



Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Universidad Autònoma de Barcelona

ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA MOLECULAR EN DISFERLINOPATÍAS

Tesis doctoral

Lidia González-Quereda

Directora: Dra. Pia Gallano Petit

Servicio de Genética
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Barcelona, 2011

La Dra. Pia Gallano Petit, facultativo adjunto del Servicio de Genética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

CERTIFICA

Que Lidia González-Quereda ha realizado bajo su dirección la presente tesis doctoral: "**Estudio de la patología molecular en disferlinopatías**", y que es apta para ser defendida ante un tribunal para optar al título de Doctora en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Que este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Genética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Dra. Pia Gallano
Directora

A mis padres

A Miki

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en este camino y que han contribuido de una u otra manera a este trabajo.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a Pía, por supuesto por darme una oportunidad y por ser la directora de mi tesis, pero sobretodo, por toda la formación que me ha dado durante estos años, no sólo a nivel profesional sino también a nivel personal. Por transmitirme la pasión por la genética, por compartir tantos momentos, algunos muy buenos y otros menos, por transmitirme valores muy importantes, gracias Pía por **TODO**.

També voldria agrair-li a la "jefa", la Dra. Baiget, la oportunitat de formar part del Servei de Genètica i donar-li les gràcies també per inculcar i recordar sempre que el que el camí a seguir és l'esforç per aconseguir el que volem i que el que val és la feina ben feta.

Gracias al CIBERER, por la apuesta que ha hecho al estudio de las enfermedades raras y por la financiación que aporta, mediante la cual se ha podido llevar a cabo este trabajo.

No quisiera olvidarme de agradecer también a la Dra. Paz Briones, excelente investigadora y excelente persona, haberme dado la primera oportunidad de todas, así como también dar las gracias a todos los compañeros del IBC, Sonia, Esther, Aleix, Judit, Patricia y Cristina con quien pasé momentos buenísimos.

Gracias a todos los compañeros del Servicio de Genética de Sant Pau, a los que estuvieron y a los que aún están.

Como no, gracias a Meri Joe, ¿por qué? Por tantas cosas que podría escribir infinidad de páginas, pero resumiendo, por ser compañera de risas y lágrimas, por escucharme, por enseñarme, por calmarme, por animarme... por ser mucho más que una compañera de poyata, por ser más que una amiga, por ser mi "hermana mayor".

Gràcies també a en Jonàs, company de carrera i casualitats de la vida, també company "distròfic". Gràcies Jonàs per les teves converses sempre interessants, pels debats, pels consells, per les risas... i sobretot, per ser un bon amic! Gràcies també a l'altre company "distòfic", l'Edgard, que ens aporta aquella miqueta d'inocència de la qual tots n'hauríem de conservar un bocinet.

No voldria oblidar-me d'agrair també a l'Alba Freixas, "l'Albeta", que hem deixés en herència aquest gen que tants maldecaps i alegries m'ha donat i que m'ensenyés la base de tot aquest treball.

Gràcies a totes les companyes d'AME, a la Laura, a l'Eva, a la Rebeca, i a la inesgotable Sara, sempre tant disposada a escoltar i a fer un cop de mà als companys.

Gràcies a les noies de Farmacogenética, a la Juliana que en poc temps m'ha ensenyat un munt de coses i a la Laia, que tot i que ens hem "descobert" una mica tard, hem compartit molts bons moments, i uns quants patiments, com a bones culés!!! Gràcies Laia que m'has escoltat i ajudat moltíssim en aquesta última etapa de tesi.

Gràcies també a tota la resta de companys del servei, malgrat que ara estan una miqueta lluny no m'oblido de la Mónica, la nostra "Comander", l'Anabel, la Eli, la Mari Jesús, en Manel,

company de tertúlies cinèfiles, l'Arnal, la Montse Boltes i l'Eva Companys.

También quería agradecer a Adriana Lasa y Eduardo Tizzano, jefes y compañeros al mismo tiempo, por transmitirme todo su conocimiento y darme siempre ánimos.

Gràcies a la Lídia Sedano, la Dori, la Berta, la Laura de Jorge, companyes de qui guardo molt bon record.

Gracies també als companys de Neurología, en especial a la Noemí de Luna, a en Jordi Díaz i a l' Eduard Gallardo.

Gracias a todos mis amigos y gracias Alicia, Laura e Irene por esas fantásticas conversaciones en las que siempre arreglamos el mundo, gracias por escucharme siempre.

Por supuesto doy las gracias a mi familia. A mi hermana Laura. A mis padres que siempre están ahí, para darme el empujón cuando me entran las dudas o cuando me falta valor, que tienen la paciencia infinita para escucharme y la mayor sabiduría para darme siempre el mejor consejo. Que me han enseñado que nada es fácil, pero que todo se consigue con esfuerzo y constancia. Gracias de corazón porque sin vuestro esfuerzo y sobretodo sin vuestro ejemplo hoy no estaría escribiendo estas líneas.

Por último, gracias Miki! Por acompañarme en este camino y en todos los que vendran, por apoyarme siempre y por tu inagotable paciencia, especialmente en esta última fase de la tesis. Por suministrarme grandes dosis de autoestima y hacerme creer que soy "grande" a pesar de ser tan pequeña.

