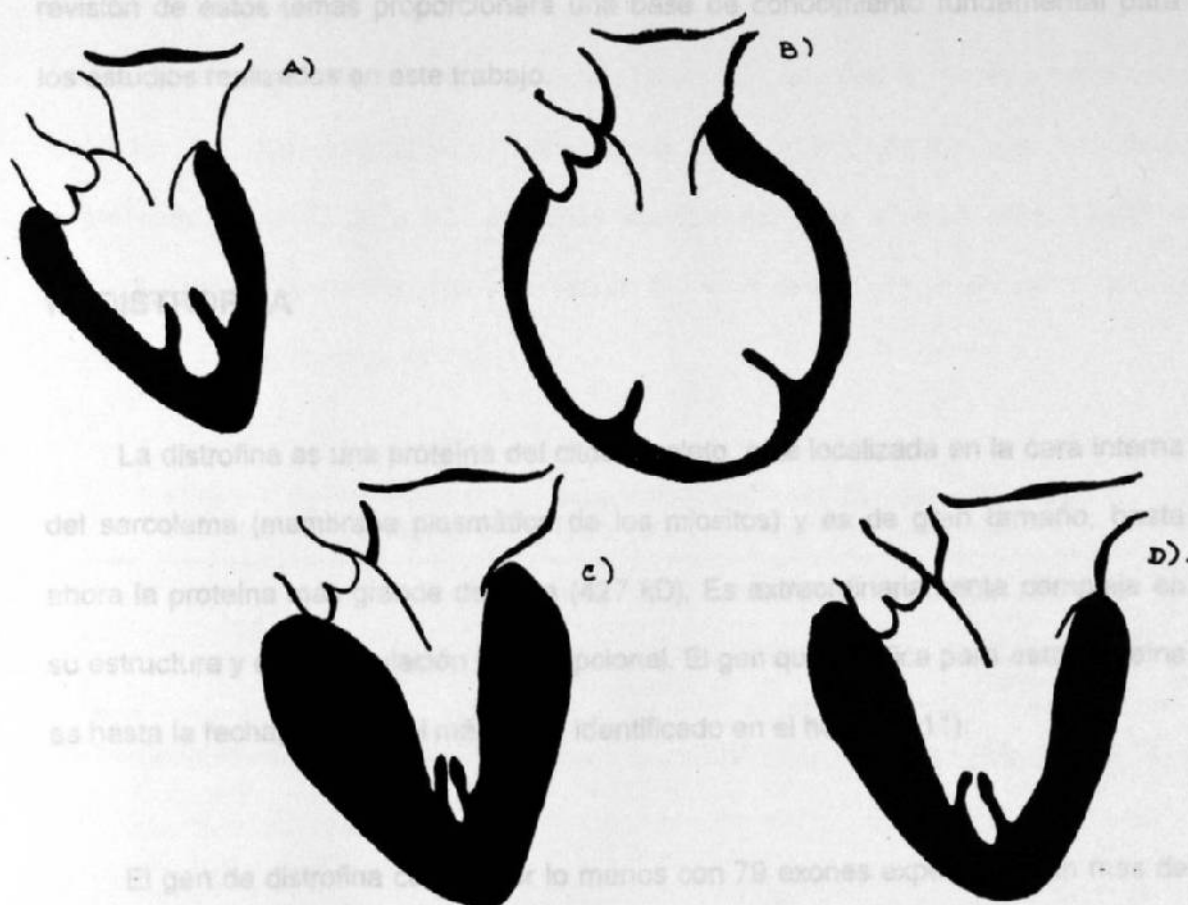
entendimiento de la patogenia de las cardiomiopatías, sugiriendo que las proteínas del citoesqueleto juegan un papel central en estas patologías.

**b) Cardiomiopatía restrictiva (CR)**, se puede presentar sin hipertrofia ni dilatación ventricular pero existe una rigidez anormal en la pared ventricular que afecta a la relajación diastólica, conservándose la función contráctil normal. La mayoría de las formas de CR son debida a errores innatos del metabolismo que conllevan a la acumulación de metabolitos en el miocardio.

**c) Cardiomiopatía dilatada (CD)**, caracterizada por aumento (dilatación) del diámetro ventricular y reducción de la función contráctil del miocardio. Generalmente afecta a hombres jóvenes y frecuentemente se presenta como un estado final de daño cardiaco. Tradicionalmente, la mayoría de los casos primarios habían sido considerados como esporádicos, pero estudios recientes han demostrado que aproximadamente el 30% de ellos pueden ser de origen familiar (CDF) y tener patrones de herencia mendeliana o mitocondrial. Los patrones mendelianos abarcan el autosómico dominante, el autosómico recesivo y el ligado al cromosoma X (9 y 10).

Las CD son más comunes que las otras cardiomiopatías. Se presentan con signos y síntomas de daño cardiaco congestivo, cardiomegalia y edema pulmonar en una radiografía de pecho, así como dilatación ventricular. Los mecanismos moleculares que puedan explicar los fenotipos familiares de las CD son aún especulativos y en éstos pueden estar involucrados factores ambientales, además de los factores genéticos (7 y 9). También se ha reportado, que las mutaciones encontradas en algunas otras proteínas del citoesqueleto, como son Metavinculina,  $\alpha$ -

Distroglicanos y  $\alpha$  y  $\gamma$ -Sarcoglicanos, resultan en CD, sugiriendo que todas estas proteínas también juegan un papel central en la función cardíaca (9).



**FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA CONSTITUCIÓN DEL MÚSCULO CARDIACO DEPENDIENDO DEL TIPO DE LA CARDIOMIOPATÍA ESTABLECIDA. A)** Representa la anatomía del músculo normal. **B)** Músculo característico de la Cardiomiopatía Dilatada, en la que se observa aumento del diámetro ventricular y el músculo esquelético se vuelve flácido, reduciéndose la función miocárdica contráctil. **C)** Cardiomiopatía Hipertrófica, en la que las cavidades no se dilatan pero las paredes se encuentran anormalmente engrosadas. **D)** Cardiomiopatía Restrictiva, en la que no hay dilatación pero existe rigidez anormal en la pared ventricular.

En este trabajo, nuestro esfuerzo se centró en CD ligada al cromosoma X (CDLX), por lo que a continuación se describirán algunos conceptos y aspectos moleculares de ésta, empezando con una introducción a los temas de la Distrofina y de las Distrofias Musculares (DM) puesto que, como se verá mas adelante, resultaron íntimamente relacionados con nuestra investigación. Al mismo tiempo, la revisión de estos temas proporcionará una base de conocimiento fundamental para los estudios realizados en este trabajo.

## **1.1.DISTROFINA**

La distrofina es una proteína del citoesqueleto, está localizada en la cara interna del sarcolema (membrana plasmática de los miositos) y es de gran tamaño, hasta ahora la proteína más grande descrita (427 kD). Es extraordinariamente compleja en su estructura y en su regulación transcripcional. El gen que codifica para esta proteína es hasta la fecha, también el más largo identificado en el hombre (11).

El gen de distrofina cuenta por lo menos con 79 exones expandidos en mas de 2.5 Mpb. El RNA mensajero (RNAm) correspondiente, de 14 Kb, es expresado predominantemente en los tejidos muscular esquelético, cardíaco y liso y aunque en niveles bajos, también se expresa en el cerebro (12). Las mutaciones en el gen de la distrofina pueden causar baja producción de la proteína o completa ausencia de ésta en músculo y en corazón, conduciendo a los cuadros clínicos conocidos como

Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y Distrofia Muscular de Becker (DMB) (13).

Las características de estos cuadros clínicos se describirán más adelante.

La expresión del gen de la distrofina puede estar conducida por al menos 5 promotores diferentes que dirigen la expresión independiente y tejido-específica de al menos 5 tipos de transcritos (12, 13, 14, 15 y 16) (Figura 2). Los niveles de transcripción varían de un tejido a otro (Tabla 1). Los niveles de expresión más elevados se han detectado en el músculo esquelético, donde los transcritos representan el 0.02 al 0.1% de todos los RNAs. Los niveles más bajos de transcripción se han detectado en músculo liso y en cerebro (1 a 5% de lo que se expresa en músculo esquelético) (17).

TABLA 1. ESTIMACION DE LA CONCENTRACION DE TRANSCRITOS DE DISTROFINA, EN DIFERENTES TIPOS DE TEJIDOS HUMANOS.

TEJIDO:	FRACCION DE TRANSCRITOS DE DISTROFINA:	
	Con relación al músculo esquelético:	Con relación al RNA total:
Músculo esquelético*	100 %	2.5 - 12 X 10 <sup>-4</sup>
Corazón*	10.0 al 100 %	1.5 - 14 X 10 <sup>-4</sup>
Músculo liso: estómago <sup>#</sup>	5.0 al 10.0 %	0.1 - 0.2 X 10 <sup>-4</sup>
Músculo liso: intestinos <sup>#</sup>	2.0 al 5.0 %	0.004 - 0.1 X 10 <sup>-4</sup>
Riñón <sup>#</sup>	1.6 %	0.03 -X 10 <sup>-4</sup>
Placenta	1.05%	0.01 -X 10 <sup>-4</sup>
Corteza cerebral	1.0 %	0.02 -X 10 <sup>-4</sup>
Pulmón <sup>‡</sup>	1.0 %	0.02 -X 10 <sup>-4</sup>
Hígado (total y poli A) <sup>‡</sup>	0.05%	0.01 -X 10 <sup>-4</sup>
Bazo <sup>‡</sup>	0.05%	0.01 -X 10 <sup>-4</sup>
Fibroblastos en cultivo*	< 0.005 %	< 0.01 -X 10 <sup>-4</sup>
Células linfoblastóides en cultivo:	0.004-0.01%	0.0001 - 0.0002 X 10 <sup>-4</sup>
Línea celular de hepatoma (HepG2) *	0.05%	< 0.01 -X 10 <sup>-4</sup>

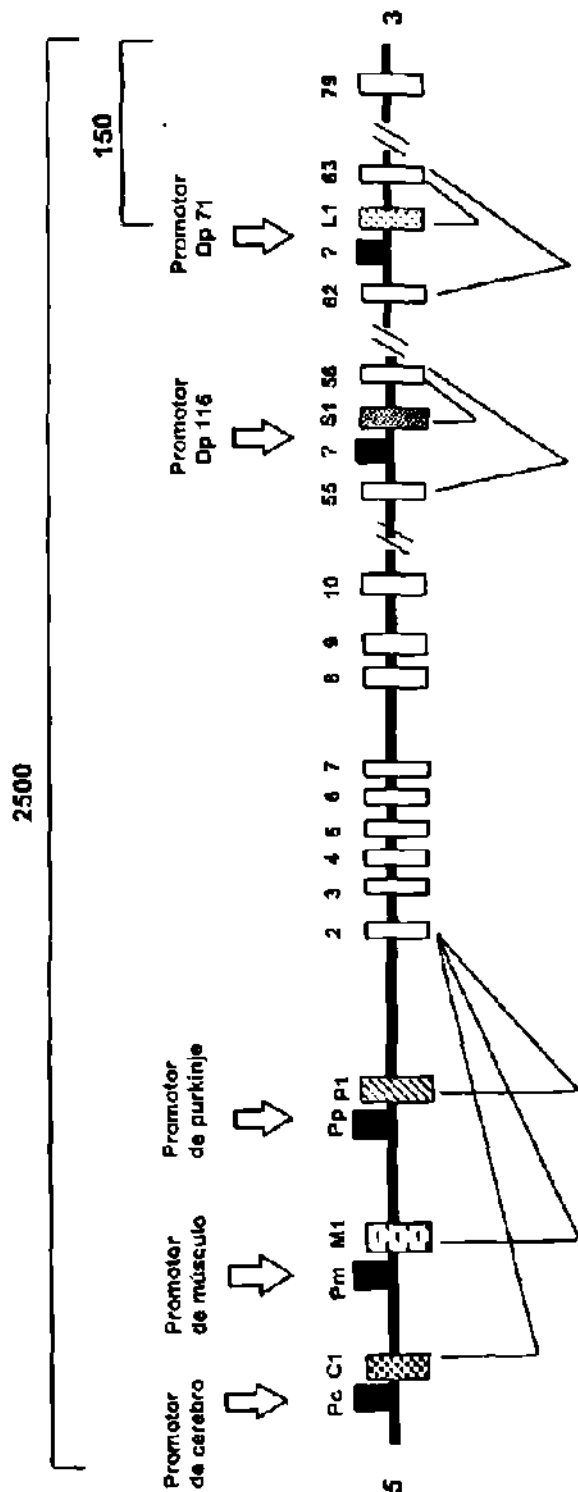
\*=Origen adulto, <sup>#</sup>=Origen fetal, <sup>‡</sup>=Origen fetal y adulto

Tomado de J.Chelly y cols. 1988.

De los 5 promotores que regulan la expresión de distrofina, tres están localizados al inicio del gen ó región 5', y comandan la producción de diferentes transcritos. 1) El Promotor de músculo (Pm), dirige la expresión de los transcritos en el músculo y en las células gliales, 2) el Promotor de cerebro (Pc), dirige la expresión de transcritos en las neuronas cerebrales y 3) el Promotor de Purkinje (Pp), que dirige la expresión de transcritos en las células de Purkinje en el cerebelo. Los transcritos producidos por estos tres promotores generan proteínas de tamaño completo (ó proteínas mayores) y cada uno codifica para su exón 1 particular, el cual no se comparte entre los tres transcritos. Se han observado diferencias importantes entre la distrofina de músculo esquelético y músculo cardiaco, pero éstas sólo han podido apreciarse a través de los efectos de algunas mutaciones en el gen, que afectan "exclusivamente" al miocardio (9).

Esto puede implicar que la expresión de distrofina en el miocardio está comandada por un promotor diferente al del músculo esquelético (aún no descubierto) o que existen diferencias en la regulación de la expresión de esta proteína que conllevan a las diferencias funcionales en estos dos tejidos.

Los otros dos promotores restantes se localizan mas hacia el final del gen ó hacia la región 3', y también codifican para transcritos cada uno con el primer exón 1 particular. Estos transcritos generan proteínas más pequeñas, las cuáles se denominan de acuerdo a su tamaño como: Distrofina de 71 kD (Dp 71) y Distrofina de 116 kD (Dp 116) (18).



**FIGURA 2. LOCALIZACIÓN DE LOS PROMOTORES DEL GEN DE LA DISTROFINA.** Las cajas negras representan a los 5 promotores identificados a lo largo del gen. Los tres primeros promotores localizados en la región 5' corresponden a los promotores de cerebro (Pc), de músculo (Pm) y de células de Purkinje (Pp) y a su primer exón (C1, M1 ó P1), respectivamente. Los promotores de la región 3' aún no han sido completamente caracterizados. (Dp 116 y Dp 71). Las líneas debajo de cada exón 1 muestran los empalmes respectivos con el exón 2 en el caso de los promotores de la región 5', ó con los exones 56 ó 63, en el caso de los promotores de la región 3'.



Además de existir diferentes transcritos específicos para músculo y cerebro, también ocurren fenómenos de empalmes alternativos que generan múltiples isoformas de la proteína final, dependiendo del tejido y de la etapa del desarrollo (18 y 19).

La secuencia total codificante del gen de la distrofina fue publicada en 1988 (20) y de ella se dedujo que era una proteína del citoesqueleto de la célula, de 427-kD de peso molecular (3,685 aminoácidos) y que tridimensionalmente posee una estructura en forma de barra con los cuatro dominios estructurales que a continuación se describen (Figura.3) (21, 22, 23, 24).

a) **El dominio N-terminal** (a.a. 1 al 252): Este dominio tiene una similitud muy alta con el grupo de proteínas que unen actina, tales como  $\alpha$ -actinina (una de las principales proteínas estructurales del citoesqueleto), y  $\beta$ -espectrina.

b) **Un dominio central**, también conocido como dominio en barra (a.a. 253 al 3112) y que consiste en una serie de 24 repeticiones (R 1 a R 24) de 109 aminoácidos cada una que toman la forma de una estructura helicoidal (*triple hélice*). Estas repeticiones están interrumpidas por 4 regiones ricas en prolina que se denominan "regiones de bisagra" o regiones H (del inglés "hinge"). La primera región H (H1) se localiza entre el dominio N-terminal y la primera repetición (R1), está comprendida entre los a.a. 253 al 327. La región H2 se localiza entre R 3 y R 4 abarcando los a.a. 668 al 717. La región H3 se localiza entre R 19 y R 20 entre los a.a. 2424 al 2470 y finalmente la región H4 localizada entre el R 24 y el dominio rico en cisteína entre los a.a. 3041 al 3112. Estas regiones H se encuentran altamente

conservadas entre especies y se predice que añaden flexibilidad a la molécula actuando como "bisagras moleculares" (24).

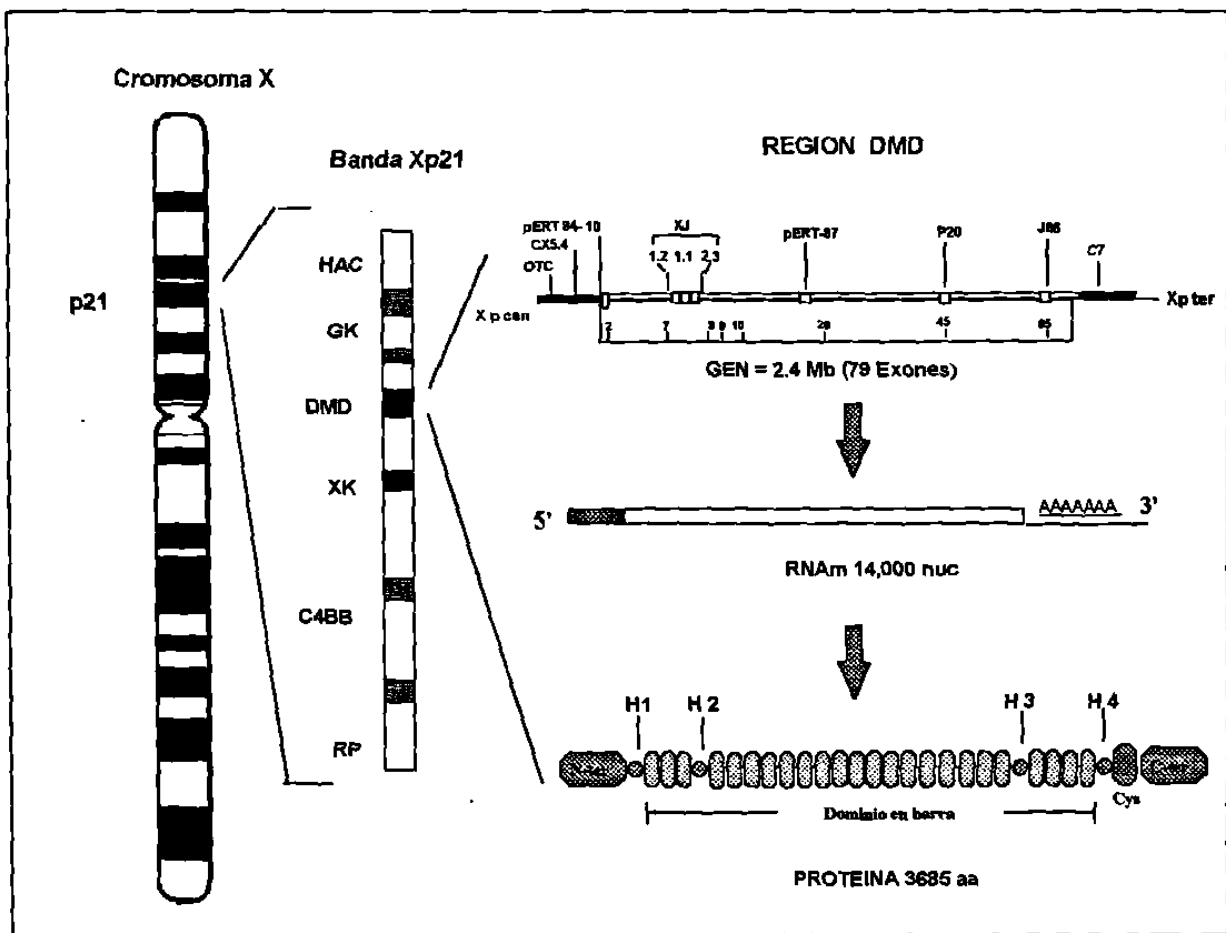


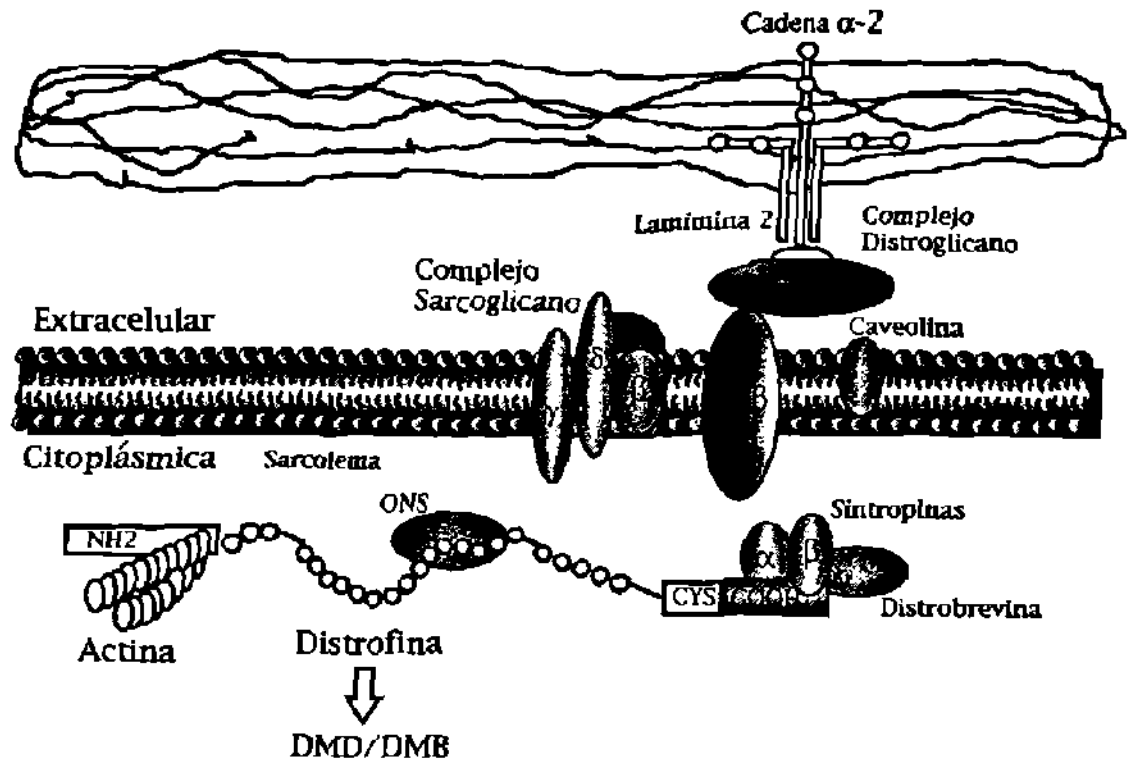
FIGURA 3. LOCALIZACIÓN DEL LOCUS DEL GEN DE LA DISTRIFINA.

A). Cromosoma X mostrando la localización de la banda p21. B). Marcadores de la banda Xp21 C). Representación de la estructura del locus de distrofina, en el que se observa la posición de los marcadores XJ1.1, pERT 84-10 y pERT 87-1 utilizados en este trabajo para el análisis de ligamiento. También se muestran el RNAm y la estructura lineal de la proteína, sobre la que se señalan los diferentes dominios y las regiones de bisagra (H1 a H4).

c) **Un dominio rico en cisteína** (a.a. 3113 al 3270). Este dominio es similar al dominio C-terminal de la  $\alpha$ -actinina del hongo *dictioestelium*.

d) **El dominio C-terminal** (a.a. 3271 al 3685) que no tiene similitud a alguna proteína previamente descrita. Este se une a la parte citoplásmica del sarcolema y se asocia con un gran complejo oligomérico glicoprotéico denominado Complejo de Glicoproteínas Asociadas a la Distrofina (DAG en inglés).

**1.1.1. El complejo DAG (19, 25):** Consta de por lo menos 6 proteínas localizadas en el sarcolema, donde a su vez algunos miembros de éste se unen a otros elementos de la matriz extracelular. El complejo DAG puede dividirse en tres sub-complejos dependiendo del tipo de la proteína: el **complejo distroglicano** ( $\alpha$ -distroglicano y  $\beta$ -distroglicano), el **complejo sarcoglicano** ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -sarcoglicano y una proteína aún no caracterizada denominada DAP 25) y el **complejo citoplásmico** (las sintropinas y la distrobrevina). De manera que, la distrofina queda unida mediante la región N-terminal a la actina y mediante la región rica en cisteína, y la región C-terminal quedan unidas al  $\beta$ -distroglicano y al complejo citoplásmico sintropinas/distrobrevinas. A su vez, la  $\beta$ -distroglicano es una proteína transmembranal que se une a la laminina y a las proteínas de unión a  $\alpha$ -distroglicanos en la matriz extracelular (Figura 4). De tal manera que, estas interacciones hacen que efectivamente, la distrofina forma un puente crítico entre el citoesqueleto sarcomérico y el aparato contráctil de la fibra muscular (25, 26, 27, 28 y 29).



**FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A DISTROFINA (DAG).** El complejo forma una unión transmembranal entre la matriz extracelular (cadena  $\alpha$ -2 y Lámina 2) y el citoesqueleto intracelular (filamentos de Actina) lo cual se predice, que estabiliza la membrana plasmática de la célula del músculo. Se muestra la distribución de las proteínas del complejo "Sarcoglicano" y "Distroglicano", la región N-terminal de la Distrofina que se ancla al filamento de Actina y la parte C-terminal que sirve de puente para unir la parte interna con la externa. ONS: óxido nítrico sintetasa.

La ausencia de distrofina (o de cualquier otra proteína del complejo DAG) conduce a un aumento de la fragilidad de la membrana, a la pérdida de la unión de las proteínas y por lo tanto a la desorganización del aparato contráctil. El resultado final es la necrosis miofibrilar con ciclos de degeneración y regeneración que

eventualmente conducen a la pérdida de las fibras y al reemplazo fibroconectivo (27). Las mutaciones en algunas de las proteínas componentes del complejo DAG han sido ya caracterizadas y se ha determinado la asociación con algunas otras distrofinopatías (3)

En adición a los efectos directos de las mutaciones en las fibras musculares, el complejo DAG puede estar involucrado en anomalías en la regulación del calcio ya que el músculo deficiente de distrofina tiene niveles anormalmente elevados de calcio intracelular. Por otro lado, también se ha observado una actividad aumentada en el transporte de calcio a nivel de la membrana celular, lo que sugiere que este complejo está involucrado en la producción del fenotipo de las cardiomiopatías. Más de un tercio de los pacientes con DMD/DMB desarrollan síntomas de disfunción cardíaca a la edad de los 14 años y virtualmente todos tienen cardiomiopatía a la edad de 18 años, siendo la forma dilatada la más frecuente (28 y 30).

La disponibilidad de pruebas para el análisis de genes y proteínas ha conducido a la apreciación de la variabilidad de las presentaciones clínicas asociadas a mutaciones en el gen de la distrofina y además han conducido a la integración general del entendimiento de las variantes fenotípicas resultantes de mutaciones no solo en distrofina, sino también en las proteínas del complejo DAG (28). Las mutaciones en el gen de la distrofina responsables de los cuadros de DMD y DMB son a las que enfocaremos nuestra atención en este trabajo, y estas variantes fenotípicas se describen a continuación.

## 1.2. DMD Y DMB

La DM es considerada como una de las enfermedades genéticas más devastadoras en la especie humana (32 y 33). Es de las afecciones neuromusculares más comunes en la infancia, con una incidencia de 1 en 4000 niños nacidos. Consiste en un desgaste progresivo del tejido muscular (con pérdida progresiva de la fuerza muscular), esquelético y liso, involucrando además al tejido nervioso en cierto grado. La DMD es el tipo clínico más grave, generalmente se diagnostica entre los 3 a 6 años de edad debido a una debilidad o retraso al caminar. El individuo afectado presenta una marcha característica, con balanceo bilateral del tronco, el abdomen hacia delante, lordosis lumbar excesiva y los hombros hacia atrás en relación a la pelvis, conocida como marcha andina o de pato (13, 32, 33 y 34).

La secuencia de eventos que ocurren en la DMD está bien caracterizada. Al principio de la enfermedad, las extremidades se encuentran hipotónicas y los arcos reflejos de movilidad están presentes, pero conforme avanza el padecimiento, van presentándose contracturas y las pantorrillas aumentan de tamaño debido a la hipertrofia del músculo. Esto es debido a que las miofibras sufren de ciclos de necrosis y regeneración (debido a la inestabilidad, ausencia o mal funcionamiento de la distrofina), en los cuales la necrosis gana finalmente, y la fibrosis ocurre cuando la regeneración ha fallado. El tejido adiposo y conectivo reemplaza al tejido normal, lo que hace que las pantorrillas tengan textura firme, se vean de mayor tamaño, pero sin tener la fuerza del músculo sano, lo que incapacita al individuo para sostenerse en pie (13 y 32).

La enfermedad es progresiva y los pacientes usualmente necesitan silla de ruedas entre los 8 y 11 años de edad. Después del confinamiento a la silla de ruedas, los pacientes tienden a desarrollar contracturas en los músculos de las piernas y los brazos, seguido por escoliosis progresiva. Esto resulta finalmente en una muerte temprana entre los 20 y 30 años. La muerte es causada principalmente por problemas respiratorios (debido a una insuficiencia respiratoria severa por debilidad intercostal), pero un gran porcentaje de los pacientes que presentan daño cardíaco, mueren por una insuficiencia miocárdica aguda (13 y 33).

La DMB fue considerada una enfermedad alélica a la DMD por sus similitudes clínicas y su patrón de ligamiento al cromosoma X. Esto fue confirmado después, cuando se analizó el gen de la distrofina y se estableció que tanto los pacientes con DMD o con DMB, presentaban mutaciones en este mismo gen (34).

En general, la DMB se caracteriza por un cuadro clínico menos severa y menos común que la DMD. Los síntomas aparecen después de los doce años, y puede o no, presentarse la incapacidad para caminar y la progresión del desgaste muscular es más lento. Los pacientes que requieren silla de ruedas la usan después de los 15 años, las contracturas en las extremidades pueden no presentarse y si las hay son muy leves. La hipertrofia en las pantorrillas también es leve ya que no existe gran destrucción del músculo, como ocurre en la DMD (34 y 35).

La base primordial para un buen diagnóstico de DMD/DMB, es la descripción precisa del cuadro clínico, consistente de los síntomas y signos que presenta el paciente, la edad de inicio del padecimiento y la edad en que queda incapacitado

para caminar. Los hallazgos significativos del laboratorio incluyen niveles elevados de enzimas específicas de músculo esquelético, como la creatina kinasa (CK-MM) y las muestras de biopsia de músculo que invariablemente muestran un patrón de degeneración y regeneración muscular con variación en el tamaño de las fibras, núcleos centrales aumentados y fibrosis intersticial progresiva (33).

La disponibilidad de muchos estudios moleculares del gen de la distrofina ha permitido la apreciación de la extrema variabilidad de las presentaciones clínicas asociadas con mutaciones de este gen. Típicamente, los pacientes con DMD no presentan niveles detectables de expresión de distrofina en músculo esquelético. A nivel cuantitativo, los pacientes con DMD tienen poca distrofina ó niveles mínimos no detectables de ésta por Western-blot. Para explicar las diferencias de niveles de distrofina detectados en los pacientes con DMD y DMB, en 1988 Monaco y cols. proponen "la hipótesis del marco de lectura" (36). Esta correlaciona la DMD con el patrón de mutaciones por delección que interrumpen el marco de lectura o que generan codones de terminación muy prematuros generando proteínas significativamente pequeñas o completamente diferentes a la distrofina normal. En contraste, el músculo de pacientes con DMB contiene niveles detectables de distrofina de tamaño alterado y/o abundancia reducida, que pueden deberse a mutaciones por delección que mantienen el marco de lectura. Estas observaciones sugieren que además de que hay dominios críticos para la función normal de la distrofina, los niveles de expresión también son importantes para la función normal, subnormal o completamente nula de esta proteína en el músculo distrófico (30, 33, 34, 35 y 36).



Debido a que la distrofina no es una proteína exclusiva del músculo esquelético, la patología también se extiende a los otros tejidos que la expresan, encontrándose en estos pacientes alteraciones en músculo cardíaco (como cardiomiopatías), en cerebro (retraso mental), músculo liso (alteraciones en esófago, músculo e intestino) y retina (respuesta reducida de las neuronas retinales a la luz ó ceguera nocturna). Los pacientes con DMB tienen un periodo de vida mas prolongado y no es frecuente encontrar pacientes con retraso mental (34 y 35).

La anomalía cardíaca más común en pacientes con DMD es la CD, involucrando principalmente al ventrículo izquierdo (3 y 9). La edad de establecimiento de la cardiomiopatía varía y puede estar asociada con arritmia cardíaca. Las mujeres portadoras ocasionalmente manifiestan los síntomas clínicos de la enfermedad pero en forma muy ligera. Melacini y cols. (37) documentaron una alta incidencia (60 a 72%) de daño cardíaco en pacientes con DMB. En casos particulares cuando el daño muscular era muy leve, la cardiomiopatía era la característica clínica primaria. En estos casos, el daño cardíaco es rápidamente progresivo llevando a trasplante cardíaco o muerte en el primer o segundo año después del diagnóstico.

### **1.3. CDLX**

Otra variante fenotípica resultante de mutaciones en el gen de la distrofina es la CDLX. Curiosamente en este caso, los pacientes llegan a consulta por una afección cardíaca primaria que es la CD, sin presentar ningún síntoma de daño muscular esquelético, por lo que inicialmente, cuando se determinó que el gen responsable

para CDLX era también distrofina, se dudó en clasificar a ésta dentro del grupo de las distrofinopatías. Actualmente, CDLX esta claramente clasificada como otra variante fenotípica dentro del grupo de las enfermedades resultantes de mutaciones en el gen de la distrofina (38 y 39). A continuación se describen con más detalle las características de esta otra variante, la cuál es el tema central de este trabajo.

La CDLX es una enfermedad grave del miocardio, de progresión rápida que afecta a jóvenes varones a la edad de los 10 años o a principios de la tercera década de la vida. Típicamente, los varones afectados presentan signos y síntomas de daño cardiaco congestivo grave incluyendo disnea, intolerancia al ejercicio, disminución del apetito y vómito. En algunos niños, la taquicardia ventricular y el síncope son muy comunes, lo que resulta en muerte o trasplante cardiaco después del primer o segundo año del diagnóstico. Clínicamente, la CDLX puede ser idéntica a cualquier otro cuadro clínico de cardiomiopatía dilatada, excepto por su evidencia de transmisión ligada al cromosoma X y por los elevados niveles de creatina kinasa de músculo esquelético (CK-MM) en el suero, junto con la falta de evidencia clínica de la miopatía esquelética. Las mujeres con CDLX (portadoras) están menos afectadas y pueden manifestar los síntomas en etapas más tardías, usualmente en la quinta década de su vida, pero la enfermedad es muy ligera y de progresión muy lenta (3, 10, 13, 38 y 40).

La primer familia con CDLX fue reportada por Berko y Swift en 1987 (familia CDLX-1) (38). Esta consiste de un árbol genealógico de 5 generaciones (Anexo 1), en el cuál no existe transmisión de la enfermedad de mujer a mujer y la cardiomiopatía es de establecimiento muy temprano en los varones y tardío en las mujeres. Esta familia

junto con otra (CDLX-3), fue elegida por Towbin y cols. para los estudios de ligamiento genético (39), demostrando ligamiento entre CDLX y la sonda XJ1.1 (DXS206) que se ubica exactamente en la región 5' del gen de la distrofina, implicado en la DMD y DMB (Figura 3).

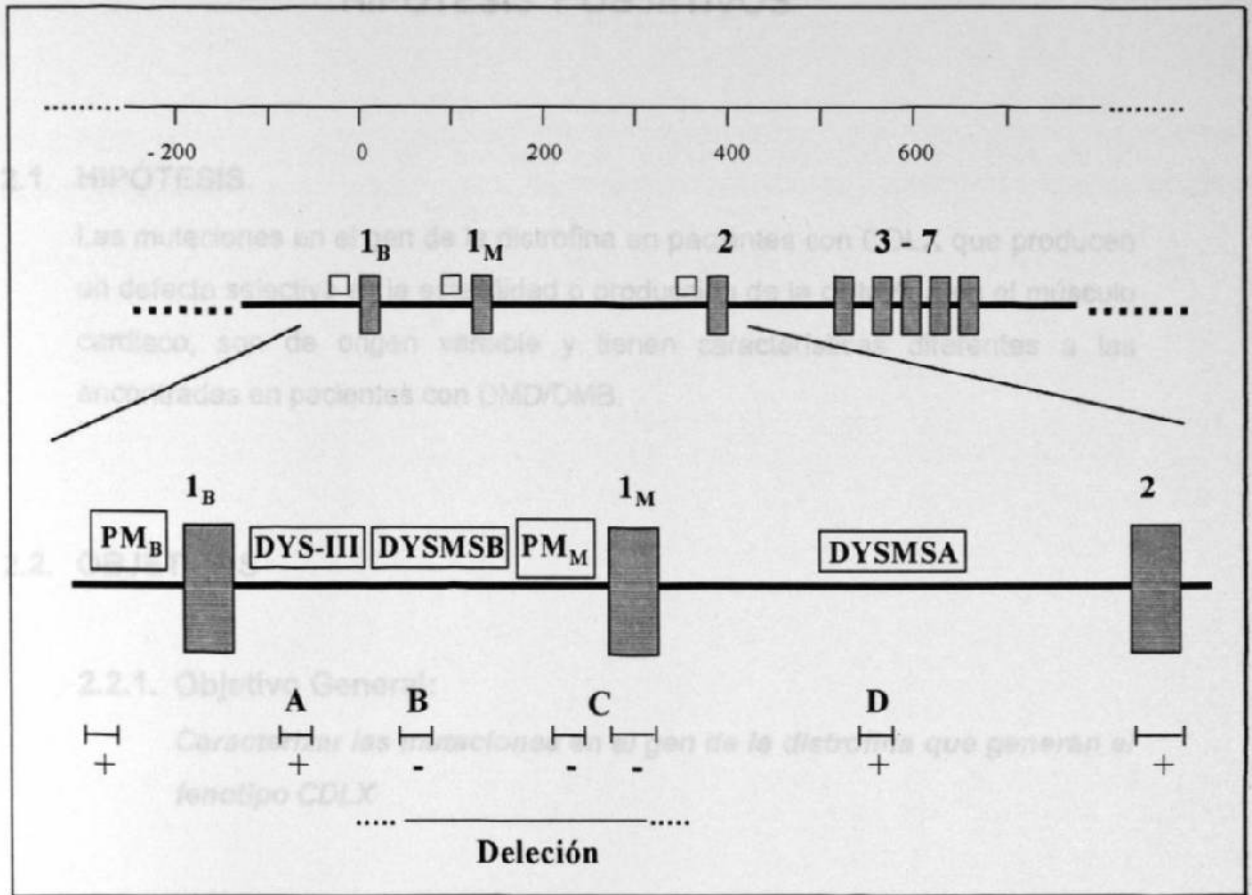
En el mismo trabajo, de Towbin y cols., se reportó el análisis por Southern-blot del gen de la distrofina en los varones afectados, utilizando sondas del DNA complementario (DNAc) al RNA mensajero (RNAm) de la distrofina. El resultado de estas pruebas no mostró ninguna evidencia de deleción en el gen. El análisis de deleciones intragénicas se realizó con un estuche de PCR-Múltiplex para 14 regiones del gen que comprenden los fragmentos más comúnmente deletados en pacientes con DM. Con estas pruebas se cubrieron el 98% de las deleciones previamente reportadas para distrofina, en pacientes con DM, sin encontrar ninguna deleción en los pacientes con CDLX. La evaluación de la proteína en tejido cardíaco se realizó utilizando tres anticuerpos, 1) uno dirigido contra la región N-terminal, 2) otro contra el dominio de barra central y 3) el tercero contra el extremo C-terminal de la proteína. Con este último análisis se demostró que en el tejido cardíaco había escasés (o ausencia) de la región N-terminal de la proteína, mientras que los niveles de las regiones en barra y C-terminal eran normales. La proteína total del músculo esquelético fue normal para todos los anticuerpos. Estos resultados sugerían fuertemente que el gen afectado en CDLX era el de la distrofina, pero que muy probablemente la anomalía se restringía a la región N-terminal de la proteína, la cuál afectaba exclusivamente al músculo cardíaco, y probablemente esta anomalía era diferente a todas las mutaciones ya reportadas en los pacientes con la distrofia de los tipo DMD y DMB (13, 31, 41 y 42).