GRÀCIES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1- Fisiología del músculo	1
1.2- Contracción muscular	3
1.3- Distrofias musculares y miopatías distales: breve reseña histórica	6
1.4- Distrofias musculares de cinturas	9
1.4.1- Clasificación	11
1.4.2- Criterios diagnósticos	13
1.4.3- LGMD autosómicas dominantes.....	15
1.4.4- LGMD autosómicas recesivas	17
1.5- Las disferlinopatías.....	18
1.5.1- Características de las biopsias musculares	20
1.6- Reparación de la membrana muscular.....	21
1.7- El gen <i>DYSF</i>	26
1.8- Proteína.....	28
1.8.1- Alteraciones proteicas secundarias	29
2. MATERIAL Y MÉTODOS	1
2.1- Familias y pacientes estudiados.....	35
2.2- Análisis del RNA	35
2.2.1- Obtención de RNA y cDNA	36

ÍNDICE

2.2.2- Extracción de RNA.....	38
2.2.3- Retrotranscripción a cDNA	39
2.2.4- Amplificación de <i>DYSF</i>	40
2.2.5- Purificación del producto amplificado.....	43
2.3- Amplificación de <i>MG53</i>	46
2.4- Técnica de <i>MLPA</i>	50
3. OBJETIVOS	55
4. RESULTADOS	59
4.1- Mutaciones identificadas en <i>DYSF</i> en pacientes afectos de disferlinopatía de población española	61
4.2- Estudio del gen <i>DYSF</i> en pacientes afectos de disferlinopatía de procedencia europea.....	77
4.3 - Un nuevo fenotipo de disferlinopatía con inicio congénito.	85
5. DISCUSIÓN	95
5.1- Espectro mutacional del gen <i>DYSF</i>	97
5.1.1- Relación genotipo-fenotipo	101
5.2- Ventaja del análisis de mRNA vs DNA.....	102
5.3- Características específicas en población española..	108
5.4- Búsqueda de grandes deleciones o duplicaciones ..	110
5.5- Estudio de genes modificadores: <i>MG53</i>	111

5.6- Descripción de un nuevo fenotipo de disferlinopatía de inicio congénito	111
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFIA	133

1. INTRODUCCIÓN

1.- Introducción

La palabra distrofia procede de dos palabras griegas: *dys*, que significa anormal o defectuoso y *trophe*, que significa alimento, por lo que el término distrofia muscular implica de alguna manera un defecto en la alimentación del músculo, en el sentido de impedir su correcto desarrollo.

Las distrofias musculares progresivas constituyen un grupo de enfermedades de diversa etiología, clínicamente heterogéneo y cuya naturaleza hereditaria se conoce desde hace tiempo. Se trata de enfermedades caracterizadas por una degeneración progresiva de las fibras musculares, con una fórmula histológica de necrosis-regeneración característica. El defecto primario se localiza en el músculo, causando regeneración defectuosa del miocito o incluso la muerte prematura del mismo.

1.1- Fisiología del músculo

Las fibras musculares están constituidas por numerosas subunidades ordenadas paralelamente denominadas miofibrillas, que consisten en una serie de unidades repetidas longitudinalmente conocidas como sarcómeros (Figura 1).

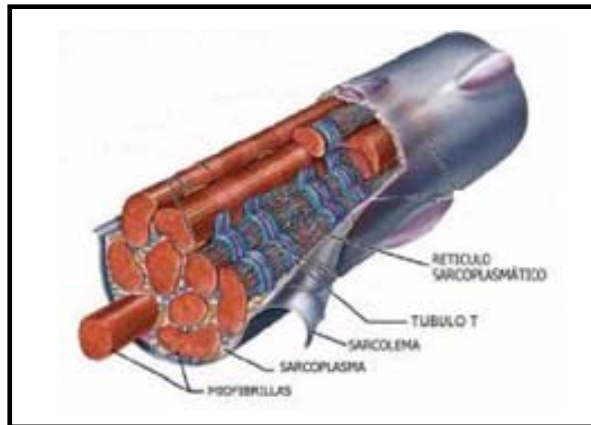


Figura 1. Fibra muscular.

(<http://magisnef.files.wordpress.com/2007/04/untitled-1-copy.jpg>)

El sarcómero es la unidad funcional del músculo estriado, donde se produce la interacción entre los filamentos intercalados de actina (filamentos delgados) y de miosina (filamentos gruesos). El sarcómero es el responsable de la función contráctil por lo que constituye un elemento clave en el proceso de la contracción muscular. La base de este proceso reside en el acortamiento y alargamiento de los filamentos así como en el desplazamiento entre ellos [Meryon, 1852].

En el sarcómero pueden observarse diferentes bandas:

- los filamentos gruesos, que conforman las bandas A,
- la zona H, que es la banda más clara dentro de la banda A,
- las bandas I, que se localizan entre dos bandas A y,
- las líneas Z, que se encuentran entre las bandas I (Figura 2).

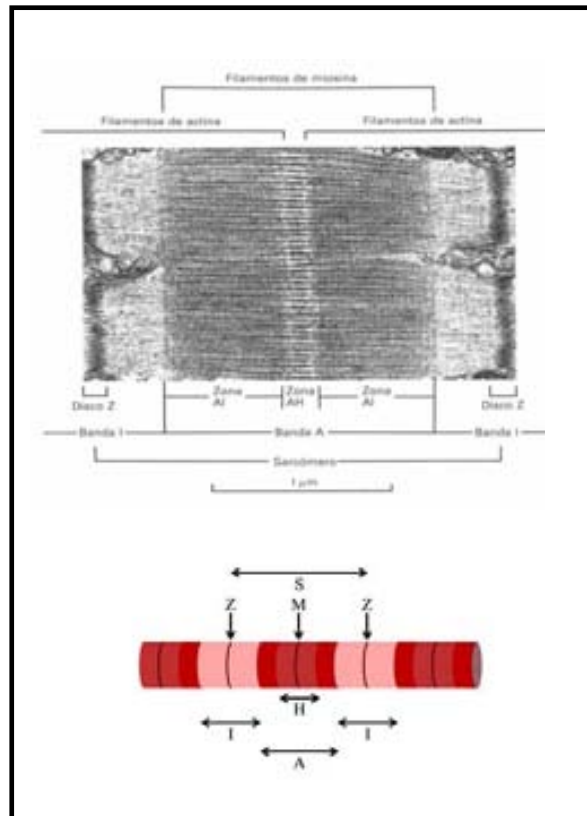


Figura 2. Bandas sarcoméricas.

1.2- Contracción muscular

La contracción muscular es el proceso fisiológico en el que los músculos desarrollan tensión cuando se exponen a un estímulo. El estímulo origina un potencial de acción que despolariza la membrana, lo que provoca la liberación de iones calcio (Ca^{2+}) desde el retículo sarcoplasmático, donde están acumulados, hacia el sarcoplasma. Así mismo, el calcio juega un papel esencial en la interacción entre actina y miosina [Meryon, 1852] (Figura 3).

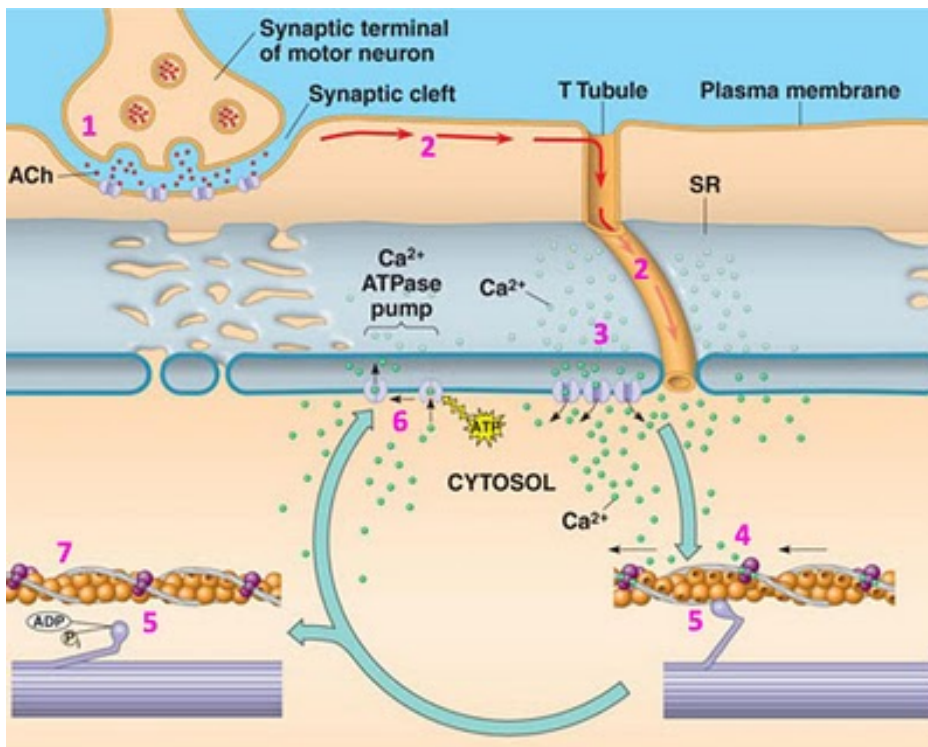
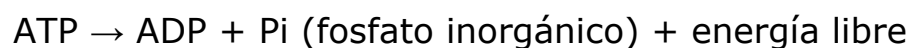


Figura 3. Esquema del proceso de contracción muscular.

La fuente inmediata de energía para el proceso contráctil es el ATP (adenina trifosfato) mediante la siguiente reacción:



El ATP se regenera rápidamente a través de la refosforilación del ADP (adenina difosfato), para lo cual es necesaria la acción de un fosfato de alta energía (fosfato de creatina: CP) y de la enzima creatin kinasa (CK):



Por consiguiente, la valoración de la actividad de la enzima CK es útil como marcador en enfermedades musculares.

Desde un punto de vista fisiológico, se pueden establecer dos subtipos de fibras en el músculo esquelético en función de su especialización:

- fibras tónicas
- fibras fásicas

La contracción lenta y continua depende de las fibras tónicas, a las cuales no les es necesario producir potenciales de acción para propagar la excitación, ya que ésta se originará mediante repetidas sinapsis a lo largo de la fibra. Las fibras fásicas, en cambio, dan lugar a una contracción espasmódica en movimientos rápidos. Podemos subdividir las fibras fásicas en dos subtipos diferentes: fásicas lentas y fásicas rápidas (glucolíticas y oxidativas).

Las fibras fásicas de contracción lenta son resistentes a la fatiga e intervienen en movimientos lentos e iterativos. Se fatigan muy lentamente, probablemente debido al gran número de mitocondrias que contienen y a una utilización lenta del ATP. Las fibras fásicas rápidas glucolíticas se contraen rápidamente, se fatigan enseguida y contienen pocas mitocondrias. Por el contrario, las fibras fásicas rápidas oxidativas presentan un número elevado de mitocondrias capaces de producir ATP rápidamente por fosforilación oxidativa fatigándose lentamente [Meryon, 1852].

1.3- Distrofias musculares y miopatías distales: breve reseña histórica

Antes de la era de la genética molecular, los intentos de clasificación de las miopatías fueron múltiples y variados.

Históricamente, los desórdenes del músculo se diferenciaban en dos categorías: distrofias musculares y miopatías. La distrofia se definía como una enfermedad originada por la interrupción de la integridad muscular, es decir, por un defecto en la membrana de la fibra muscular: el sarcolema.