Muntoni y cols. (43) describieron una mutación en una familia con CDLX. En esta familia se encontró una deleción que involucra una parte del promotor de músculo y el exón 1 (Figura 5). Este autor propuso que el promotor de cerebro (Pc), normalmente no activo en músculo, se activa y reemplaza parcialmente la producción de la distrofina en el músculo esquelético, manteniéndolo en forma aparentemente normal, protegiéndolo del desgaste celular y mostrándolo con función aparentemente normal. Yoshida y cols. (44) también reportaron dos pacientes con daño muscular muy leve y cardiomiopatía dilatada y con deleción única del exón 1.

Tomando en cuenta estos antecedentes, la propuesta en este trabajo fue que las mutaciones en CDLX deberían ser diferentes a las reportadas en pacientes con DMD/DM, ya que en los pacientes con CDLX el músculo esquelético no está afectado y el daño es específico de corazón. Como el análisis de ligamiento y el análisis de proteínas reportado por Towbin y cols. mostró que la región 5' del gen de la distrofina era la directamente involucrada, el análisis de la distrofina en estos pacientes, se enfocó principalmente a la región 5' que comprende a los promotores (Pc, Pm y Pp) y los primeros 10 exones del gen. A continuación se describen la Hipótesis y los Objetivos Generales y Específicos de este trabajo.

CAPITULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



**FIGURA 5. ESQUEMA DE LA REGIÓN 5' DEL GEN DE LA DISTROFINA, QUE MUESTRA LA DELECIÓN DESCRITA POR MUNTONI Y COLS. (20) EN UN PACIENTE CON CDLX.**

Se muestra el tamaño aproximado de la región y los exones involucrados en este estudio. Pm denota el promotor de músculo. Pc al promotor de cerebro. 1M y 1C corresponden al primer exón de músculo y al primer exón de cerebro, respectivamente. DYSIII, DYS MSB y DYS MSA son marcadores polimórficos analizados y las barras debajo de éstos indican los fragmentos analizados por PCR. Los signos + y - denotan los resultados positivos o negativos de amplificación.

- 3- Si no se encuentra la deleción del Pm y el exón 1, continuar con el tamizaje de la región 5' del gen de la distrofina utilizando las pruebas convencionales descritas para el diagnóstico de mutaciones en pacientes con DMD/DME.

## **CAPITULO II**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **2.1 HIPÓTESIS.**

Las mutaciones en el gen de la distrofina en pacientes con CDLX que producen un defecto selectivo en la estabilidad o producción de la distrofina en el músculo cardíaco, son de origen variable y tienen características diferentes a las encontradas en pacientes con DMD/DMB.

#### **2.2. OBJETIVOS**

##### **2.2.1. Objetivo General:**

*Caracterizar las mutaciones en el gen de la distrofina que generan el fenotipo CDLX*

##### **2.2.2. Objetivos específicos:**

1. Realizar un análisis de ligamiento de la tercera familia reclutada diagnosticada clínicamente como CDLX.
2. Descartar o confirmar las mutaciones descritas por Muntoni y cols. (34), en las tres familias reclutadas con CDLX.
- 3- Si no se encuentra la delección del Pm y el exón 1, continuar con el tamizaje de la región 5' del gen de la distrofina utilizando las pruebas convencionales, descritas para el diagnóstico de mutaciones en pacientes con DMD/DMB.

4. Si no se encuentra ninguna mutación en la región 5' del gen, entonces contemplar la posibilidad de continuar con el tamizaje de la región 3'.
  
5. Si se encuentran las mutaciones causantes de la enfermedad, establecer las pruebas de laboratorio diagnósticas, que deben realizarse en pacientes con CDLX.

## CAPITULO III

### ESTRATEGIA GENERAL

**3.1. ANALISIS DE LIGAMIENTO:** La tercera familia recolectada había sido clínicamente diagnosticada como CDLX. Para confirmar si se clasificaba dentro del grupo de distrofinopatías, se hizo un análisis de ligamiento utilizando únicamente marcadores de la región 5' del gen de la distrofina, con marcadores previamente reportados como diagnósticos para CDLX.

**3.2. ANALISIS DE ADN GENOMICO:** La primera parte del análisis fue reproducir los estudios de Muntoni y Yoshida y hacer el estudio de los promotores, con la finalidad de determinar si las mutaciones en nuestras familias correspondían a las mismas mutaciones que ellos habían descrito. Como no se encontró ninguna deleción en la región promotora del gen, los siguientes estudios que se hicieron fueron por Southern-blot y PCR-Múltiplex. Con éstos estudios se descartaron el 98% de las mutaciones ya descritas en pacientes con DMD/DMB.

**3.3. ANALISIS DE DNAC:** El análisis de la expresión de la proteína se hizo mediante PCR a partir de DNAC, utilizando juegos de primers que amplificaban fragmentos traslapados del DNAC de distrofina.

**3.4. DETECCION DE MUTACIONES:** El análisis de las mutaciones puntuales se hizo por SSCs individuales de cada uno de los exones 2-10 del gen. Las bandas anormales resultantes se secuenciaron para confirmar las mutaciones.

**3.5. ANALISIS DE PROTEINAS:** El estudio de la proteína se realizó a partir del tejido obtenido de biopsias del corazón de cada paciente, después de trasplante cardiaco. Se realizaron estudios por Western-blot a partir de homogenizados de los tejidos en secciones congeladas. Para estos estudios se utilizaron cuatro anticuerpos: un anticuerpo contra la región N-terminal, un anticuerpo contra la región en forma de barra, un anticuerpo contra la región C-terminal y un anticuerpo anti-Actina. Este último sirvió como control interno del sistema. Si al final de todos los estudios se encontraba alguna mutación, se hacía un estudio computacional de la proteína para predecir los cambios estructurales que la mutación ocasionaba.



## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

**4.1. ORIGEN DE LOS REACTIVOS:** Los reactivos utilizados para el cultivo de células como: RPM1-1640, suero bovino fetal, tripsina, antibiótico (penicilina-estreptomicina), DMSO, ciclosporina y glutamina, se obtuvieron de las casas comerciales: Gibco-Bethesda Research Laboratories (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA), HyClone (Salt Lake City, UT, USA) y SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA). El material para cultivo de células como frascos y platos, criotubos, pipetas desechables, cajas de plástico para almacenamiento de los criotubos y unidades de filtración, provino principalmente de Falcon (Lincoln Park, NJ, USA) y Corning (New York, NY, USA). Los reactivos utilizados en la extracción de sangre (tubos heparinizados o con solución de citratos) provinieron de Mallinckrodt Speciality Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA).

El estuche para la extracción de DNA se obtuvo de la casa Boehringer Mannheim Corporation (Indianapolis, IN, USA), los tubos de Ficoll-Hipaque provenían de Pharmacia (Piscataway, NJ, USA), la proteinasa K y el reactivo TRIzol se obtuvieron de Gibco-BRL. Las sondas de DNA genómico (DNAg): XJ 1.1, XJ 1.2, pERT 84-10 y pERT 87-30 y las de DNA complementario (DNAc): 1-2a, 2-b3 y 4-5a, se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). El DNA de placenta y el DNA de espermatozoos de salmón provinieron de SIGMA. Las membranas de Nylon Zeta probe eran de BioRad (Richmond, CA, USA)

Todos los reactivos para las PCRs y para la síntesis de DNAc (enzima *Taq* polimerasa, cloruro de magnesio, aceite mineral, dNTPs, enzima transcriptasa reversa, inhibidor de RNAsa, hexanucleótidos al azar, etc.) provenían de Gibco-BRL. Las columnas de purificación de productos de las PCRs eran de Qiagen (GmbH, Alemania). Las enzimas de restricción provenían de las casas New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, USA) y Boehringer Mannheim. Los reactivos para las electroforesis (agarosa, acrilamida, bisacrilamida, Trisma Base, EDTA, SDS, Formamida, Dietilpirocarbonato, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol, etc.) se compraron a BioRad, SIGMA y Gibco-BRL. Los nucleótidos radioactivos se obtuvieron de Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra, UK). El estuche de clonación mediante Vectores-T fue de la casa Invitro-gen (Carlsbad, CA, USA). Los anticuerpos anti-distrofina y el anticuerpo anti-actina provenían de los Laboratorios Novocastra (New Castle, Upon Tyne, Inglaterra, UK). Los reactivos comunes como etanol, isopropanol, cloroformo y alcohol isoamílico fueron comprados a United States Biochemical Corporation (USB, Cleveland, Ohio, USA ).

**4.2. FAMILIAS:** Para este estudio, se recolectaron muestras de tres familias con CDLX pura y se evaluaron después de tener las formas de consentimiento, autorizadas por el comité de ética de la institución. Los árboles genealógicos de estas tres familias se muestran en el Anexo 1. La primera familia CDLX-1 fue descrita y evaluada en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, por Berko y Swift (38), las otras 2 familias (CDLX-2 y CDLX-3) fueron estudiadas en el Colegio de Medicina de Baylor y la Escuela de Medicina de la Universidad de Texas, en Houston, por Towbin y cols. (39 y 45).

Estas familias no estaban relacionadas, y todas eran de descendientes americanos. Las familias CDLX-1 y CDLX-3 eran de raza negra y la familia CDLX-2 era de origen caucásico. Los varones afectados y las mujeres portadoras están señalados en los árboles genealógicos. Los estudios de laboratorio incluyeron estudios de función tiroidea, camitina, hierro, capacidad total de unión a hierro, títulos virales y de toxoplasma y niveles de CK (Tabla 2). Los niveles de CK totales y CK de músculo esquelético (CK-MM) estaban elevados en todos los afectados y en algunas mujeres portadoras. Ninguna otra anomalía fue encontrada en los estudios hechos en sangre. Todos los varones afectados manifestaron síntomas de daño cardíaco congestivo y ecocardiografía consistente con CD. Todos los miembros fueron evaluados por examen físico, electrocardiograma (ECG) y ecocardiografía (bi-dimensional, modo-M y Doppler).

**4.3. CONTROLES.** Después de obtener las formas de consentimiento, se recolectó la sangre de 100 individuos no relacionados (incluyendo hombres y mujeres de raza negra y caucásicos) determinados como sanos después de realizar examen físico, historia clínica y ecocardiografía.

**4.4. ESPECÍMENES BIOLÓGICOS.** Para establecer líneas celulares linfoblastóides de los pacientes y sus familiares, se obtuvieron 10 ml de sangre anticoagulada con heparina de cada individuo, y 10 ml de sangre con citratos para extracción directa de DNAg. En el caso de los afectados, cuando fue posible, se obtuvo biopsia de músculo esquelético y/o cardíaco. Los tejidos obtenidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido (-170°C). De los controles se obtuvieron solamente 10 ml de sangre periférica para la extracción de DNAg.

Tabla 2. Análisis de laboratorio realizados a los pacientes con CDLX.

PRUEBA:	CDLX-1	CDLX-2	CDLX-3
Carga viral	Normal	Normal	Normal
Niveles de toxoplasmosis	Normal	Normal	Normal
Estudios de función tiroidea	Normales	Normales	Normales
Hierro sérico	Normal	Normal	Normal
Capacidad de unión de hierro	Normal	Normal	Normal
Camitina sérica	Normal	Normal	Normal
Camitina de músculo, libre	N/D	Aumentada	Aumentada
Camitina de músculo, total	Aumentada	Aumentada	Aumentada
Contenido de glicógeno	N/D	Aumentado	Aumentado
CK-MM	Aumentada	Aumentada	Aumentada
$\alpha$ -glucosidasa	N/D	Normal	Normal
Fosforilasa	N/D	Normal	Normal
Fosfofructocinasa	N/D	Normal	Normal
Contenido mitocondrial	Normal	N/D	Normal
Biometría completa	Normal	Normal	Normal
Anticuerpos antinucleares	Normal	N/D	Normal
Factor reumatoide	Normal	N/D	Normal

N/D = No determinado

**4.5. LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES.** Se utilizó el método descrito por Miller y Anderson (46 y 47) que consiste en el aislamiento de linfocitos mediante columnas de Ficol-Hipaque, a partir de sangre periférica con heparina. Los linfocitos recuperados se lavaron en medio de cultivo RPMI 1640, se centrifugaron (5 min a 3000 r.p.m.) y el botón se resuspendió en 2 ml del mismo medio conteniendo 1X penicilina-estreptomicina (50  $\mu$ g/ml.-2,000 U/ml), suero bovino fetal al 20% y glutamina 4 mM. Para inducir la inmortalización de las células, éstas se incubaron a 37° C durante 7 días en presencia de 0.5 ml de ciclosporina (20  $\mu$ g/ml.) y 1 ml de virus Epstein-Bar obtenido por filtración del sobrenadante del cultivo de una semana, de células Marmoset B95-8 (almacenado a -130° C en alícuotas de 1 ml). Posteriormente, las células que sobrevivieron a este proceso se expandieron para

iniciar los cultivos permanentes. Cuando se observaron cúmulos de células agrupadas, estas se alimentaron con 10 ml de medio, cada 3 a 5 días, sin recambiar el medio de cultivo, hasta obtener aproximadamente 50 ml de cultivo con una densidad aproximada de  $1 \times 10^6$  células/ml.

Para el almacenamiento, las células se cosecharon por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 10 min y se resuspendieron en 1 ó 2 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se transfirieron a viales de plástico para congelación, los cuales se almacenaron a  $-70^{\circ}$  C durante toda la noche antes de ser transferidos para su almacenamiento final en nitrógeno líquido ( $-170^{\circ}$  C).

**4.6. PREPARACION DEL DNA GENÓMICO (DNAg).** Se utilizó un estuche comercial para extracción de DNAg a partir de sangre y/o linfocitos en cultivo . Este consistió en la lisis inicial de los eritrocitos de la sangre completa con la solución de lisis incluida en el estuche. Los linfocitos obtenidos después de la lisis de eritrocitos o directamente de células en cultivo, se digirieron durante 1 a 3 h a  $37^{\circ}$  C con 20  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml.). Los desechos celulares se precipitaron y eliminaron por centrifugación (15 min a 3000 r.p.m.). El DNA se obtuvo de la forma convencional mediante precipitación del sobrenadante con etanol al 100%.

**4.7. PREPARACIÓN DEL RNA:** Este se obtuvo a partir de linfocitos en cultivo ó a partir de biopsias de tejido congelado. En algunas ocasiones cuando no se contaba con ninguna de estas opciones, el RNA se extrajo de tejido fijado en parafina,

pero el rendimiento en este caso, fue muy bajo. Para la extracción se utilizó el reactivo TRIzol cuyo principio de extracción se basa en el descrito por Chomczynski y Sacchi (48). El reactivo de TRIzol consiste en una solución pre-mezclada de acetato de sodio, isotiocianato de guanidina y fenol. En el caso de las células en cultivo, a éstas se les permitió crecer hasta obtener un cultivo de 50 ml a una densidad aproximada de  $1 \times 10^6$  células/ml. Estas se centrifugaron en un tubo cónico de 50 ml y el botón de células resultante se utilizó para la extracción.

Para las biopsias, se procesaron muestras de aproximadamente 2 a 5 mg de tejido. Estas se trituraron con un bisturí en pedazos muy pequeños para facilitar la extracción. Cualquiera que fuera el caso (células o tejido), las muestras se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se homogenizaron en 0.8 ml de TRIzol (con vortex para el caso de células o con un homogenizador Polytron de Brikman en el caso de tejidos). Al homogenizado se le agregaron 100  $\mu$ l de Sevag (mezcla de clorofomo:alcohol isoamílico, 24:1), se mezcló con vortex y nuevamente se incubó por 15 min en hielo. Después de la incubación se centrifugó durante 30 min a 12,500 r.p.m. y la capa superior se transfirió a un tubo limpio.

El RNA se precipitó con 0.8 volúmenes de isopropanol a  $-20^{\circ}$  C durante 3 a 6 h. (de preferencia durante toda la noche en el caso de las biopsias, para mejorar el rendimiento). Al siguiente día, el RNA se obtuvo mediante centrifugación. La pastilla se lavó con etanol al 70%, se secó, se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua tratada con dietil-pirocarbonato (agua-DEPC) y se almacenó a  $-80^{\circ}$  C hasta su uso.

**4.8. OLIGONUCLEÓTIDOS:** Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía GIBCO-BRL y la secuencia de éstos se muestra mas adelante conforme se vaya describiendo su uso. La solución de trabajo se preparó en TE a una concentración de 10 µM.

#### **4.9. METODOS:**

**4.9.1. Análisis de ligamiento.** Antes de empezar el análisis de las mutaciones, la familia CDLX-2 se sometió a análisis de cosegregación y ligamiento para determinar si realmente estaba bien clasificada. En el análisis de cosegregación se mide la distancia genética entre un marcador o sonda (cualquier fragmento de DNA de localización conocida) y el gen responsable para la enfermedad, en nuestro caso se utilizaría un marcador del cromosoma X de localización conocida cerca o dentro del gen de la distrofina. Cuando el marcador utilizado cosegrega con la enfermedad, se dice entonces que hay ligamiento entre ellos.