La primera descripción clínica y patológica de lo que se denominó "distrofia muscular progresiva" la realizó Edward Meryon en 1851 [Meryon, 1852]. Se trataba de una enfermedad muscular que comenzaba en los primeros años de la vida e invalidaba progresivamente a los individuos, todos ellos varones, que la padecían. En 1861 Duchenne describió casos similares y denominó a la entidad "paraplejía hipertrófica de la infancia", estableciendo en 1873 una serie de criterios diagnósticos [Duchenne de Boulogne, 1973]. Unos años después, en 1889, Erb revisó 89 casos de distrofia muscular progresiva observando que algunos de ellos cumplían los criterios establecidos por Duchenne. Aquellos casos que no cumplían dichos criterios resultaban ser individuos jóvenes, con debilidad de inicio precoz que afectaba a la cintura escapular y, con una evolución más benigna que en los casos descritos por Duchenne. A esta nueva entidad se le denominó distrofia juvenil escápulohumeral [Erb, 1891].

La primera referencia a una miopatía distal fue realizada por Gowers en 1902 [Gowers, 1902] con la descripción de varios casos aislados y clínicamente heterogéneos. Habría que esperar

hasta 1951 para que Welander describiera 72 familias suecas con 249 casos a los que denominó "*miopathia distalis tarda hereditaria*" [Welander, 1951]. Esta serie se considera la primera descripción de una miopatía distal claramente definida tanto desde el punto de vista clínico como morfológico. La miopatía descrita por Welander se caracterizaba por presentar un patrón de herencia autosómico dominante (AD), un inicio tardío y debilidad y atrofia distales en miembros superiores (MMSS), con una progresión lenta hacia la musculatura distal de miembros inferiores (MMII).

En 1967, Miyoshi y colaboradores describieron cuatro casos de miopatía distal, pertenecientes a dos familias, con un cuadro de debilidad en miembros inferiores acompañado de elevados niveles de creatin kinasa sérica [Miyoshi K *et al*, 1967]. En 1974, el mismo grupo publicó una descripción clínica y anatomopatológica de siete familias con idéntico cuadro clínico [Miyoshi K *et al*, 1974] lo que reveló que se trataba de una enfermedad muscular hereditaria de naturaleza distrófica, con un patrón de herencia autosómico recesivo (AR), elevado aumento de CK y que afectaba principalmente a grupos musculares flexores de la pierna, por lo que se denominó "distrofia muscular distal autosómica recesiva" (ARDMD) [Miyoshi K, *et al*, 1977]. A partir de estas primeras descripciones se reconocieron muchos otros casos de ARMD casi todos ellos en población japonesa [Fukuhara N, *et al*, 1975, Santa S, *et al*, 1975, Takata Y, *et al*, 1984] excepto alguno aislado descrito en población caucásica [Kuhn and Schroder, 1981, Scoppetta *et al*, 1984]. A partir de entonces se han ido

INTRODUCCIÓN

describiendo diferentes miopatías distales. La clasificación actual figura en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación de las miopatías distales.

Enfermedad	Modo de Herencia	OMIM	Cromosoma	Gen	Proteína
Miopatía distal recesiva de Miyoshi	AR	MMD1 254130	2p12-14	DYSF 603009	Disferlina
Distrofia muscular tibial (Udd)	AD	TMD 600334	2q31	TTN 188840	Titina
Miopatía distal con vacuolas ribeteadas	AR	NM 605820	9p12-p11	GNE 603824	N-acetilmanos amina kinasa
Miopatía distal de Laing	AD	MPD1 160500	14q11.2	MYH7 160760	Miosina, cadena pesada 7
Miopatía distal faríngea y de cuerdas vocales	AD	MPD2 (VCPDM) 606070	5q31	MATR3	Matrin 3
Miopatía distal de inicio adulto	AD	MPD3 610099	8p22-q11	?	?
Miopatía distal de Welander	AD	WDM 604454	2p13	?	?
Miopatía distal con pie cavo y arreflexia	AD	601846	19.p13	?	?
Miopatía distal con defectos en miotilina	AD		5q31	MYOT (=TTID) 604103	Miotilina
Miopatía distal con defectos en nebulina	AR		2q22	NEB 161650	Nebulina
Miopatía distal con defectos en caveolina	AD		3p25	CAV3 601253	Caveolina-3
Miopatía distal de inicio tarde (Markesbery-Griggs)	AD		10q22	LBD3 (=ZASP) 605906	Dominio de unión-3 a LIM

Miopatía distal relacionada con dinamina2	AD	CNM 160150	19.p13.2	<i>DNM2</i> 602378	Dinamina 2
Miopatía distal no-disferlina	AR	MMD3 613319	11p14.3	<i>ANO5</i> 608662	Anoctamina 5

1.4- Distrofias musculares de cinturas

Las distrofias musculares de cinturas (*LGMD*, del inglés *limb girdle muscular dystrophy*) son un grupo heterogéneo de enfermedades neurológicas raras, que se incluyen dentro de las llamadas distrofias musculares hereditarias. Son miopatías primarias de base genética, con curso progresivo y que conllevan generalmente graves limitaciones. Se estima que su prevalencia es de aproximadamente 0,2 casos por 10.000 habitantes. Según la definición de la Unión Europea, las Enfermedades Raras, incluidas las de origen genético, son aquellas enfermedades con peligro de muerte o de invalidez crónica, que tienen una prevalencia baja, menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes en la población. Son un conjunto de enfermedades que aparecen con baja frecuencia y presentan muchas dificultades diagnósticas y de seguimiento. Existen pocos datos epidemiológicos y plantean dificultades en la investigación debido al bajo número de casos. Carecen en su mayoría de tratamientos efectivos. Dado que se estima que el 80% de las enfermedades raras tiene un origen genético, la investigación genética es la clave en el tratamiento de éstas.

Las distrofias musculares de cinturas se podrían definir como un grupo de entidades caracterizadas por un patrón distrófico

INTRODUCCIÓN

progresivo con afectación de la musculatura proximal, principalmente a nivel de las cinturas escapular y pélvica. Su definición como grupo ha experimentado diversos cambios y ha generado cierta controversia.

Las LGMD tienen en común una predilección por la afectación de la musculatura proximal tanto en la cintura escapular como pélvica, pudiendo estar diferencialmente afectadas, especialmente en estadios tempranos. El déficit proximal que las caracteriza a nivel escapular o a nivel pélvico, simétrico y selectivo, se asocia muy a menudo a retracciones aquileanas que aparecen a la edad de 8-10 años. La distribución motora, el respeto de la musculatura facial y la selectividad muy precisa de la afectación muscular son características de este grupo de distrofias.

La edad de aparición de los primeros síntomas es muy variable, desde la infancia hasta la edad adulta. Típicamente se inician con una debilidad muscular en extremidades inferiores, que originan problemas para subir escaleras o levantarse de la silla. Posteriormente se verán afectados los músculos de la cintura escapular y las extremidades superiores.

Las LGMD se presentan con niveles elevados de la enzima Creatin Kinasa. Otros signos y síntomas, no siempre presentes, serían cardiomiopatía, alteraciones de la conducción cardiaca, debilidad muscular orofaríngea e hipertrofia de gemelos. Cabe mencionar que la progresión y la distribución de la debilidad muscular son también heterogéneas. Por lo general presentan el inicio en la infancia o la adolescencia. Las descripciones clínicas de muchas de las familias con LGMD autosómica recesiva son muy similares. Lo que distingue a una forma de la otra es el gen responsable,

teniendo además en cuenta las diferencias étnicas, la afectación de otras partes del cuerpo y la gravedad de la progresión.

Muchas de las proteínas implicadas en estas enfermedades están ancladas en la fibra muscular, desde el sarcolema hasta la envoltura nuclear con funciones que van desde estructurales a enzimáticas. Así, el diagnóstico debe establecerse combinando el análisis a nivel clínico, bioquímico, anatomopatológico, inmunohistoquímico y genético. Recientemente la incorporación de las técnicas de neuroimagen ha aportado valiosa información para el diagnóstico diferencial de las distrofias de cinturas.

1.4.1- Clasificación

Las primeras clasificaciones se basaron en características clínicas y patológicas que posteriormente se completaron con los criterios de herencia mendeliana, para lo cual fue de gran utilidad la descripción de familias con varios individuos afectados. No obstante, esta tarea no fue fácil debido a la gran variabilidad, tanto fenotípica como genotípica, que presentaban estas entidades.

En 1953 Stevenson propuso el término de "distrofia muscular de cinturas" para diferenciar aquellos pacientes con una distrofia muscular que no reunían las características diagnósticas de las distrofias musculares ligadas al cromosoma X (DMD/DMB) y, de la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSH), que hasta la fecha eran las entidades mejor descritas [Stevenson, 1953] [Walton JN, 1991, Walton JN, 1954]. En 1954 se reafirmó el concepto de *LGMD* en una clasificación de distrofias musculares propuesta por Walton [Walton and Nattrass, 1954] que incluía 3 categorías: DMD, FSH y LGMD. Desde entonces se ha avanzado mucho en el

INTRODUCCIÓN

conocimiento de este subtipo de distrofias musculares y se han intentado establecer unos criterios característicos que las definan, teniendo siempre en cuenta: 1) la variabilidad en el patrón de herencia, 2) la localización inicial de la afectación en las cinturas escapular y/o pélvica y, 3) la variabilidad en la progresión y severidad de la enfermedad.

Otras entidades clínicas vinieron a continuación a enriquecer esta clasificación, como la miopatía de Emery-Dreifuss en 1966 (Distrofia muscular recesiva ligada al cromosoma X con afectación cardíaca y retracción de los codos) y posteriormente la miopatía autosómica recesiva severa de la infancia, también llamada SCARMMD (*Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*) descrita inicialmente en Túnez en 1980 [Ben Hamida *et al*, 1983]. No se conocía etiología alguna para estas entidades, así como tampoco se sospechaba de la implicación del defecto de alguna proteína, siendo el único estigma biológico la elevación de la creatin kinasa sérica, la cual testimoniaba del proceso de necrosis muscular. Para estas enfermedades no existía hipótesis fisiopatológica alguna y tan sólo parecía posible establecer la transmisión genética. El descubrimiento de los genes responsables y de su patología conmovió esta clasificación.

La historia del descubrimiento de los genes responsables de estas patologías es de sumo interés, ya que ilustra el encadenamiento de los progresos que se desprenden de lo que consideraríamos el primer eslabón: la distrofina. Muestra también la convergencia de la bioquímica, la genética y la clínica hacia una medicina molecular.

Paralelamente a los análisis bioquímicos, las numerosas familias censadas en el mundo con diversas formas de miopatías autosómicas, fueron objeto de un análisis de ligamiento para evidenciar su localización cromosómica. En 1995 se planteó una nomenclatura basada exclusivamente en la genética y teniendo en cuenta los diferentes *loci* identificados [Bushby and Beckmann, 1995]. Esta nomenclatura reagrupa desde entonces todas las entidades clínicas bajo las siglas de LGMD, sin tener en cuenta los matices fenotípicos ni las clasificaciones nosológicas clásicas [Urtizberea, 1996].