Los análisis de cosegregación se pueden realizar mediante técnicas tipo Southern utilizando RFLPs (fragmentos de restricción, polimórficos, de longitud variable) o mediante la PCR analizando repeticiones polimórficas de di o trinucleótidos. Los resultados que estas metodologías generan se utilizan para alimentar programas computacionales para ligamiento que nos predicen la probabilidad ("score") de que nuestro marcador esté o no-ligado a la enfermedad. La metodología utilizada en este trabajo se describe a continuación

**4.9.1.1. Polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (PLFR) detectados mediante Southern-blot.** Se analizaron marcadores del cromosoma X específicos de la región 5' del gen de la distrofina con las sondas de DNAg: XJ1.1 (DXS206), XJ1.2 (DXS206), pERT 84-10 (DXS142) y pERT 87-30 (DXS164) (Tabla 2).

Cinco o diez  $\mu\text{g}$  de DNA se digirieron con la enzima de restricción correspondiente, descritas en la Tabla 2, las cuales fueron previamente determinadas como diagnósticas para estudiar ligamiento en CDLX (39). El DNA se digirió durante 3 h. a la temperatura apropiada, de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial, el DNA digerido se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador Tris-Acetato/EDTA (TAE) a 35 V durante 18 h. y éste se transfirió a membranas de nylon Zeta probe mediante transferencia alcalina.

Las sondas utilizadas se marcaron radioactivamente con  $10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$  con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ , utilizando un estuche comercial de marcaje con iniciadores nanométricos al azar. La hibridación se hizo siguiendo el método descrito por Church y Gilbert (49). La membrana se pre-hibridó durante 1 h. a  $65^\circ\text{C}$  en presencia de DNA de esperma de salmón. Posteriormente esta solución de prehibridación se reemplazó por la solución de hibridación que contenía la sonda desnaturalizada (5 min a  $95^\circ\text{C}$ ) y se hibridó toda la noche a  $65^\circ\text{C}$ .



Algunas de las sondas que contenían secuencias de DNA repetitivas generaron mucho fondo en los resultados. Por lo que en estos casos, las sondas se preasociaron con exceso de DNAg sonicado proveniente de placenta de humano. Para esto, la sonda marcada se hirvió durante 5 min junto con el DNA de placenta, se dejó preasociar durante 1 h a 65°C y posteriormente se adicionó a la membrana prehibridada. Los lavados para remover el exceso de radioactividad, se hicieron en 1% SDS y 1 mM EDTA hasta que menos de 500 cpm eran detectadas mediante el contador Geiger. Las membranas se exponían a la película radioactiva (Kodak) durante toda la noche. Los patrones de restricción resultante se compararon con los establecidos por Koenig y cols (20 y 22).

**TABLA 3. SONDAS EMPLEADAS EN LAS HIBRIDACIONES EN FILTRO.**

<b>A. SONDAS DE DNAg:</b>				
<b>Locus</b>	<b>Sonda</b>	<b>Localización</b>	<b>Enzimas:</b>	<b>Alelos (kpb):</b>
DXS206	XJ1.1	Xp21.2	<i>Taq</i> I	3.1/3.8
DXS206	XJ1.2	Xp21.2	<i>Bcl</i> I	1.7/2.0
DXS164	pERT 84-10	Xp21.1	<i>Taq</i> I	2.8/4.5
DXS164	pERT 87-30	Xp21.2	<i>Bgl</i> II	8.0/30
<b>B. SONDAS DE DNAc:</b>				
<b>DNAc</b>	<b>Sonda</b>	<b>Localización</b>	<b>Enzimas:</b>	
1-2a	9-7	Xp21.3-21	<i>Hind</i> III, <i>Bgl</i> II, <i>Taq</i> I	
2-b3	30-2	Xp21.4	<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI	
4-5a	30-1	Xp21	<i>Hind</i> III	

**4.9.1.2. Polimorfismo Mae III:** Los estudios por PCR de regiones polimórficas se realizaron utilizando el polimorfismo de sitio de restricción *Mae* III localizado en la región 5' del gen, cerca del promotor de músculo, dentro de la región pERT 84 (DXS142) (39). Para ello, esta región se amplificó por PCR, bajo las

condiciones que se describen en la Tabla 3. La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente: Mae-S: 5'-CAGGGATGCAAAGGAACTGGG-3' y Mae-A: 5'-CAGTTTGTTTAACAGTCACTC-3'. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador automatizado (Termocycler, Stratagene).

Tabla 4. Condiciones estándares de la PCR.

A. Componentes de la PCR	
DNAg	250 ng
Amortiguador de la reacción 1X	50 mM KCl. y 10 mM tris-HCl, pH 8.3
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTPs	200 µM
Oligonucleótido sentido (S)	1.0 µg
Oligonucleótido antisentido (A)	1.0 µg
Taq DNA polimerasa	2.5 U
Volumen de reacción	50 µl

B Condiciones de amplificación:	
Ciclo inicial de desnaturalización:	94°C / 2 min.
30 ciclos de:	92° C / 45 seg.
	62° C / 45 seg.
	72° C / 45 seg.
Ciclo final de extensión:	72° C / 5 min.

**NOTA:** Las condiciones que aquí se muestran son las condiciones generales, utilizadas en todas las amplificaciones por PCR. Cualquier cambio hecho se hará notar en el apartado que se esté describiendo

El polimorfismo se analizó digiriendo 10 µl del producto de la PCR con la enzima de restricción Mae III, durante 1 h. a 50°C, según las especificaciones del proveedor. El producto digerido se corrió en minigeles de poliácridamida al 5% y éstos se tificaron con bromuro de etidio (10 µg/ml.) y se observaron con luz UV.

**4.9.1.3. Análisis de ligamiento:** Este procedimiento fue realizado utilizando el programa LINKAGE (V5.03). El LOD score entre dos puntos se calculó para todos los pares de loci utilizando el programa MLINK. Se asumió un patrón de herencia ligado al cromosoma X y una penetrancia del 100%.

**4.9.2. ANÁLISIS DE DNAG:** Para excluir mutaciones por delección en el gen de la distrofina, como la causa de CDLX, el DNAG se analizó mediante Southern blot (utilizando las sondas de DNAC ya descritas en la Tabla 2) y mediante PCR Múltiplex, como se describe a continuación.

**4.9.2.1. Southern-blot.** Para el análisis por Southern-blot se utilizó el DNAG de los afectados, los familiares y los controles, contra las sondas de DNAC 1-2a, 2b-3, 4-5a, que cubren la región 5' del gen de la distrofina. Para esto se siguió el mismo protocolo descrito previamente para Southern-blot, y las enzimas utilizadas para la digestión del DNA se describen en la Tabla 2.

**4.9.2.2. PCR-Múltiplex:** Se realizó utilizando los estuches comerciales de 5 y 9 juegos de oligonucleótidos descritos por Beggs y cols. (50) y Chamberlain y cols. (51), respectivamente, los cuales permiten el análisis simultáneo de diferentes regiones del gen de distrofina: el promotor de músculo y los exones 4, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 48, 50, 51 y 52. Estos estuches contienen todos los componentes necesarios para la PCR excepto el DNA blanco y la enzima Taq DNA polimerasa, mismos que se añadieron inmediatamente antes de correr la reacción. De esta manera, 5 µl de DNAG (5 ng/µl) y 1 µl de enzima Taq (5U/µl) se agregaron a cada uno

de los tubos del estuche para llevar a cabo la amplificación, la cual se realizó bajo las siguientes condiciones: 94°C por 6 min seguido de 30 ciclos, cada uno consistiendo de los siguientes tres pasos: 94° C por 30 seg., 54° C por 30 seg. y 65° C por 4 min y al final se incluyó un periodo de extensión prolongada de 7 min a 65° C. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador automático (Robo-cycler, Stratagene). Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa Nu-Sieve al 3% teñidos con bromuro de etidio, bajo la luz UV.

**4.9.2.3. Análisis de los promotores del gen de la distrofina.** Las tres regiones promotoras de músculo (Pm), cerebro (Pc), y Purkinje (Pp), fueron amplificadas por PCR en cada uno de los afectados y controles normales. Los componentes de la PCR son los mismos descritos en la Tabla 6. La combinación de los oligonucleótidos utilizados se muestra en la Tabla 6 y fueron diseñados con base en las secuencias reportadas previamente (11,12,13 y 14). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes; un ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos que consistían cada uno de: 45 sec. a 92° C, 1 min a 55° C y 1 min a 72° C. Aquí también se incluyó el ciclo de extensión final de 5 min a 72° C. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los productos obtenidos se clonaron en un Vector-T (como se describe en clonación de productos de la PCR), para su posterior secuenciación.

**Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de las regiones promotoras.**

Promotor:	Secuencia:	Tamaño:
Pm-S	5'-TAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG-3'	535 pb
Pm-A	5'-TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCAGATCTGAGTCC-3'	
Pc-S	5'-GAAGATCTATATTTTACAACGCAGAAATGTGG-3'	630 pb
Pc-A	5'-CTTCCATGCCAGCTGTTTTTCTGTCACTC-3'	
Pp-S	5'-CAGCCTCCGCAGAATTTGAAATG-3'	102 pb
Pp-A	5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'	

S = Sentido, A = antisentido

**4.9.2.4. Análisis individual de los exones (2 al 10) e intrones (8 y 9).** Con base en la secuencia reportada por Koenig y cols.(20 y 22), se diseñaron varios juegos de oligonucleótidos que flanqueaban cada uno de los exones del 2 al 10 del gen de la distrofina e incluían los sitios aceptores y donadores de empalme. La secuencia de los oligonucleótidos se describe en la tabla 5. Las condiciones de la PCR son las mismas descritas en la Tabla 3, con excepción de las temperaturas de alineamiento que fueron de 55°C para todo este grupo de oligonucleótidos. Para amplificar los intrones 8 y 9 se utilizó la combinación de los oligonucleótidos 8S/9A y la 9S/10A, respectivamente.

Tabla 6. Oligonucleótidos para la amplificación de regiones del gen de la distrofina.

Exón:	Primer:	Secuencia:
Exón 2	2S	5'-GAAGATCTAGACAAACAAATGCATG-3'
	2A	5'-GAATTGCATGTCCCAATGGTTACCAT-3'
Exón 3	3S	5'-TTCTTAATTGCCTCCCAGATCTGAGTCC-3'
	3A	5'-TACCCTACGTGTGACTCTAAAGTGGTGCCGT-3'
Exón 4	4S	5'-GAATATTTTACAACGCAGAAATGTGG-3'
	4A	5'-GTACCATTTAACCCGGTCCTGAGTGGTGA-3'
Exón 5	5S	5'-CTTCCATGGCAGCTGTTTTTCTGTGACTC-3'
	5A	5'-TTGTGAACTGCGCTGACTTTGAACGTAG-3'
Exón 6	6S	5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCACAC-3'
	6A	5'-GTAGTACGTGCTTAGGGACCTAGCTGA-3'
Exón 7	7S	5'-CTTCCAGAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'
	7A	5'-CCCAAGGACGAGGTTTAGTCATCTGAC-3'
Exón 8	8S	5'-CTTAGAACGACAATTGTGCATTTACC-3'
	8A	5'-CATTACTCAGTCGTAGGTGTACCGGG-3'
exón 9	9S	5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'
	9A	5'-CATCTCTCGACGACTGCGTGGGCAA-3'
exón 10	10S	5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'
	10A	5'-CTGGCATTGACGTGCATTTACCCA-3'
Intrón 8	8S	5'-CTTAGAACGACAATTGTGCATTTACC-3'
	9A	5'-CATCTCTCGACGACTGCGTGGGCAA-3'
Intrón 9	9S	5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'
	10A	5'-CTGGCATTGACGTGCATTTACCCA-3'

### 4.9.3. ANALISIS DEL DNAC:

**4.9.3.1. Síntesis de DNAC:** La primera cadena de DNAC se sintetizó a partir de 4 µg de RNA total (preparado como se describió anteriormente). De esta forma, 4 µl de RNA (1 µg/µl) se incubaron en presencia de 20 U de un inhibidor de RNAsas (RNAsin ), durante 5 min a 95° C y se transfirieron a hielo inmediatamente. A esta mezcla se le añadió: 1 µl de RNAsin (20 U/µl), 5 µM de oligonucleótido reverso (antisentido), 50 µM de cada uno de los dNTPs, 4 µl de amortiguador de la reacción 5X (5X = 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 250 mM Tris HCl pH 8.3, 375 mM KCl), 200 U de la enzima Transcriptasa Reversa del virus de la leucemia de Moloney y agua DEPC para ajustar a un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37° C durante 1 h. y se congeló a -20° C hasta su uso.

**4.9.3.2. RT-PCR.** Para el análisis del DNAC de distrofina se utilizaron varios juegos de oligonucleótidos que cubrían los primeros 14 exones del gen y la parte 3' de cada promotor hasta el exón 2. Estos oligonucleótidos fueron derivados de la secuencia reportada por Koening y cols. (18) y se describen en la Tabla 6. Se utilizaron 2.5 µl de la reacción de DNAC para realizar las PCRs las cuales consistían de un volumen final de 25 µl que contenía: 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM sulfato de amonio, 0.1 % de Tween 20, 200 µM de cada dNTP, 200 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq DNA polimerasas. Las condiciones de extensión fueron: 94° C por 3 min y 30 ciclos de 92° C por 1 min, 58° C por 1 min y 72° C por 2 min y una extensión final de 5 min a 72° C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de los DNAs.

Exones:	Oligonucleótido:	Secuencia:
EX 1-INT.1A	I1-1S	5'-GGGATCACTCACTTTCCCC-3'
	I1-1A	5'-GATTTCTTGATTAACAAACC-3'
EX 1-INT.1B	I1-2A	5'-ACTGTCATAACGTTTAGT-3'
Ex 1 - 5	1-S	5'-TGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATG-3'
	5-A	5'-TTGACCTGCCAGTGGAGGAT-3'
Ex 4 - 7	4-S	5'-GCACTGCGGGTTTTGCAGAA-3'
	7-A	5'-GAATGCATTCCAGTCGTTGTGT-3'
Ex 5 - 10	5-S	5'-TGAATGCTCTCATGAACTGCC-3'
	10-A	5'-CTCTCCATCAATGAACTGCC-3'
Ex 10 - 14	10-S	5'-CATTGCAAGCACAAAGGAGAG-3'
	14-A	5'-CAGTTGCGTGATCTCCACTAGATTC-3'
MÚSCULO	Pm-S	5'-ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAG-3'
CEREBRO	Pc-S	5'-AAAACAGCTGGCATGGAAGATG-3'
PURKINJE	Pp-S	5'-CAGCCTCCGCAGAATTGAAATG-3'
Ex 2	E2-A	5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'

Para analizar el sitio de empalme del intrón 1 se utilizaron los oligonucleótidos I1-1S, I1-2A e I1-3A. La secuencia de estos oligonucleótidos se describe en la Tabla 6 y su localización se muestra en la figura 6. Las condiciones fueron las mismas descritas en la tabla 3. Los productos obtenidos se clonaron para posteriormente ser secuenciados.



-450		Pm			-400
AAAAAAATAA	CTTTGGTAGA	CAGTGGATACA	TAACAAATGC	ATGGATTAT	TCTGGGCATT
-390					-340
CCTTTTTTATT	TGGTAGAGTG	AAATTTTTGG	TGTTGTTGAG	AGGATAAAAA	AGGCATTTAA
-330					-280
AAGTCAATTT	TGAATCCGGA	TTTTCTGCTC	TGTTAATAAA	TTCACATGAA	AGTTACAGAA
-270					-220
AGTATTGTTA	TGCTTTTGTA	CTGAATAGTT	TTTGTGTTA	GAAGGCTTTA	AAAGCAAGTA
-210					-160
CTATGTCCAC	TGTGCTATTC	TGGTTTGGAT	ATTAATCAGA	ACCACAGTTG	AGCATTGTTT
-150					-100
GAATTGACAG	AGCTTGCCAT	GCTGGAAGCA	CAACGTTATA	TGTAGTGACC	ATGGACAGTC
-90					-40
CTATTATGGG	AAACCAACTT	GAGAGAGAAG	GCGGGTCACT	TGCTTGTGCG	CAGGTCCTGG
-30			+1		+21
AATTTGAAAT	ATCCGGGGGC	CTCTACAGAA	TCTTGGCATC	AGTTACTGTG	TTGACTCACT
+31	11-1S				+81
CAGTGTG GGG	ATCACTGACT	TTCCCCCTAC	AGGACTCAGA	TCTGGGAGGC	AATTACCTTC
+91					+141
GGAGAAAAAC	GAATAGGAAA	AACTGAAGTG	TTACTTTTTT	TAAAGCTGCT	GAAGTTTGTT
+151					+201
GGTTTCTCAT	TGTTTTAAG	CCTACTGGAG	CAATAAAGTT	TGAAGAAGTT	TTACCAGGTT
TTTTTATCG	CTGCCTTGAT	ATACACTTTT	CAAAATGCTT	TGGTGGGAAG	AAGTAGAGGA
			11-2A		
			CTGTT gtaagtacaaagtaactaaaaatataatcttggtggcataacgtttagtttgacaagctcactaat		
			taggtagattgatttaaattatcacagtagttgcaagaagcataaatgttatatactgcatatatatgtatt		
			atlcaggaataatattttcattgggaaaactttcaacagaaatggagtgtaaagttttctttgcatagaacta		
			11-1A		
			aacacacatgatttcttgattaacaaccactgcag		

Figura 6. Secuencia de la región promotora de músculo y el exón 1. Los nucleótidos correspondientes a la región promotora y al exón 1 están en letras mayúsculas y la secuencia correspondiente al primer intrón está representada con letras minúsculas. La secuencia correspondiente al exón 1 inicia en el sitio marcado como (+1) que corresponde también al sitio de inicio de la transcripción. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar esta región está representados por letras negrillas y el nombre de cada oligonucleótido se indica en la parte superior de éste.

#### 4.9.4. DETECCIÓN DE MUTACIONES

**4.9.4.1. Análisis mediante polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP, por las siglas en inglés).** El análisis de las mutaciones se realizó mediante el método de Orita y cols. (52), el cual es una de las metodologías más utilizadas para detección de mutaciones puntuales, y se estima que tiene una sensibilidad de detección entre el 85 a 90%. Se basa en que, cambios en la secuencia del DNA, inclusive de una sola base, resultan en alteración de la estructura conformacional de la hebra sencilla del DNA, comparada con aquella original (no mutada). De esta manera, para el análisis de las mutaciones, se amplifican mediante PCRs radioactivas, los fragmentos de DNA candidatos al análisis y los respectivos controles normales, y estos productos de PCR se desnaturalizan para separar el DNA en cadenas sencillas. Los cambios en la conformación del DNA, pueden ser detectados y analizados mediante electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida. Los patrones de bandas resultantes generados por los DNAs de los afectados se comparan contra las bandas de los DNAs controles y finalmente, cualquier banda anormal se secuencía para determinar el cambio.

Como tamizaje general, todas las muestras de afectados y sus controles normales correspondientes se sometieron a un análisis individual por SSCP, de cada uno de los exones (del 2 al 10) del gen de la distrofina, utilizando los mismos oligonucleótidos descritos en la Tabla 5. Un juego adicional de oligonucleótidos fue diseñado para amplificar la región que incluía el extremo 3' del Intron 8 y el exón 9. De

esta forma se generó un juego de oligonucleótidos que flanqueaban la secuencia normal, la secuencia polimórfica y la mutada del exón 9 en la familia CMLX-1.

Para el análisis de SSCP, el producto de PCR necesita estar marcado radioactivamente. Para esto, a la mezcla de reacción se le añadió uno de los nucleótidos marcados con  $^{32}\text{P}$ . Cada reacción de PCR consistió de: 100 ng. de DNAg en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  de reacción, la cual contenía: Amortiguador de la reacción 1X, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido, 0.1  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP, y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa. Los ciclos de amplificación consistieron de un ciclo inicial de 2 min a 94° C, 30 ciclos que consistían cada uno de: 30 sec. a 92° C, 30 sec. a 60° C y 30 sec. a 72° C, seguidos de un ciclo final de extensión de 2 min a 72° C.

Después de la amplificación, las muestras se desnaturalizaron agregando 40  $\mu\text{l}$  de solución de formamida (formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilencianol al 0.05%) y calentando a 85°C durante 10 min. Las muestras se transfirieron inmediatamente a 4°C. De cada una de las muestras, se cargaron 3.5  $\mu\text{l}$  en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida:bisacrilamida (50:1) al 10%. Los geles se corrieron en amortiguador TBE al 0.5% durante 18 h. a 8 W, en el cuarto frío. El gel se secó y se expuso a la película radiográfica Kodak, durante toda la noche.

Para el análisis del gel, se compararon las bandas resultantes de los controles contra las bandas resultantes de los afectados. Las bandas con patrones diferentes (anormales) de afectados y sus respectivos controles normales, se cortaron

directamente de los geles de poliacrilamida secos. Estos se eluyeron en 100  $\mu$ l de agua destilada y se calentaron a 85° C por 30 min. Del DNA eluido, 10  $\mu$ l fueron utilizados como templado en una segunda PCR utilizando el mismo juego de oligonucleótidos y condiciones que habían dado origen a las bandas de SSCP. Estos últimos productos de PCR se purificaron utilizando columnas Qiaquick (Qiagen) y 200 ng de cada producto se utilizaron para la reacción cíclica de secuenciación.

**4.9.4.2. Clonación y Secuenciación.** Los productos de la PCR fueron subclonados directamente en un vector-T (53) utilizando el estuche comercial "T-A Cloning Vector". (Invitrogen, Co). Los vectores-T son plásmidos utilizados para clonación, que tienen la característica de estar abiertos en uno de los sitios de clonación múltiple con una enzima restricción que deja terminaciones romas. Posteriormente, a cada una de las puntas (del vector abierto en sus extremos 5' y 3') se les adiciona una cola de 2 a 4 bases de dTTP (cola de dTTPs). Estos vectores se construyen para clonar productos de la PCR que han sido amplificados con la enzima *Taq* DNA polimerasa, que portan en sus extremos colas de dATPs (de 2 a 4 residuos). Aprovechando esta ventaja de las colas de A en los productos de PCR, y colas de T en los vectores, se facilita la clonación mediante la unión de A-T entre el producto de la PCR y el vector. Los plásmidos obtenidos de esta manera, conteniendo los insertos de distrofina, se crecieron en forma convencional en medio LB en presencia de ampicilina y se purificaron con un estuche de mini-preparación de DNA (Qiagen). Estos DNAs se secuenciaron directamente utilizando los oligonucleótidos M13 y SP8 mediante la técnica de reacción de PCR-cíclico. Esta técnica se realizó utilizando un estuche comercial de Stratagene.

Los productos resultantes de las reacciones de secuenciación se corrieron en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida al 6%, en presencia de urea. Los geles se secaron y expusieron a la película radiográfica durante toda la noche.

La secuenciación automatizada se llevó a cabo en un secuenciador automatizado ABI 370. La preparación de las muestras se realizó de la misma manera que se describió anteriormente para la secuenciación manual. Se utilizaron 200 ng de DNA de plásmido en cada reacción de secuenciación.

#### **4.9.5. ANALISIS DE PROTEINAS**

**4.9.5.1. Western-blot:** Para estas pruebas se utilizó tejido proveniente de biopsias de músculo esquelético o cardiaco. Todas las biopsias fueron almacenadas en nitrógeno líquido.

Para la preparación de la muestra, aproximadamente 50 mg de tejido se trituraron con un bisturí sobre una caja de Petri desechable. El tejido macerado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadieron 300 µl de solución de Laemmli (Trizma base 2.5 M, SDS 4%, Glicerol 50%, pH 6.8). Esto se mezcló en un vortex durante 10 min. Si la muestra aún contenía fragmentos grandes de tejido, éstos se homogeneizaron con un homogenizador eléctrico (Poli-trón, Brickman) y posteriormente se hirvieron a 100°C durante 3 min, y finalmente se centrifugaron durante 5 min a 12,000 r.p.m.

Aproximadamente 25 a 30  $\mu$ l del sobrenadante se utilizó para cargar geles de SDS- acrilamida al 8%. Todos los geles se corrieron entre 50 a 80 V hasta que el colorante del frente de corrimiento alcanzó el fondo. Las proteínas se transfirieron a membranas de Nylon a 500 mA durante 18 h. a 15° C, utilizando amortiguador de glicina sin metanol (Trisma base 0.25 M, Glicina 0.2 M). Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20) durante 2 h. a temperatura ambiental.

Se utilizaron tres anticuerpos para la caracterización, un anticuerpo dirigido contra la región N-terminal, uno contra la parte central y un tercero dirigido contra la parte C-terminal de la proteína distrofina. Un cuarto anticuerpo anti-actina se utilizó como control interno del sistema para homogeneizar las cantidades de proteína en el gel. Todos los anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:1000 en solución TBST y leche descremada al 5%, durante 1 h. a temperatura ambiental. El primer anticuerpo se incubó durante 3 h a temperatura ambiental. Para eliminar el exceso de anticuerpo, las membranas se lavaron con PBS IX tres veces durante 15 min. Después del último lavado, las membranas se incubaron 1 h. a temperatura ambiental con el anticuerpo secundario, que es una IgG de conejo anti IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina. El revelado se hizo con 10 ml de la mezcla de substratos cromogénicos: 66  $\mu$ l de nitro-azul de tetrasolio (NBT) al 50% y 33  $\mu$ l de 5' bromo-4' cloro-indoilfosfato (BCIP) al 50%, diluidos en TBST en presencia de 50 mM MgCl<sub>2</sub>.

**4.9.5.2. Análisis estructural de la proteína.** El análisis de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo utilizando el programa MOSAIC (54 y 55). La predicción de las formas  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada se realizó con un método de segmento orientado

diseñado para localizar estructuras secundarias. Además, la hidrofobicidad y la predicción de la estructura plot se realizó utilizando el método de predicción de Garnier-Osguthorpe-Robson (56 y 57).

## CAPÍTULO V

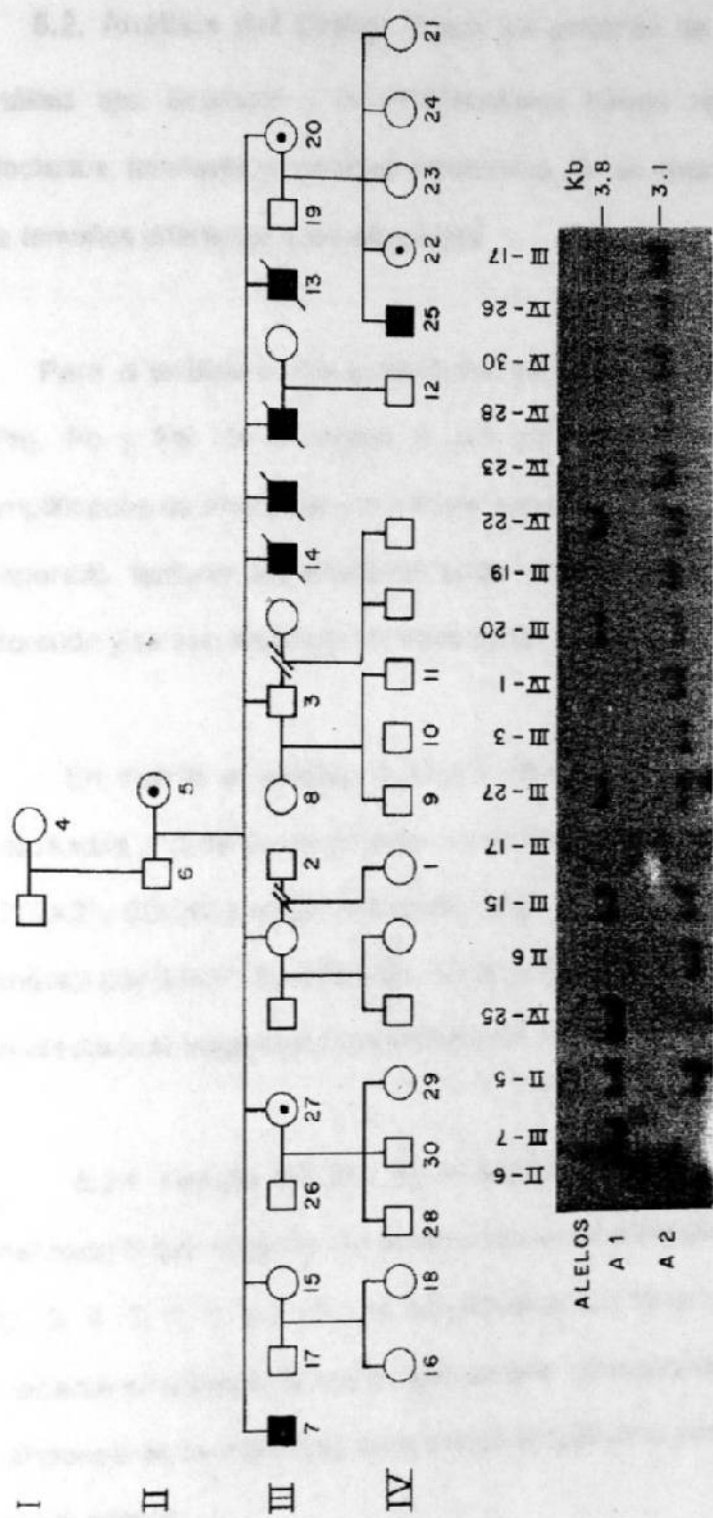
### RESULTADOS

**5.1. Análisis de ligamiento:** Las familias CDLX-3 y CDLX-1 habían sido previamente analizadas y descritas (39). El análisis de ligamiento se realizó únicamente en la familia CDLX2. La configuración alélica de varios marcadores fue analizada utilizando las sondas XJ1.1, XJ1.2, pERT 84-10, pERT 87-30 y Mae III. Todos los marcadores utilizados ya habían sido previamente localizados en la banda Xp21, dentro del gen de la distrofina y clasificados como diagnósticos para CDLX en base a lo descrito por Towbin y cols. (39). La sonda XJ1.1 proporcionó mayor ligamiento con un LOD score de +2.9 a una  $\theta = 0$ , utilizando ligamiento de 2 puntos.

El análisis multipuntual utilizando las sondas XJ1.1, XJ1.2 y pERT 84-10 demostró un LOD score combinado de +3.2. La sonda XJ1.1 está localizada dentro de la región 5' del gen de la distrofina, exactamente dentro de la parte 5' del intrón 7 del gen. La localización de las sondas se mostró previamente en la Figura 3).

La Figura 7 muestra los resultados de la autorradiografía del análisis tipo Southern de DNAg de sujetos afectados, portadoras y controles, utilizando la enzima de restricción *Taq I* y la sonda XJ1.1. En esta figura se observa como el alelo mayor (banda de 3.8 kb) está presente en todos los afectados y portadoras, mientras que está ausente en los sanos. Con respecto al marcador pERT 84-30, éste no resultó informativo aún y utilizando varias enzimas como *Hind III* y *Bgl II*, como tampoco resultó informativo el polimorfismo Mae III que se estudió por amplificación de una región cercana al promotor de músculo (Pm).





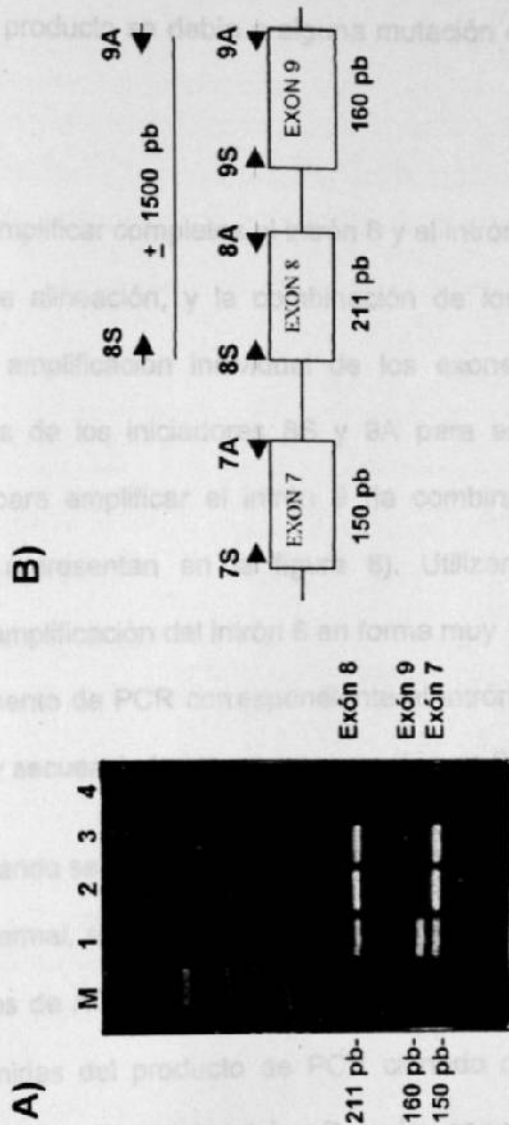
**Figura 7. Autorradiografía de la familia CDLX-2. Resultado del análisis tipo Southern con la sonda XJ1.1. Se observa que el alelo mayor de 3.8 Kb segrega con la enfermedad.**

**5.2. Análisis del DNAg:** Todos los patrones de bandas obtenidos mediante el análisis tipo Southern y la PCR-Multiplex fueron normales en todos los sujetos afectados, familiares y controles estudiados. No se encontró ninguna delección o bandas de tamaños diferentes a los esperados.

Para el análisis de los promotores se amplificaron las tres regiones promotoras (Pm, Pc y Pp) de la región 5' del gen, mediante PCR. Todos los productos amplificados de afectados y controles mostraron bandas de amplificación del tamaño esperado, tanto en los afectados como en los controles. Los productos de PCR se clonaron y se secuenciaron sin encontrarse ninguna anomalía.

En cuanto al análisis individual de los exones de la región 5' del gen, los resultados mostraron amplicones normales en todos los afectados de las familias CDLX2 y CDLX3 y en los controles, tanto en el producto de PCR directo, como en el análisis por SSCP. Sin embargo, en la familia CDLX-1 nunca fue posible amplificar en el afectado el fragmento correspondiente al exón 9 (Figura 8).

**5.2.1. Familia CDLX-1:** En el análisis individual de los exones, con excepción del exón 9 que no pudo ser amplificado en el afectado, todos los exones analizados (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10) se amplificaron sin ningún problema. La madre de este paciente sí presentó la banda del tamaño correspondiente y no se observó ninguna diferencia en la intensidad de la banda amplificada cuando se comparó con la de una mujer normal.



**Figura 8. AMPLIFICACIÓN MULTIPLE DE LOS EXONES 7, 8 Y 9.** A). En el carril 1 se observan las tres bandas obtenidas después de la amplificación simultánea de los exones 7, 8 y 9 cuando se utiliza DNAG obtenido a partir de linfocitos de un control normal. Los carriles 2 y 3 muestran respectivamente, DNAG proveniente de linfocitos y tejido cardiaco del paciente CDLX-1; éstos muestran amplificación de las bandas de 150 y 211 pb correspondientes a los exones 7 y 8, pero ausencia de la banda de 160 pb correspondiente al exón 9. El carril 4: control negativo de la PCR. M: marcador. B). Se muestran las posiciones de los

Como se desconocía la secuencia del intrón 9 en el Banco de Genes (Gen Bank), no se pudo diseñar otro juego de iniciadores que cubrieran más hacia la parte 5' del exón (dentro del intrón 8) que permitiera ampliar la ventana de acceso al exón 9, y así determinar si la falta de producto se debía a alguna mutación en el exón o en el sitio de empalme.

En un intento de amplificar completos el intrón 8 y el intrón 9, se probaron diferentes condiciones, tiempos de alineación, y la combinación de los oligonucleótidos que se habían utilizado en la amplificación individual de los exones. Con este objetivo, se utilizaron combinaciones de los iniciadores 8S y 9A para amplificar el intrón 8 y los iniciadores 9S y 10A para amplificar el intrón 9 (la combinación de los primers y la posición de éstos se representan en la figura 8). Utilizando esta combinación de iniciadores, se logró la amplificación del intrón 8 en forma muy nítida, pero nunca se logró la del intrón 9. El fragmento de PCR correspondiente al intrón 8 mide aproximadamente 1500 pb y fue clonado y secuenciado completamente (Figura 9).

Curiosamente, cuando se comparó la secuencia obtenida del intrón 8 entre el sujeto afectado y un control normal, se encontró que en las posiciones 1043 y 1045 del gen del afectado, había cambios de ACG → GCA y estos cambios fueron reproducibles en tres clonas diferentes obtenidas del producto de PCR clonado del paciente. La Figura 10 muestra la secuencia obtenida del intrón 8 y la secuencia y posición de los oligonucleótidos.

Para tratar de explicar estos cambios (mutaciones) encontrados en el exón 9 y confirmar si eran la causa de la ausencia inicial de amplificación del exón 9, se diseñó un nuevo oligonucleótido (9b-S: GATCTGTTTTCTACCATGTTGG) con base a la secuencia

secuencia ya obtenida del intrón 8. Este nuevo oligonucleótido se localiza más adentro del intrón 8 y fuera de la región supuestamente mutada del intrón 9, su localización se muestra en la Figura 10.

Cuando se utilizaron los iniciadores 9bS y 9A, se logró obtener producto amplificado tanto en los controles normales como en los afectados y portadoras. Esto significaba que este nuevo primer efectivamente flanqueaba el sitio del cambio. Este juego de oligonucleótidos 9b-S/9A, se utilizó también para el análisis por SSCP.



Figura 10. Secuencia nucleotídica del intrón 8, intrón 9 y exón 9.