La nueva nomenclatura genética presentada en las tablas 2 y 3 considera exclusivamente el carácter dominante (LGMD1) o recesivo (LGMD2), y los diferentes *loci* y genes identificados. Esta nomenclatura puramente genética ha sido en ocasiones fuente de confusión para los clínicos. Efectivamente, una enfermedad aparentemente monomorfa puede deberse a la afectación alternativa de varios genes diferentes (heterogeneidad genética). Así mismo, mutaciones diferentes en un mismo gen pueden originar patologías fenotípicamente distintas (heterogeneidad clínica).

1.4.2- Criterios diagnósticos

Los valores de CK son elevados en las formas recesivas y en algunas formas dominantes (al menos cuando la enfermedad está en una fase activa) y pueden ser utilizados como test pre-sintomático en las familias en las que se documenta una elevación precoz de los mismos. En algunas familias se observa un aumento moderado de CK en los sujetos asintomáticos con

INTRODUCCIÓN

biopsia muscular sin patrón distrófico. Algunas formas dominantes, pueden presentar CK normal y no suelen ser superiores a seis veces el valor normal, mientras que en las formas recesivas pueden llegar a 200 veces por encima del valor normal.

Exámenes como el electromiograma (EMG) y la biopsia muscular muestran en general signos inespecíficos de miopatía o de distrofia. Así mismo, el escáner muscular pone de manifiesto una hipodensidad en los músculos afectados, convirtiéndose de este modo en una herramienta diagnóstica diferencial capaz de definir el perfil de afectación/preservación del músculo.

El diagnóstico de LGMD queda excluido al encontrar una reducción en el marcaje de distrofina en la biopsia muscular (siempre que existan los controles adecuados de integridad de la membrana) y también cuando se encuentran anomalías en el gen *DMD*. La identificación de neuropatía inflamatoria, metabólica o mitocondrial en la biopsia muscular también descarta el diagnóstico de LGMD.

El análisis anatomopatológico de la biopsia muscular supone una herramienta muy útil para llegar a un diagnóstico diferencial entre los diversos subtipos de LGMD. Todas las LGMD muestran características distróficas: un patrón de variación en el tamaño de las fibras, un número incrementado de núcleos centralizados y una fibrosis endomisial. En ocasiones se observan infiltrados inflamatorios que pueden llegar a ser prominentes en disferlinopatías. La tinción inmunohistoquímica con un panel de anticuerpos puede dirigir el diagnóstico eficazmente al evidenciar la reducción o ausencia de la proteína implicada en la patología.

Así mismo, el análisis mediante la técnica de Western Blot permite una cuantificación relativa de las proteínas, por lo que elucida anomalías proteicas no sólo primarias sino también secundarias.

Finalmente, un análisis molecular directo provee la confirmación del diagnóstico con la demostración de mutación(es) en el gen implicado. Además permite establecer el estado de portador o de individuo pre-sintomático entre los miembros de la familia.

Así pues, la combinación de los estudios anatomopatológicos del músculo (especialmente los inmunohistoquímicos), los estudios genéticos y los resultados de las técnicas de neuroimagen es la mejor vía para llegar a un diagnóstico preciso. No obstante, no todos los pacientes LGMD entran en una categoría genéticamente determinada, y es posible que queden por descubrir otros genes responsables del fenotipo LGMD.

1.4.3- LGMD autosómicas dominantes

Muchas de las LGMD autosómicas dominantes se han descrito en grandes pedigríes únicos y se consideran bastante raras. Además, dentro de las causas genéticas de las LGMD autosómicas dominantes, la debilidad puramente de cinturas es un fenotipo más bien infrecuente mientras que predominan las presentaciones con miopatía distal o miopatía miofibrilar. En algunos de los subtipos de LGMD autosómicas dominantes la historia familiar puede ser particularmente informativa para su diagnóstico.

Hasta el momento se han descrito 7 formas de LGMD dominante (LGMD1) en las que se ha identificado su localización

INTRODUCCIÓN

cromosómica: LGMD1A en 5q31 (Speer y col., 1992), LGMD1B en 1q11-q21 (van der Kooi y col., 1997), LGMD1C en 3p25 (McNally y col., 1998^a; Minetti y col., 1998), LGMD1D en 7q (Messina y col., 1997), LGMD1E en 6q23 (Speer y col., 1999), LGMD1F en 7q32 (Palenzuela y col., 2003) y LGMD1G en 4p21 (Starling y col., 2005) (Ver tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de Distrofias Musculares de Cinturas autosómicas dominantes

LGMD	OMIM	Locus	Gen	Proteína	Referencia
LGMD1A	LGMD1A 159000	5q31	<i>MYOT</i> (= <i>TTID</i>) 609200	Miotilina	Speer et al. (1999)
LGMD1B	LGMD1B 159001	1q11-q21	<i>LMNA</i> 150330	Lamina A/C	Van der Kooi et al. (1997)
LGMD1C	LGMD1C 607780	3p25	<i>CAV3</i> 601253	Caveolina- 3	Minetti et al. (1998)
LGMD1D	LGMD1D 603511	7q	?	?	Speer et al. (1999)
LGMD1E	LGMD1E 602067	6q23	?	?	Messina et al. (1997)
LGMD1F	LGMD1F 608423	7q32	?	?	Palenzuela et al. (2003)
LGMD1G	LGMD1G 609115	4p21	?	?	Starling et al. (2005)