**FIGURA 9. AMPLIFICACION DE LOS INTRONES 8 Y 9:** Se muestran las condiciones de MgCl<sub>2</sub> y temperatura y la combinación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación. La PCR correspondiente al intrón 8 (8S/9A) muestra una banda nítida y más intensa, de aproximadamente 1,500 pb, cuando se utiliza MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM y una temperatura de alineamiento de 55° C. El fragmento correspondiente al intrón 9 nunca pudo ser amplificado, aún utilizando otras condiciones de temperatura ó MgCl<sub>2</sub>

**8 S** →  
gacattcgtgtaattgATGTT GATACCACCTATCCAGATAAGAAGTCCATTTTAATG  
  
TACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCA  
  
CCAGGAAGTGAAATGTTGCCAAGGCCACAAGTGAATAAAGAAGAACATTTT  
  
← **8 A**  
CAGTTACATCAAATGCACTATTCTCAACAGgtaaagtgtgtaaaggaca gctactatfcaa  
  
gatgtttctgtttatgatgcatttttaggtatfagtgccacatatataaacttatatgatatacacgtgtataatafaca  
agcctaafgtatgtatgtacaaaaacagagacagactaaacctttcaatttaaccctnncnntttggntcnaifgg  
ttcaanntccattcaaacatattttaaaaatactattcatatgtaccatatcataggaatatagaacataatataffaa  
attccattgtgtaacacacaatgaaatgaaaggcaaacttacgtacatattaactctaaaatcttcatcaactagaa  
caaagagctagagaaagattaaaggcaaatacagtttttaatacattaaaaatactttatgacaatgatgtacaaagt  
cagattttgnttattcaggataacaattngaaaaatagaaaagtggttaaaaatattcaantnaacaataangaaaaa  
calgatgaaattctctggtacataaattgtatagaalttagtgggtctcccattgacattggctgttcttctcaacagtg  
gggtgttggatgtttcctatgctttctcaggcacaacaacagtgaaagaaacctttagcaacattctgctgaatgtgt  
ggagagctctaggccaaactctctcactngctgagciagcictgtattagcttatgaaattintagctttaccttggg  
aftaagaaggaagttngctatgggatgacctgttttccggnttggngagtacctatcccataaaatgntggagttgtg  
ttacttgggatcctcatggctaataagnatgctcatatctcccagatcatttactcccnacatgataaataagtgccnf  
cattctgggagaaaaccaatttcggatatcattatatagttttagtattaacatgatctcaccattccattaatgt tctgttt

**9b S** →  
tctaccatgttgg gaagtagtcctttcgggttacttatggtttttccccctctctatccactccccaaacccttctc

**9 S** →  
tgcagATCAG GTCAGTCTAGCACAGGGATATGAGAGACTTCTTCCCCTAAGC  
  
CTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGAAAC  
C

← **9 A**  
CCTCACAGgtctgtcaacatttac

**Figura 10. Secuencia nucleotídica del exón 8, intrón 8 y exón 9.**

Los exones se representan con letras mayúsculas y los intrones con minúsculas. Las letras en negritas y subrayadas indican la secuencia de los oligonucleótidos. El oligonucleótido 9b-S corresponde al oligonucleótido que se diseñó para la confirmación de la mutación mediante el análisis por SSCP.

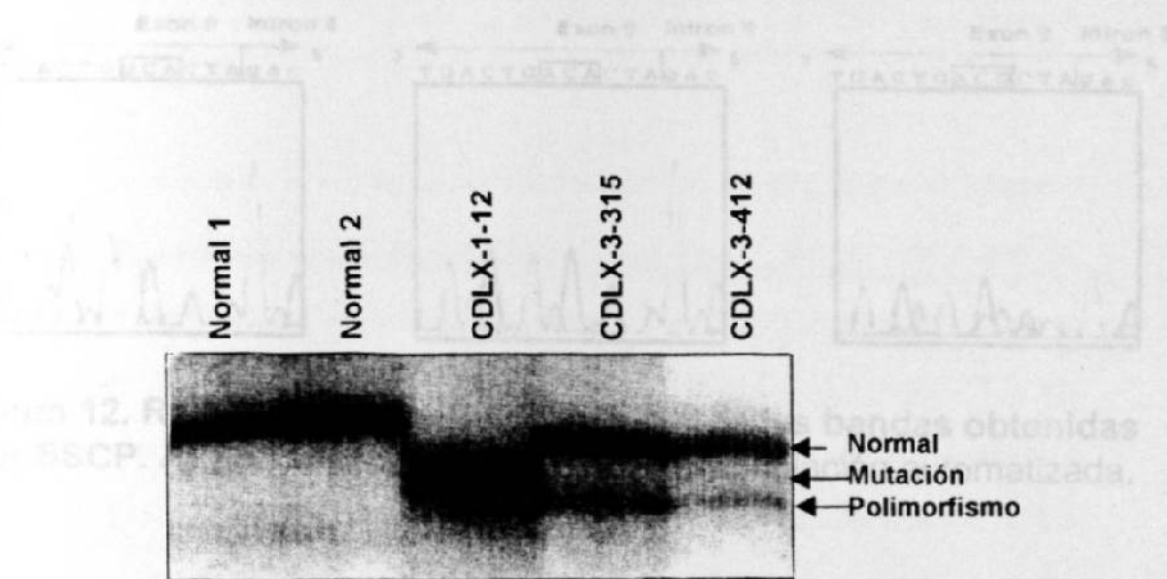
**5.3. Resultados del análisis por SSCP:** Se realizó análisis de SSCP a todos los productos de PCR de exones individuales, sin encontrar cambio alguno cuando se compararon los afectados contra los controles normales, excepto en el caso del afectado de la familia CDLX-1 (que se describe detalladamente a continuación) en el que nunca se obtuvo el producto de PCR del exón 9 y en el que la mutación se detectó después de secuenciar el fragmento completo que comprendía el intrón 8 y el exón 9.

**5.3.1. Familia CDLX-1:** Una vez obtenida la secuencia normal del intrón 8, ésta se utilizó para diseñar un nuevo iniciador (9bS: 5'-TCTGTTTTCTACCATGTTGG-3') que se localizara más hacia adentro del intron (y fuera del exon 9), en un intento de modificar los sitios a los que se unían los primers originales y con los que no se obtenía ningún producto amplificado (Ver figura 10 para la ubicación del primer 9bS).

Finalmente cuando se utilizó este nuevo primer, logró obtenerse producto amplificado a partir del afectado de la familia CDLX-1. Una vez lograda la amplificación, se procedió a analizar dicho fragmento de amplificación mediante SSCP.

Para el análisis por SSCP, se amplificaron y se analizaron las muestras de los afectados, madres portadoras y 100 sujetos normales, utilizando el par de oligonucleótidos 9b-S/9A. Los resultados de SSCP mostraron patrones de bandas de migración diferente a la de los normales, y estos patrones se ilustran en la Figura 11. Todas estas bandas se cortaron a partir del gel de poliacrilamida y se caracterizaron mediante secuenciación manual y automatizada (Figura 12).

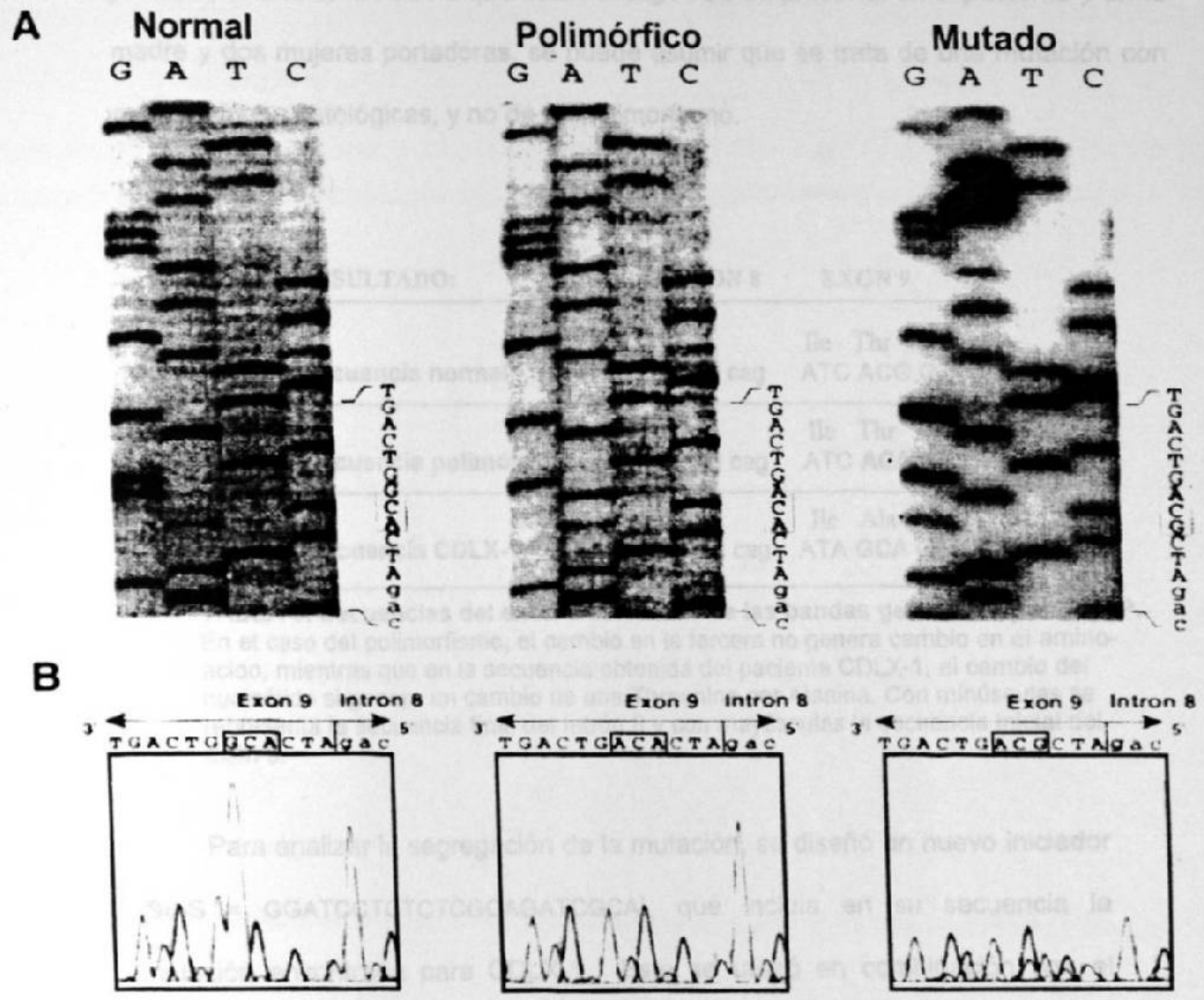
Las secuencias obtenidas a partir de las bandas de SSCP se analizaron comparándolas con las secuencias obtenidas del Intron 8 y con las secuencias del exón 9 reportadas en el Gen-Bank (referencia No. X14298), identificándose que había tres alelos diferentes con cambios en la posición 1043. En dicha posición, un alelo presentaba el codón **ACG**, que correspondía a la mayoría de las muestras y controles normales. Un segundo patrón que presentaba el codón **ACA**, que correspondía a la sustitución en la tercera base (G1045A) y esta se encontró en sujetos normales y también en varios miembros de las familias CDLX-1 y CDLX-3. Este cambio se presentó en más del 10% de los controles estudiados. Y curiosamente, los afectados y los controles que presentaron este polimorfismo pertenecían a la raza negra y ninguno de los controles de raza blanca lo presentó. Finalmente, el tercer alelo mostró la secuencia **GCA** que correspondía a la sustitución en la primera base (A1043G) se encontró únicamente en el sujeto afectado de CDLX-1 y en las mujeres portadoras, de esta misma familia.



**Figura 11. Análisis por SSCP.** Se muestra patrón de bandas generado por las siguientes muestras analizadas: dos DNAs controles (normales) que presentan patrón de bandas semejante, el afectado de la familia CDLX-1 y el patrón polimórfico que se detectó en la familia CDLX-3. Cada una de estas bandas fue cortada a partir del gel y analizada por secuenciación.



El cambio en la primera base (A1043G) encontrada en el paciente de la familia CDLX-1, origina un cambio de treonina por alanina (aminoácido 279, región H1 de la proteína) (Tabla 8). Debido a que esta hallazgo solo se presentó en el paciente y en la



**Figura 12. Resultados de la secuenciación de las bandas obtenidas por SSCP. A) Secuenciación manual B) Secuenciación automatizada.**

La amplificación, cuya diferencia consistió únicamente en la combinación de los oligonucleótidos utilizados. La amplificación selectiva de la mutación (con los iniciadores Ro-S/2A) se observó únicamente en el individuo afectado y en las mujeres portadoras de la familia CDLX-1 y no arrojó resultados en sujetos normales.

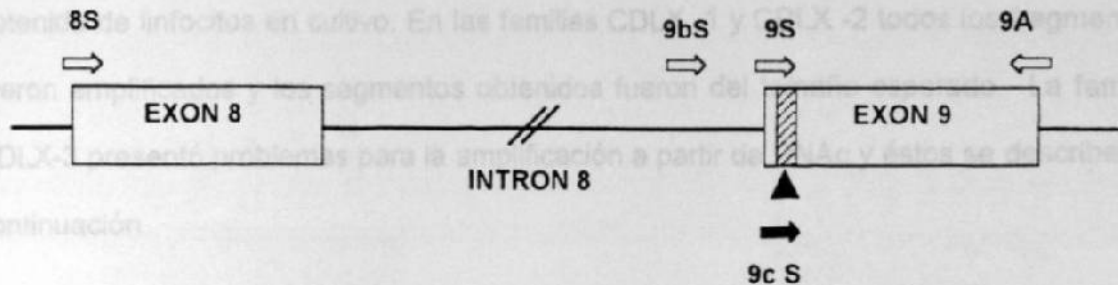
El cambio en la primera base (A1043G) encontrada en el paciente de la familia CDLX-1, origina un cambio de treonina por alanina (aminoácido 279, región H1 de la proteína) (Tabla 8). Debido a que este hallazgo solo se presentó en el paciente y en la madre y dos mujeres portadoras, se puede asumir que se trata de una mutación con repercusiones patológicas, y no de un polimorfismo.

RESULTADO:	INTRON 8	EXON 9
Secuencia normal:	ctc tcg cag	Ile Thr Val ATC ACG GTC
Secuencia polimórfica:	ctc tcg cag	Ile Thr Val ATC ACA GTC
Secuencia CDLX-1:	ctc tcg cag	Ile Ala Val ATA GCA GTC

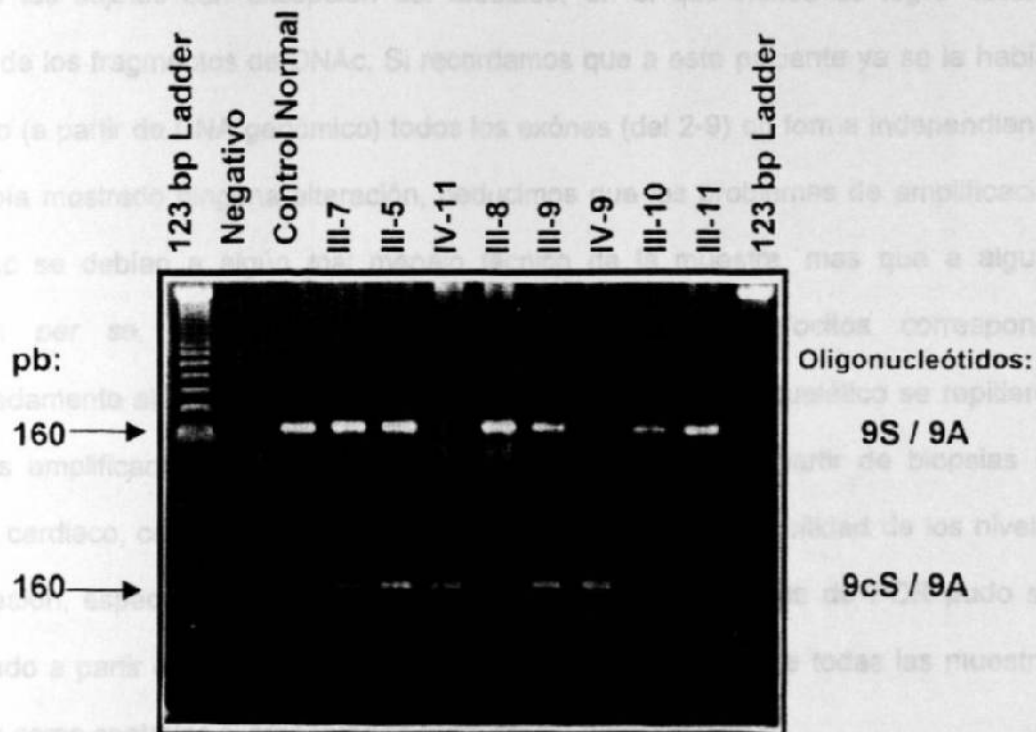
**TABLA 8.** Secuencias del exon 9 obtenidas de las bandas generadas por SSCP. En el caso del polimorfismo, el cambio en la tercera no genera cambio en el aminoácido, mientras que en la secuencia obtenida del paciente CDLX-1, el cambio del nucleótido si genera un cambio de una Threonina por Alanina. Con minúsculas se representa la secuencia final del Intrón 8 y con mayúsculas la secuencia inicial del exón 9.

Para analizar la segregación de la mutación, se diseñó un nuevo iniciador (9c-S = GGATCCTCTCTCGCAGATCGCA), que incluía en su secuencia la mutación encontrada para CDLX-1. Este se utilizó en combinación con el iniciador 9A para amplificar las muestras de la familia CDLX-1 (Figura 13). En esta figura se muestra la comparación simultánea de dos reacciones distintas de amplificación, cuya diferencia consistió únicamente en la combinación de los oligonucleótidos utilizados. La amplificación selectiva de la mutación (con los iniciadores 9c-S/9A) se observó únicamente en el individuo afectado y en las mujeres portadoras de la familia CDLX-1 y no arrojó resultados en sujetos normales.

A).



B).

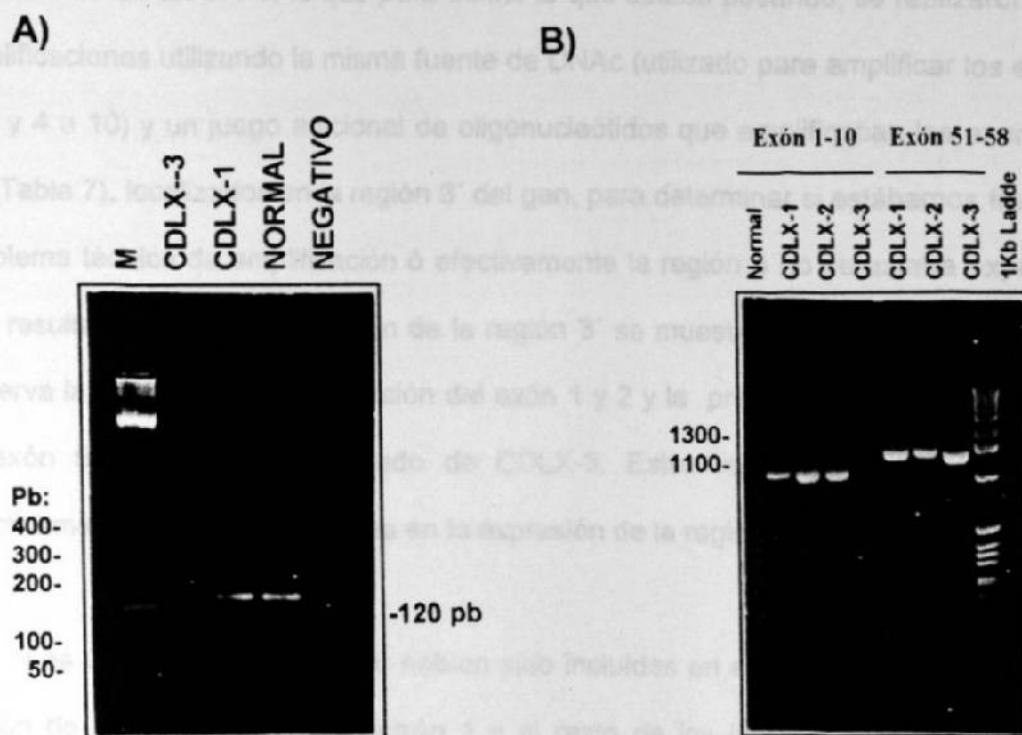


**Figura 13 Análisis del exón 9 en CDLX-1.** A). Se muestra la posición de los oligonucleótidos utilizados en la caracterización del Exón 9. El ▲ representa el lugar de la mutación en la familia CDLX1. La ➔ representa el oligonucleótido (9cS) que incluye la mutación. B). Muestra el análisis de 8 miembros de la familia CDLX-1 (ver pedigrí en Anexo 1), de un control normal y el control negativo de la reacción. La línea superior del gel muestra los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos 9S/9A. La línea inferior muestra los productos de la amplificación con los oligonucleótidos 9cS/9A. Ambos productos de PCR de 160 pb.

**5.4. Resultados del análisis de los DNAc.** El análisis del DNAc mediante secuencias sobrepuestas que cubrían los exones 2 al 14, se realizó a partir de RNA obtenido de linfocitos en cultivo. En las familias CDLX -1 y CDLX -2 todos los fragmentos fueron amplificados y los segmentos obtenidos fueron del tamaño esperado. La familia CDLX-3 presentó problemas para la amplificación a partir de DNAc y éstos se describen a continuación

**5.4.1. Familia CDLX-3:** En el caso de la familia CDLX-3, el DNAc se logró amplificar en todos los sujetos con excepción del afectado, en el que nunca se logró obtener ninguno de los fragmentos de DNAc. Si recordamos que a este paciente ya se le habían analizado (a partir de DNA genómico) todos los exones (del 2-9) en forma independiente, y no había mostrado ninguna alteración, deducimos que los problemas de amplificación del DNAc se debían a algún mal manejo técnico de la muestra, mas que a alguna mutación *per se*. Como la expresión de distrofina en linfocitos corresponde aproximadamente al 0.0001% de la expresión total en músculo esquelético se repitieron todas las amplificaciones, esta vez utilizando DNAc obtenido a partir de biopsias de músculo cardiaco, con la finalidad de descartar problemas por variabilidad de los niveles de expresión, específica de tejidos. De igual modo, ningún producto de PCR pudo ser amplificado a partir del DNAc de corazón del afectado, mientras que todas las muestras incluídas como controles si presentaban producto de amplificación.

Adicionalmente, se probaron diferentes combinaciones de iniciadores (ejem: exones 1 a 2, exón 4 a 10, exón 2 a 13 etc.), y se ajustaron varias condiciones para PCRs largos (mayores de 1000 pb) sospechando de que hubiera algún producto diferente, de tamaño mayor al esperado, debido a un empalme alternativo que impidiera la obtención de los productos esperados, pero aún así no se logró amplificación en el afectado de CXLX-3.



**Figura 14: Análisis del DNAc:** A). Amplificación del exón 1 al 2 a partir de DNAc proveniente de tejido cardíaco. CDLX-3 no muestra producto amplificado. B). Amplificación de los exones 1 a 10 y exones 51 a 58. Se observa la ausencia de amplificación en CDLX-3 para los exones 1 a 10.

Estos resultados con DNAc, no fueron congruentes con los obtenidos en las amplificaciones de los exones individuales a partir de DNA genómico (exones 2 al 10), en los que el afectado y los familiares de la familia CDLX-3 se analizaron sin encontrar alguna anomalía. Además de que, en el caso del afectado de la familia CDLX-3, la amplificación de la región promotora había sido exitosa cuando se utilizaron iniciadores exclusivos para esta región y también cuando se utilizó un segundo juego de iniciadores para la región promotora y el exón 1.

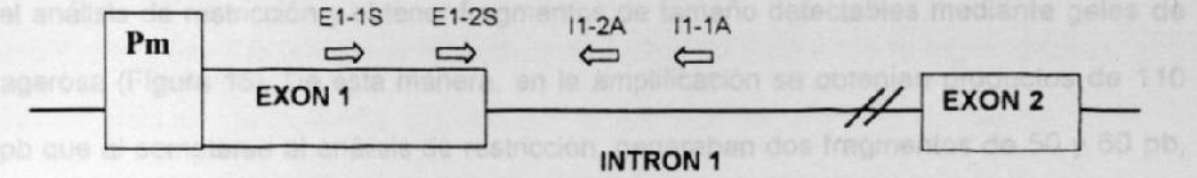
De manera que si toda la región promotora hasta el exón 1 (Pm-exón1) y los exones 2 al 10 (incluyendo los sitios de empalme) habían sido analizados sin encontrarse mutaciones, no había ninguna explicación para la ausencia de amplificación en el

mutaciones, no había ninguna explicación para la ausencia de amplificación en el afectado de CDLX-3. Por lo que para definir lo que estaba pasando, se realizaron nuevas amplificaciones utilizando la misma fuente de DNAc (utilizado para amplificar los exones 1 al 2 y 4 a 10) y un juego adicional de oligonucleótidos que amplificaban los exones 51 a 58 (Tabla 7), localizados en la región 3' del gen, para determinar si estábamos frente a un problema técnico de amplificación ó efectivamente la región 5' no se estaba expresando. Los resultados de la amplificación de la región 3' se muestran en la figura 14, donde se observa la ausencia de amplificación del exón 1 y 2 y la presencia de amplificación para el exón 51 al 58 en el afectado de CDLX-3. Estos resultados nos indicaron que efectivamente existía un problema en la expresión de la región 5' del gen.

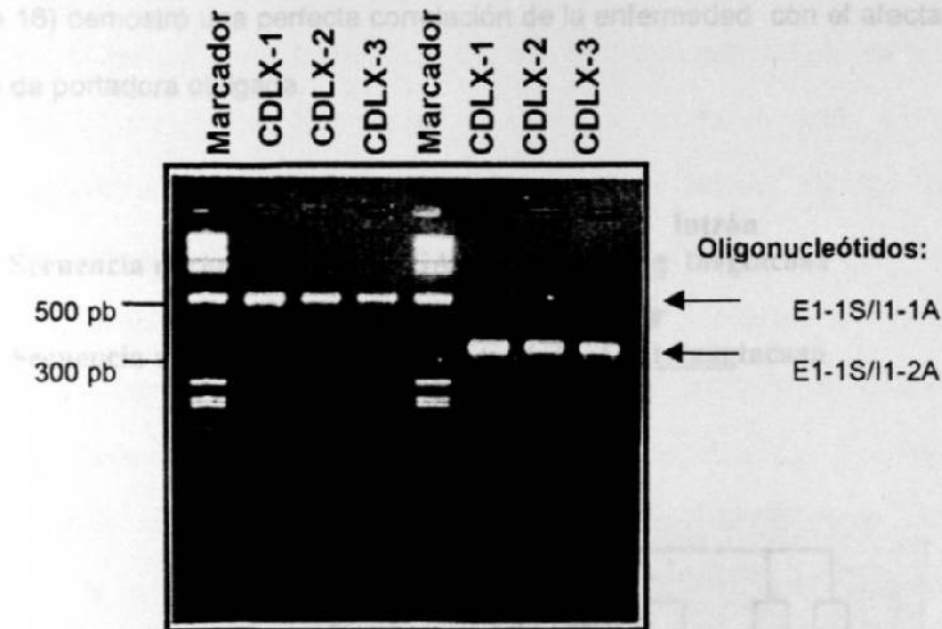
Las únicas regiones que no habían sido incluidas en el análisis del DNAg fueron la región de empalme del Exón1-Intrón 1 y el resto de los intrones 2 al 10. Y como las amplificaciones del DNAc eran negativas aún utilizando la combinación de oligonucleótidos para Exón 1- Exón 2, entonces la primera región candidata de alguna mutación, responsable de la ausencia de amplificación en el DNAc estaba dentro del intrón I. De manera que a partir de la secuencia reportada por Klamut y cols. (13) de la región promotora de músculo y parte del intrón 1, se diseñaron dos nuevos iniciadores (I1-1A y I1-2A) anidados dentro del intrón I y se realizaron las amplificaciones respectivas (Figura 6). La PCR de esta región fue exitosa y los resultados de estas nuevas amplificaciones utilizando la combinación de oligonucleótidos: I1-1S/I1-1A y I1-1S/I1-2A se muestran en la figura 15.

Estos productos amplificados fueron clonados y analizados por secuenciación y los resultados de la secuenciación de los productos de PCR del intrón 1 mostraron una mutación en el sitio de empalme de la región donadora del exón 1. Esta mutación origina un cambio de G por T que altera el sitio universal de empalme, lo que seguramente

Para esto se eligió un segmento de 110 pb que incluía parte del exón 1 y parte del intrón 1, que contenía la mutación (y el nuevo sitio de restricción) que nos permitía hacer el análisis de restricción de la manera que se muestra en la figura 15. En la amplificación se obtuvieron dos fragmentos de 110 pb que incluían el sitio de restricción. Los fragmentos de 50 y 60 pb, detectables mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Un análisis de segregación del sitio de restricción producido por el corte con *Mse*I en la familia CDLX-3 (Figura 16) demostró una perfecta correlación de la enfermedad con el afectado o con el estado de portadora.



B).

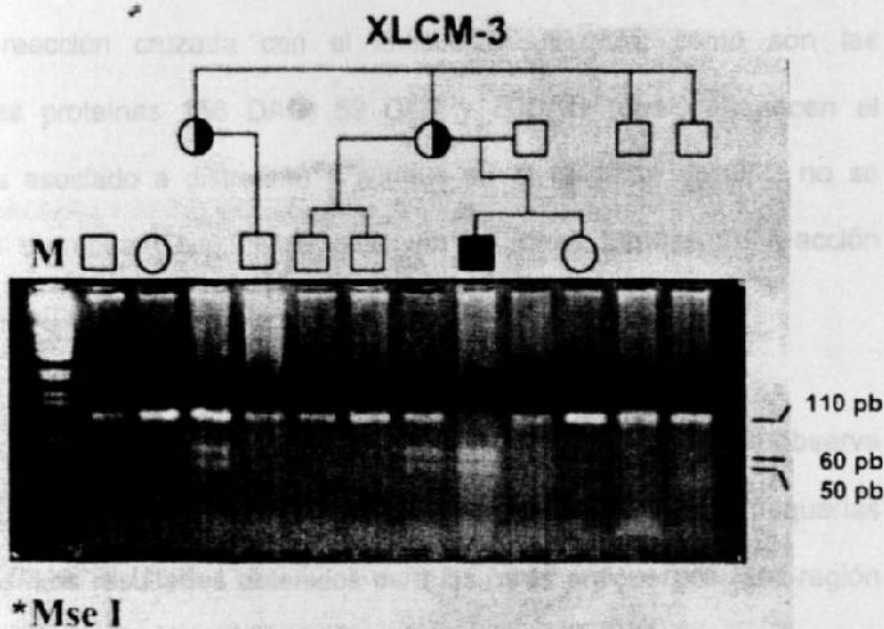


**Figura 15. Amplificación del Exón 1-Intrón I:** A). Se muestra la posición de oligonucleótidos que se utilizaron en esta amplificación. El oligonucleótido E1-2S se utilizó posteriormente en el análisis de segregación de la mutación B).:Se muestran los resultados de la amplificación de 2 fragmentos que incluyen la región 3' del exón 1 y la región 5' del intrón 1.

genera una proteína completamente diferente al incluir al intrón 2 como parte de la región codificante (Figura 16) Adicionalmente, en el análisis de la secuencia encontramos que el cambio de G por T generaba un nuevo sitio de restricción para la enzima *Mse*I, que no estaba presente en las muestras de los controles normales. De manera que nos sugería que esta mutación podía rastrearse mediante un simple análisis de restricción.

Para esto se eligió un segmento de 110 pb que incluía parte del exón 1 y parte del intrón 1, que contenía la mutación (y el nuevo sitio de restricción) que nos permitía hacer el análisis de restricción y obtener fragmentos de tamaño detectables mediante geles de agarosa (Figura 16). De esta manera, en la amplificación se obtenían productos de 110 pb que al someterse al análisis de restricción, generaban dos fragmentos de 50 y 60 pb, detectables mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Un análisis de segregación del sitio de restricción producido por el corte con *Mse* I en la familia CDLX-3. La figura 17 muestra los resultados del Western-blot cuando se utilizó un anticuerpo anti-actina. Este se realizó con la finalidad de determinar si la concentración de proteína de las muestras a analizar era homogénea, o si existía mucha variación entre una muestra y otra. Todas las muestras se procesaron al mismo tiempo, bajo las mismas condiciones con el anticuerpo anti-actina. Cuando se utilizó el anticuerpo anti Distrofina en la región N-terminal se observó que la muestra del afectado en CDLX-3 no presentaba niveles detectables de distrofina. En gel también se observan algunas otras

	Exón	Intrón
Secuencia normal:	AAGTAGAGGACTGTT	g taagtacaaa
		↓
Secuencia mutada:	AAGTAGAGGACTGTT	<u>t</u> taagtacaaa



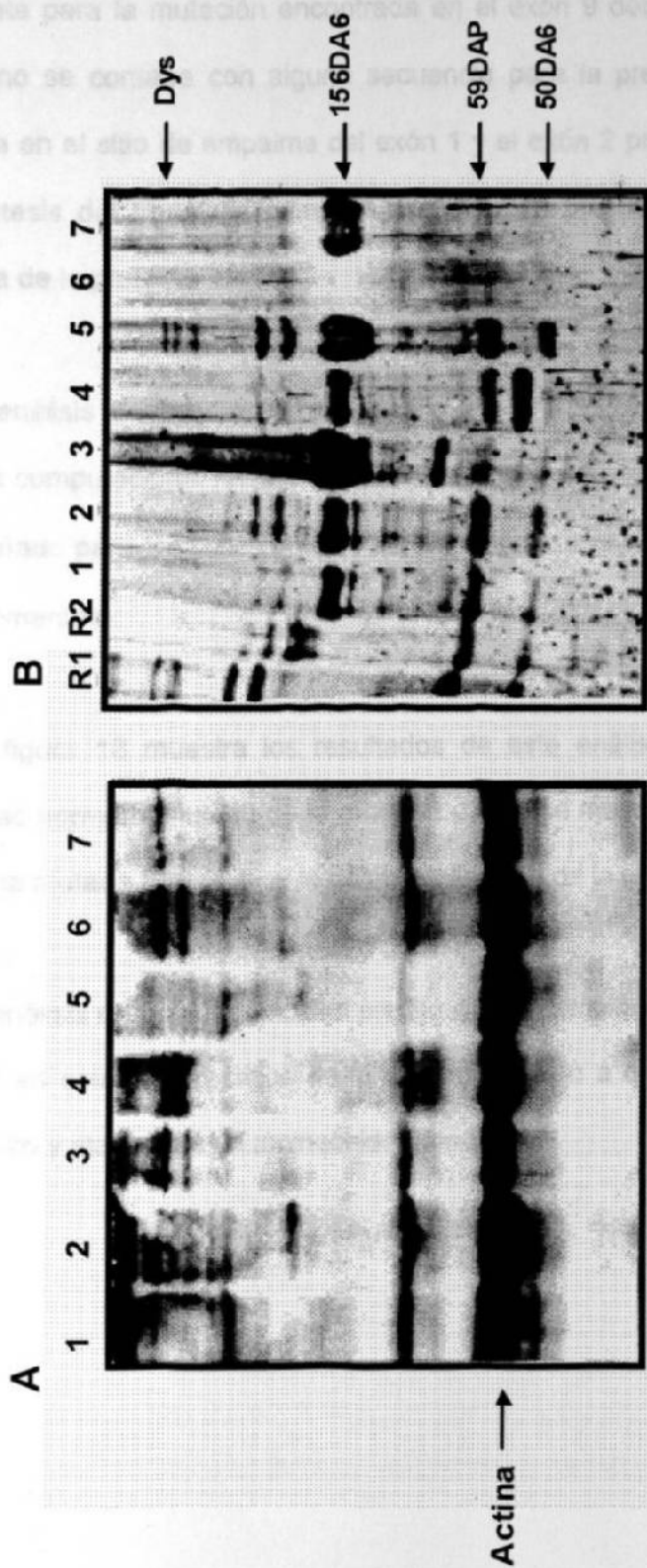
**Figura 16. Análisis de restricción del sitio de empalme de Exón1-Intrón 1 con la enzima *Mse* I.** Se muestra la secuencia normal y la mutante y la posición del cambio de G por T en el sitio de empalme del exón 1. Las cuatro letras subrayadas, en la secuencia mutante, muestran el sitio de corte con la enzima de restricción *Mse* I. En la figura se muestra el análisis de la segregación de la mutación en la familia CDLX-3



**5.5. Análisis de la proteína.** El análisis de la proteína por Western-blot para la familia CDLX-1 había sido previamente realizados por Towbin y cols. No se logró obtener biopsias del afectado de la familia CDLX-2, por lo que solo se analizaron muestras de tejido provenientes del afectado de las familias CDLX-3.

La figura 17 muestra los resultados del Western-blot cuando se utilizó un anticuerpo anti-actina. Este se realizó con la finalidad de determinar si la concentración de proteína de las muestras a analizar era homogénea, o si existía mucha variación entre una muestra y otra. Todas las muestras se procesaron al mismo tiempo, bajo las mismas condiciones. Los resultados mostraron homogeneidad en la intensidad de las bandas obtenidas con el anticuerpos Anti-actina. Cuando se utilizó el anticuerpo anti Distrofina contra la región N-terminal se observó que la muestra del afectado en CDLX-3 no presentó niveles detectables de distrofina. En gel también se observan algunas otras bandas que tienen reacción cruzada con el anticuerpo utilizado, como son las correspondientes a las proteínas 156 DAG, 59 DAP y 50DAG (que pertenecen al complejo de proteínas asociado a distrofina) y aunque en el paciente CDLX-3 no se observa la banda de distrofina (Dys), si se observan las otras bandas de reacción compartida con el anticuerpo.

El gel además contiene muestra de tres pacientes con DMD en las que se observa también ausencia de Distrofina y en dos de ellos pueden observarse proteínas pequeñas de tamaños anormales. Los resultados obtenidos para los otros anticuerpos (anti-región central y anti C-terminal) no se muestran porque no fueron concluyentes debido a que la transferencia del gel a la membrana fue de mala calidad. Este experimento no se pudo repetir por falta de material biológico.