1.4.4- LGMD autosómicas recesivas

Son mucho más frecuentes que las formas dominantes, las cuales representarían aproximadamente el 10% de todas las LGMD. Hasta la fecha se han descrito 15 formas de LGMD autosómicas recesivas. Existen diferencias entre las incidencias de LGMD que presentan diferentes poblaciones. Varios estudios en todo el mundo han estimado la frecuencia de las distrofias de cinturas basándose en datos inmunohistoquímicos y genéticos. En todos los estudios, la LGMD2A es la más común, representando el 26.8% de todas las LGMDs y la LGMD2B, también relativamente común, representan el 19%. La LGMD2I es común sólo en ciertas partes del norte de Europa (Dinamarca y Reino Unido), pero las frecuencias en todo el mundo, fuera de esta área, representan tan sólo el 3-8% de las LGMDs. (Ver tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de Distrofias Musculares de cinturas autosómicas recesivas

LGMD	OMIM	Locus	Gen	Proteína	Referencia
LGMD2A	LGMD2A 253600	15q15.1	CAPN3 114240	Calpaina-3	Beckmann et al. (1991)
LGMD2B	LGMD2B 253601	2p13	DYSF 603009	disferlina	Bashir et al. (1994)
LGMD2C	LGMD2C 253700	13q12	SGCG 608896	γ-sarcoglicano	Ben Othmane et al. (1992)
LGMD2D	LGMD2D 608099	17q12- q21.33	SGCA 600119	α-sarcoglicano	Roberds et al. (1994)
LGMD2E	LGMD2E 604286	4q12	SGCB 600900	β-sarcoglicano	Lim et al. (1995)
LGMD2F	LGMD2F 601287	5q33	SGCD 601287	δ-sarcoglicano	Passos-Bueno et al. (1195)

INTRODUCCIÓN

LGMD2G	LGMD2G 601954	17q12	<i>TCAP</i> 604488	Teletonina	Moreira et al. (1997)
LGMD2H	LGMD2H 254110	9q31- q34	<i>TRIM32</i> 602290	Ubiquitin ligasa	Weiler et al. (1998)
LGMD2I	LGMD2I 607155	19q13.3	<i>FKRP</i> 606596	Proteína relacionada con Fukutina	Driss et al. (2000)
LGMD2J	LGMD2J 608807	2q31	<i>TTN</i> 188840	titina	Hackman et al. (2003)
LGMD2K	LGMD2K 609308	9q34	<i>POMT1</i> 607423	Proteína-O- manosil transferasa 1	Balci et al. (2005)
LGMD2L	LGMD2L 611307	11p14.3	<i>ANO5</i> 608662	Anoctamina 5	Jarry et al. (2007)
LGMD2M	LGMD2M 611588	9q31	<i>FKTN</i> 607440	Fukutina	Murakami et al. (2006)
LGMD2N	LGMD2N	14q24	<i>POMT2</i> 607439	Proteína-O- manosil transferasa 2	Biancheri et al. (2007)
LGMD2O	LGMD2O	1p34	<i>POMGNT1</i> 606822	Proteína-O- ligada a manosa beta 1,2-N- acetilglucosa- aminiltransfe- rasa 1	Godfrey et al. (2007)

1.5- Las disferlinopatías

Mutaciones en el gen de la disferlina, *DYSF*, dan lugar a una amplia gama de fenotipos todos ellos con un patrón de herencia autosómico recesivo. Se ha descrito incluso la aparición de diferentes fenotipos dentro de una misma familia y en presencia de una misma mutación [Illarioshkin *et al*, 2000, Ueyama *et al*, 2001, Weiler *et al*, 1999], lo que hace suponer la existencia de genes o proteínas modificadores que puedan influir en la manifestación de un fenotipo u otro.

Entre los diversos fenotipos descritos hasta la fecha, causados por defectos en la disferlina, destacan por su frecuencia:

- Miopatía de Miyoshi (MM): Miopatía distal con afectación predominante en el músculo *gastrocnemius* y en el compartimiento posterior de las piernas, en la que los pacientes tienen dificultades para subir escaleras y andar de puntillas. Posteriormente la afectación se expande a músculos del compartimiento anterior y a músculos proximales [Miyoshi K, 1982].

- Distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B): Afectación predominantemente proximal de extremidades inferiores. Los pacientes LGMD2B presentan niveles de CK muy elevados y la progresión de la enfermedad es variable.

- Miopatía distal con afectación del músculo *tibialis* anterior (DMAT): los pacientes presentan una debilidad de inicio en el músculo tibial anterior, siendo esta debilidad rápidamente progresiva y afectando posteriormente los músculos proximales inferiores y superiores [Illa *et al*, 2001].

La edad de presentación de las disferlinopatías se ha estimado entre los 17-25 años, aunque se han descrito desde casos congénitos hasta casos con presentación en edades muy avanzadas [Klinge *et al*, 2008, Paradas *et al*, 2009]. La CK suele estar muy incrementada, hasta 100 veces por encima del valor límite superior, con presencia a menudo de infiltraciones inflamatorias en la biopsia muscular, que pueden llevar a un diagnóstico erróneo de polimiositis.

1.5.1- Características de las biopsias musculares

Las primeras alteraciones patológicas observadas en biopsias musculares de pacientes con disferlinopatía se corresponden con un patrón típicamente distrófico: variaciones en el tamaño de las fibras, fibras partidas, incremento de núcleos internalizados, fibras necróticas y fibras regenerantes, además de aumento de tejido conectivo endomisial y perimisial [Selcen *et al*, 2001].