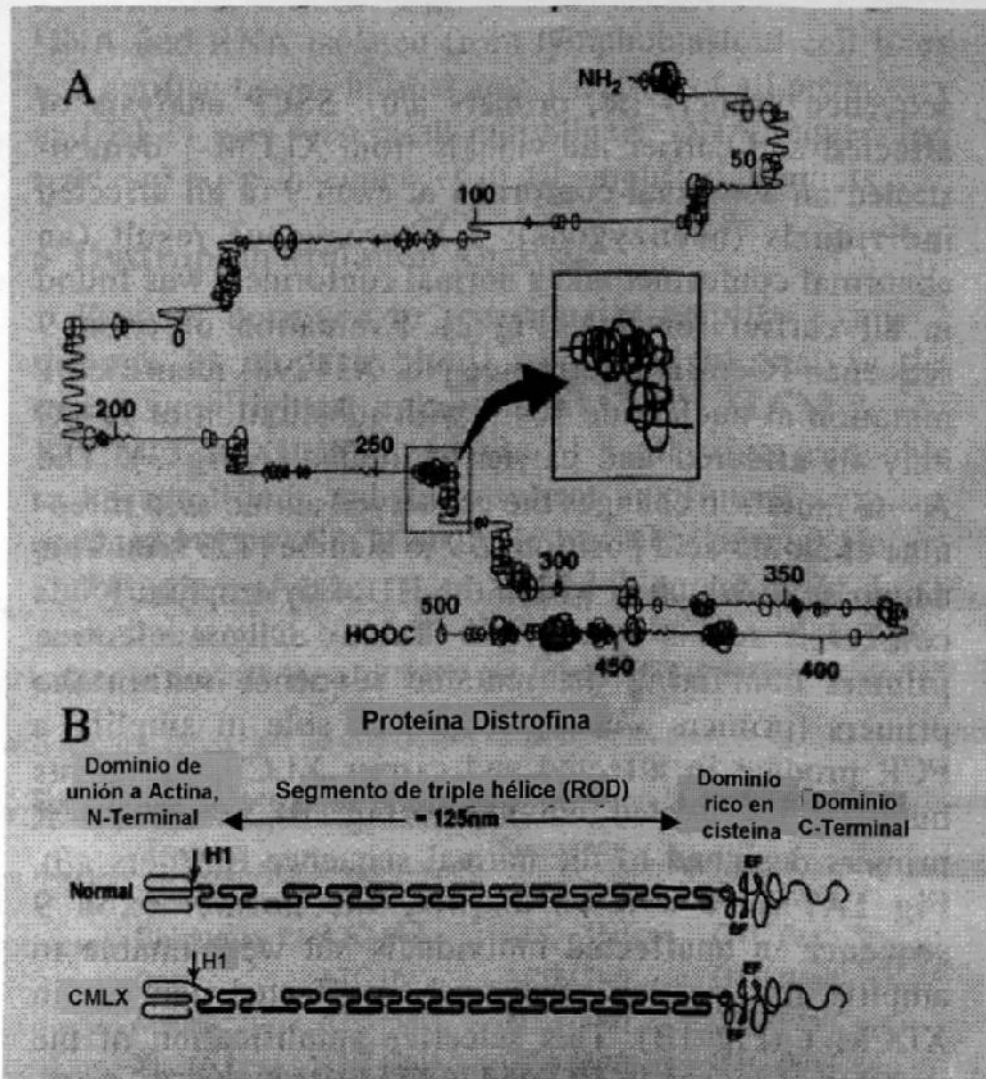
**Figura 17. Análisis por Western-blot de muestras del afectado de la familia CDLX-3 (IV-412).** Todas las muestras analizadas en estos geles se procesaron al mismo tiempo. A) Representa la homogenización de las muestras utilizando un anticuerpo anti-actina. B) Incluye las mismas muestras de A pero utilizando un anticuerpo anti-distrofina N-terminal. R1: biopsia de músculo de ratón, R2: biopsia de músculo de ratón distrófico (MDX-mouse), 1: biopsia de corazón de CDLX-3, 2, 3 y 4: biopsias de músculo de 3 pacientes con DMD, 5: biopsia de músculo esquelético normal, 6: biopsia de pulmón (ratón), 7: biopsia de hígado (ratón).

La predicción del cambio en la estructura de la proteína mutada se realizó únicamente para la mutación encontrada en el exón 9 debido que para la mutación en CDLX-3 no se contaba con alguna secuencia para la predicción. Ya que la mutación localizada en el sitio de empalme del exón 1 y el exón 2 predice la inclusión del intrón 1 en la síntesis del transcrito primario y no requiere de ningún análisis predictivo de la estructura de la proteína.

El análisis de predicción de cambio en la estructura, se llevó a cabo por el programa computacional MOSAIC, por el método de segmento orientado. Este programa está diseñado para localizar cambios de estructuras secundarias ( $\alpha$ -hélice y/o  $\beta$ -plegada) en los elementos.

La figura 18 muestra los resultados de este análisis donde se compararon las secuencias normal y mutada de la proteína donde se muestra un cambio en la estructura secundaria mutada que predice la desestabilización de la proteína.

El análisis de la hidrofobicidad predijo que el cambio T279A induce un cambio en la polaridad en esta región crítica de la proteína debido a que treonina es un aminoácido polar neutro y alanina es un aminoácido no-polar.



**Figura 18. Predicción gráfica de la estructura de la proteína de la distrofina mutante comparada con la distrofina normal. A,** distrofina normal y distrofina mutante (en el recuadro). Note el cambio estructural entre los aminoácidos 250 y 300 (flecha), de esta manera provocando un cambio en la estructura secundaria. **B,** la estructura de la distrofina idealizada. Un cambio en la estructura debido a la mutación T279A en H1 es mostrado. Se predice que este cambio desestabiliza funcionalmente a la proteína.

## CAPITULO VI

### DISCUSIÓN

El término “distrofinopatías” es comúnmente utilizado para describir diversos desórdenes alélicos que abarcan desde la DMD clásica hasta aquellos casos clínicamente silenciosos con niveles de CK-MM muy elevados. En este trabajo se hace la caracterización de una nueva variante fenotípica, la CDLX, resultante también de mutaciones en el gen de la distrofina, pero con la característica particular de que los pacientes con CDLX no manifiestan el daño muscular como sucede en los pacientes con DMD y DMB.

La hipótesis que postulamos es que las mutaciones en el gen de la distrofina en pacientes con CDLX son diferentes a las encontradas en pacientes con DMD o DMB. En este trabajo se realizó la caracterización molecular en tres familias con CDLX y encontramos mutaciones en el gen de distrofina en dos de ellas.

#### ***Mutaciones encontradas en el gen de la distrofina:***

En la familia CDLX-1, la mutación ocurrió en el exón 9 como un cambio de A → G en la posición 1043, localizado en el inicio de la región H1 de la distrofina. El cambio de A → G genera un cambio de aminoácido (Treonina → Alanina) en la

posición 279, que resulta en un cambio en la polaridad en esta parte de la proteína. La región H1 es una región altamente conservada de la distrofina y estructuralmente crítica para su función (22,23 y 36). El resultado final es la conversión de un segmento  $\alpha$ -hélice a uno  $\beta$ -plegada de la región H1 localizada entre el dominio N-terminal y el dominio en barra de la proteína. Esta mutación no fué encontrada en ninguna de las otras dos familias (CDLX-2 y CDLX-3) estudiadas.

Como se describió en la introducción, la distrofina es una proteína que consta de 4 dominios, de los cuáles, la región larga central esta formada por elementos repetidos que predicen una conformación de una triple-hélice. Koening y Kunkel (20 y 22) hicieron notar la importancia de la presencia de las cuatro regiones (H1 a H4) de bisagras flexibles, las cuáles en posiciones precisas, dentro de una molécula tan grande como es la distrofina, confieren la flexibilidad necesaria para su función de soporte de la red de proteínas del citoesqueleto. Es predecible que la flexibilidad de esta proteína sea primordialmente necesaria en el proceso de contracción y relajamiento de las fibras musculares. La mutación identificada en la familia CDLX-1 se encuentra en el exón 9, precisamente dentro de la primera de estas regiones de bisagra (H1).

Se ha reportado que la distrofina tiene diferentes funciones dentro del citoesqueleto de la membrana. 1) estabiliza la membrana, 2) ayuda en la fuerza de conducción y 3) tiene función especializada en la organización. La función y bioquímica de la membrana cardíaca y tubos T parece ser diferente de aquéllas del músculo esquelético. Se ha demostrado que mutaciones en la troponina I tienen efectos diferentes en estas fibras musculares, siendo más evidentes en el músculo cardíaco, y se ha especulado que esto es debido al trabajo continuo de las fibras

cardiacas resultante del bombeo constante. Adicionalmente, se ha demostrado que la región H1 de la distrofina tiene similitud significativa en secuencia a la de troponina I en la región que capacita a las proteínas la función de unión a calcio y se ha especulado que la distrofina une a la calmodulina en esta región.

Es muy probable que la alteración de la estructura de bisagra de la distrofina conduzca al desarrollo de la CD, en parte debido a la inhabilidad de la proteína mutada para realizar sus funciones estructurales y modular la interacción con otras proteínas y en parte debido a que las fibras del tejido cardiaco están sometidas a un trabajo constante a lo largo de toda la vida, por lo que el desgaste o la manifestación del daño se hace más evidente en este tejido. De cualquier manera, el daño de la distrofina también se encuentra en el tejido muscular esquelético y esto se evidencia por los niveles elevados de CK-MM en los pacientes con CDLX. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados hacen que el músculo esquelético compense el daño presente.

La otra mutación que se identificó en la familia CDLX-3 consistió en una mutación en el sitio de empalme entre el exón 1 y 2. Inicialmente, ninguna de las pruebas (mediante Southern-blot, PCR-Multiplex, el análisis de los promotores y su respectivo exón 1 y el análisis individual de exones) fueron diagnósticas para rastrear este cambio. El análisis del DNAc fue el que dio la pauta a seguir en la caracterización de la mutación.

Esta mutación origina un cambio de G por T alterando precisamente la posición +1 del sitio donador del empalme. Ya que la G en la posición +1 del sitio 5' del empalme es una posición altamente conservada en eucariotes, esta mutación genera

sin lugar a duda, un cambio que afecta la maduración normal del RNAm. La destrucción del sitio 5' de empalme que da origen a la remoción del intrón 2 que es muy largo (mayor de 200 Kb), predice la producción de un RNAm mutado seguramente inestable. Dado el tamaño del intrón 2, es probable que exista algún sitio criptico de empalme alterativo a lo largo de éste, lo cuál no excluye que un RNAm aberrante pueda originarse, pero que sea de tamaño no amplificable por PCR.

Las dos mutaciones identificadas aquí difieren de las mutaciones reportadas por Muntoni y cols. (21 y 58), por lo que se puede especular que el fenotipo CDLX resulta de diversas mutaciones en el gen de distrofina, pero éstas están localizadas en una región 5' crítica que afecta la expresión de la distrofina selectivamente en el músculo cardíaco.

Recientemente el grupo de Muntoni (58) reportó el análisis de la expresión de las variantes de la distrofina (de músculo, cerebro y células de Purkinje) en un paciente con CDLX e interesantemente encontró que en este paciente había compensación de la expresión de distrofina en músculo esquelético, conducida por el promotor de cerebro, mientras que en corazón no había expresión alternativa de las otras dos isoformas. Estos resultados apoyan la teoría de que los mecanismos que conllevan al fenotipo CDLX son diferentes a los que se dan en pacientes con DMD ó DMB, en los que se maneja la hipótesis del rompimiento de marco de lectura de la proteína (hipótesis del "frame-shift"), la cuál explica mas del 90% de los casos de DMD/DMB.

Nosotros especulamos que en los casos muy criticos, en donde la mutación en el gen de la distrofina confiere una expresión nula de la proteína, se activa el



mecanismo compensatorio de la expresión de distrofina dirigido por el promotor de cerebro. Pero por alguna razón, este mecanismo compensatorio no se lleva a cabo en el músculo cardíaco. En la mayoría de los casos de los pacientes con DMD y DMB (aproximadamente el 85%), la mutación en el gen de la distrofina genera proteínas de tamaños diferentes o con función alterada, generando una situación diferente a la que ocurre en CDLX, en la que la producción de distrofina está completamente abolida. Predecimos que en el caso de la mutación del exón 9, en una región crítica que confiere flexibilidad a la proteína, este cambio produce la desestabilización y degradación de ésta. Reiss y Rininsland (49) describieron un caso de empalme alternativo que elimina completamente el exón 9. Estos autores encuentran que aproximadamente el 50% de los transcritos estudiados en linfocitos de sangre periférica presentan este cambio, pero que no se observa en los transcritos producidos en músculo esquelético ni cardíaco. Adicionalmente, cuando se analiza la secuencia del gen después de la delección completa del exón 9, se observa que no existe rompimiento en el marco de lectura que altere la secuencia del RNAm, apoyando también el trabajo de Koenig y cols. (50), en el que se reportan mutaciones en el exón 9 que resultan en fenotipo DMB.

## CAPITULO VII

### CONCLUSIÓN

Podemos concluir que dependiendo del tipo de mutación presente en el gen de la distrofina, se puede inducir o no la expresión compensatoria de las isoformas de distrofina, capaces de prevenir la miopatía en los varones afectados. Sorpresivamente, de acuerdo al trabajo de Muntoni (58), la transcripción de estas isoformas está ausente en el corazón donde inclusive se ha detectado en condiciones normales y aunque en niveles muy bajos, la expresión de RNAm de la isoforma de cerebro. Estos hallazgos son consistentes con el daño cardíaco selectivo en estos pacientes. Estas observaciones señalan la existencia de un mecanismo selectivo de regulación de la iniciación de la transcripción de los diferentes promotores de la distrofina en estos dos tejidos.

Finalmente, para recapitular sobre los resultados obtenidos podemos decir que se estudiaron tres familias diagnosticadas clínicamente como CDLX. De éstas, pudo caracterizarse la mutación solamente en dos de ellas. Una consistió de una mutación en el exón 9 que altera la estructura secundaria de la proteína y la segunda mutación fue una alteración en el sitio de empalme del Exon 1 con el intrón que impide la transcripción correcta de la proteína. La mutación en la familia CDLX-2 no pudo ser determinada. Una vez que esta mutación y otras provenientes de más familias con CDLX sean caracterizadas, se conocerá más sobre los mecanismos de regulación de la expresión de distrofina en diferentes tejidos.

## CAPITULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

1. **Schalant RC, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, Sonnenblick EH.** *The Heart, Arteries and Veins.* McGraw-Hill, Inc. 8<sup>th</sup> Edition. Capítulos 89, 90 y 91. Pags: 1609-1646.
2. **Braunwald E.** Heart Disease. A textbook of cardiovascular Medicine. 1988. Volumen 2 Capitulo 15. W.B. Saunders Co. 5<sup>o</sup> Edicion.
3. **Towbin JA.** Molecular genetic aspects of cardiomyopathy. *Biochem Med Metab Biol.* 1993;49:285-320
4. **Bridgen W.** Uncommon myocardial disease: the noncoronary cardiomyopathies. *Lancet* 1957, 2:1176-1184.
5. **Dec GW, Fuster V.** Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J- Med.* 1994;331:1564-1575
6. **Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harlan WR.** Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop) *Am J Cardiol.* 1992;17:1458-1466
7. **Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar HD.** The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992;326:77-82.
8. **Goodwin JF.** Overview in classification of cardiomyopathies *Cardiovasc Clin* 1988. 19:3-7
9. **Towbin JA** Molecular genetic aspects of cardiomyopathy. *Biochem Med Metab Biol.* 1993;49:285-320
10. **Schowengert KO y Towbin JA.** Genetic basis of inherited cardiomyopathies. *Current Opinion in Cardiology.* 1999;10:312-321
11. **Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM.** The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 1987;51:919-928
12. **Roberts R.G.** Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Advances in Genetics.* 1995 (33):177-231
13. **Boyce FM, Beggs, AH, Feener C, Kunkel LM.** Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:1276-1280

14. Nudel U, Zuck D, Elinat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 1989;337:76-78.
15. Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN. Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Cell Biol*. 1990;10:193-205
16. Nishio H, Takeshima Y, Narita N, Yanagawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J Clin Invest*. 1994;94:1037-1042
17. Chelly J, Montarras D, Pinse C, Berwald-Netter Y, Kaplan, Jahn A. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. 1990- 14(187):691-98
18. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*. 1989;338:509-511.
19. Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad sci USA*. 1994;91:8307-8313
20. Koenig M, Hoffmen EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509-517.
21. Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V. Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X-linked dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 1995;56:151-157.
22. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53:219-228
23. Ahn AH and Kunkel L.M. The structural and functional diversity of dystrophin. Review. *Nature Genetics*. 1993;(3):283-288
24. Kahana E, Marsh PJ, Henry AJ, Way M, Gratzner WW. Conformation and phasing of dystrophin structural repeats. *J Mol Biol*. 1994;235:1271-1277
25. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 1989;338:259-262.
26. Matsumura K, Nonaka I, Tome FM, Arahata K, Collin H, Leturcq F, Recan D, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin. *Am J Hum Genet*. 1993;53:409-416

27. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin associated glycoproteins linking dystrophin to extracellular matrix. *Nature* 1992, 355:696-702
28. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophy and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 1989, 338:259-262.
29. Klietsch R, Ervasti JM, Arnold W, Campbell KP, Jorgensen AO. Dystrophin glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res*. 1993,72:349-360.
30. Vitiello L, Mostacciolo ML, Oliveira S, Schiavon F, Nicoletti L, Angelini C, Danielli GA. Screening for mutations in the muscle promoter region and for exonic deletions in a series of 115 DMD and BMD patients. *J Med Genet*. 1992;29:127-130.
31. Roberts RG, Darby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet*. 1991;49:296-310.
32. Gardner D, Medwin. Clinical features and classification of muscular dystrophies. *Brit Med Bull* 1980. 36:109-115
33. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987. 51:919-928
34. Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988. 53: 219-288
35. Beggs, AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Dugita H, Kunkel LM. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker Muscular Dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Gen* 1991. 49:54-67
36. Monaco AP, Malhotra SB, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW and Ray P. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and becker muscular dystrophy. *Science* 1988. 242(4879):755-9
37. Melacini P, Fanin M, Danielli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, Freda MP, Miorelli M, Mostacciolo ML, Fasoli G, Angelini C, Dalla Volta S. Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation* 1996. 94(12):3168-75
38. Berko BA, Swift M. X-Linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1987,316:1186-1191
39. Towbin JA, Hejmancik JF, Brink P, Beib B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*. 1993;87:1854-1865.

40. Hans-Peter Vosberg and William J. Makina. Cardiomyopathies. pp 843-877. Chapter 43. In Emery and Rimoin's. Principles and Practice of Medical Genetics. 3<sup>rd</sup> Ed., Vol. I, Edited by David L Rimoin, Michael Connor, Reed E. Pyeritz. New York, 1997.
41. Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M. Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat.* 1994;4:1-11
42. Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet.* 1995;57:22-23
43. Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu MG, Cianchetti C, Realdi G, Cao A, Melis MA. Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1993;329:921-925
44. Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A, Kagoshima M, Takeda S, Shoji S, Yanagisawa N. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with Becker muscular dystrophy presenting with dilated cardiomyopathy. *Muscles Nerve.* 1993;16:1161-1166.
45. Towbin JA, Ortiz Lopez R. X-linked dilated cardiomyopathy is not due to a muscular promoter deletion in dystrophin in three families. *N Engl J Med.* 1994;330:369-370
46. Miller G, Lisco H, Stitt D. Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1971;137:1459-1465
47. Anderson N, Steinitz M, Koskimies S, Klein S, Maketa O. Establishment of specific antibody producing human lines by antigen preselection and Epstein-Barr virus (EBV-transformation). *J Clin Lab Immunol* 1979 2(1):1-7
48. Chomczynski P. y Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987. 162:156-159
49. Church GM and Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984. 81:1991-95
50. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM; Kunkel LM. Deletion of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction . *Hum Genet.* 1990;86:45-48
51. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;23:11141-11156
52. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989;5:874-879

53. Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 1990;19:1154.
54. Salamov AA, Kolchanov NA, Lim HA, eds. Secondary structure prediction based on discriminant analysis,.. Inc.. *Computer Analysis of Genetic Macromolecules.* World Scientific Inc.; 1994;352-364
55. Solovyev VV.Salamov AA, Predicting  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -strand segments of globular proteins. *Comput Appl Biosci.* 1994;10:661-669
56. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol.* 1978;120:97-120
57. Roberts RG, Coffey A, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics.* 1993;16:536-538
58. Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V. A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J Clin Invest.* 1995;96:693-699
59. Holder E, Maeda M, Bies RD. Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet.* 1996;97:232-239
60. Kilimann MW, Pizzuti A, Grompe M, Caskey CT. Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Hum Genet.* 1992;89:253-258
61. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem.* 1990;265:4560-4568
62. Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 1991;66:1121-1131
63. Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Bamard EA, Bamard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet.* 1992;1:505-510