El análisis con Western Blot (WB) permite observar ausencia total de proteína en algunos pacientes y bandas de intensidad muy débil en otros [Anderson and Davison, 1999] (Figura 4). Se han descrito casos en los que existe una discrepancia entre los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica y WB, dada la menor sensibilidad de este último [Rosales *et al*, 2010]. En pacientes con un estadio avanzado de la enfermedad se observa un incremento del porcentaje de fibras tipo I, el cual es inversamente proporcional al de fibras regenerantes y degenerantes. Una característica notoria observada en los pacientes con disferlinopatía es la presencia de infiltrados inflamatorios alrededor de las fibras necróticas, tanto de forma aislada como formando grupos. A pesar de no observarse en estos pacientes expresión anormal del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I), un trabajo reciente identifica al sistema del complemento, importante componente del sistema inmunitario innato que promueve inflamación, como un elemento clave en la patogénesis de las disferlinopatías. En dicho trabajo se demuestra que en el músculo esquelético deficitario en disferlina, la expresión de factores del complemento, especialmente C3, está inducida y su supresión genética en un modelo de ratón con

disferlinopatía aminora la patología muscular. De este modo, la activación de la vía del complemento agravaría la progresión de la patología muscular en los pacientes con disferlinopatía [Han *et al*, 2010] .

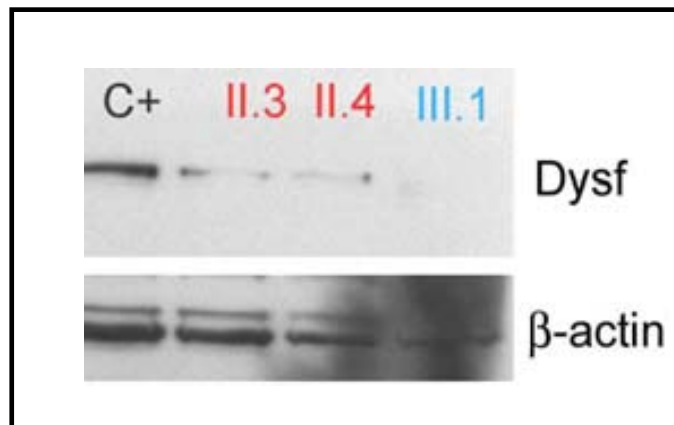


Figura 4. Análisis mediante Western Blot de la expresión de disferlina en monocitos. C+ = Control normal, III₁: Paciente con disferlinopatía, II₃ y II₄: familiares heterocigotos. Dysf= disferlina; β-actin= beta-actina.

1.6- Reparación de la membrana muscular

El estrés y la tensión a la que están expuestos ciertos grupos celulares hacen que sus membranas requieran una constante reparación. Las membranas celulares de tejidos como piel y músculo están continuamente expuestas a daños mecánicos que producen sus rupturas. Dado que la membrana plasmática es una barrera biológica entre el medio extracelular y el intracelular, los daños producidos en esta estructura comprometerán el mantenimiento de la integridad de la célula. Se sabe que las células animales pueden sobrevivir a daños experimentales en sus membranas celulares, por lo que se asume la existencia de un

INTRODUCCIÓN

mecanismo conservado de reparación de membrana, esencial para la supervivencia celular.

Si bien las lesiones que se producen en la membrana plasmática ocurren de forma habitual en todo tipo de células, incluyendo los miocitos de músculo esquelético y cardíaco, cuando no se repara el daño las consecuencias pueden ser graves, originándose la muerte celular y el desarrollo de enfermedades degenerativas, como serían las distrofias musculares.

Un cierto número de genes implicados en distrofias musculares codifican para proteínas que forman parte del complejo glicoproteico de la distrofina (DGC), las cuales están directa o indirectamente involucradas en la unión entre el citoesqueleto y la lámina basal. Defectos en esta unión hacen que el músculo distrófico sea anormalmente susceptible al daño inducido por la contracción muscular y, la acumulación de este daño da lugar a necrosis y debilidad muscular. Muchas otras formas de distrofias musculares como las disferlinopatías no están relacionadas con alteraciones de los componentes del complejo DGC. Las fibras musculares aisladas de pacientes LGMD2B/MM muestran alteraciones del sarcolema que se caracterizan por la acumulación de grupos de vesículas adyacentes a la lesión.

La secuencia aminoacídica de la disferlina es idéntica en un 18% a la de la proteína Fer-1 de *C.elegans*, siendo Fer-1 una mediadora de la fusión de vesículas y membrana plasmática. Fer-1 forma parte de una familia de proteínas llamadas ferlinas, las cuales son sensibles a las variaciones en los niveles de calcio y confieren además la capacidad de unir fosfolípidos, que son los principales componentes de la membrana plasmática.

Desde 1997 se sabe que los mutantes de Fer-1 fallan en la fusión de sus orgánulos membranosos con la membrana plasmática durante la espermatogénesis originando falta de movilidad de los espermatozoides [Achanzar and Ward, 1997]. Una única sustitución aminoacídica en cualquiera de los 3 dominios C2 que contiene Fer-1 es suficiente para alterar la sensibilidad al calcio de esta proteína e interrumpir el proceso de fusión de membrana. Con todos estos datos, en el año 2004 Bansall y Campbell propusieron un modelo de reparación de membrana plasmática en el que la disferlina era un elemento clave. Según este modelo, una rotura en la membrana causaría un influjo de calcio extracelular hacia la fibra muscular y crearía una zona transitoria de acumulación de calcio alrededor del sitio dañado. La disferlina, que está contenida en las vesículas, respondería a esta acumulación y se dirigiría entonces al sitio dañado donde las vesículas se fusionarían entre sí y con la membrana plasmática (Figura 5).

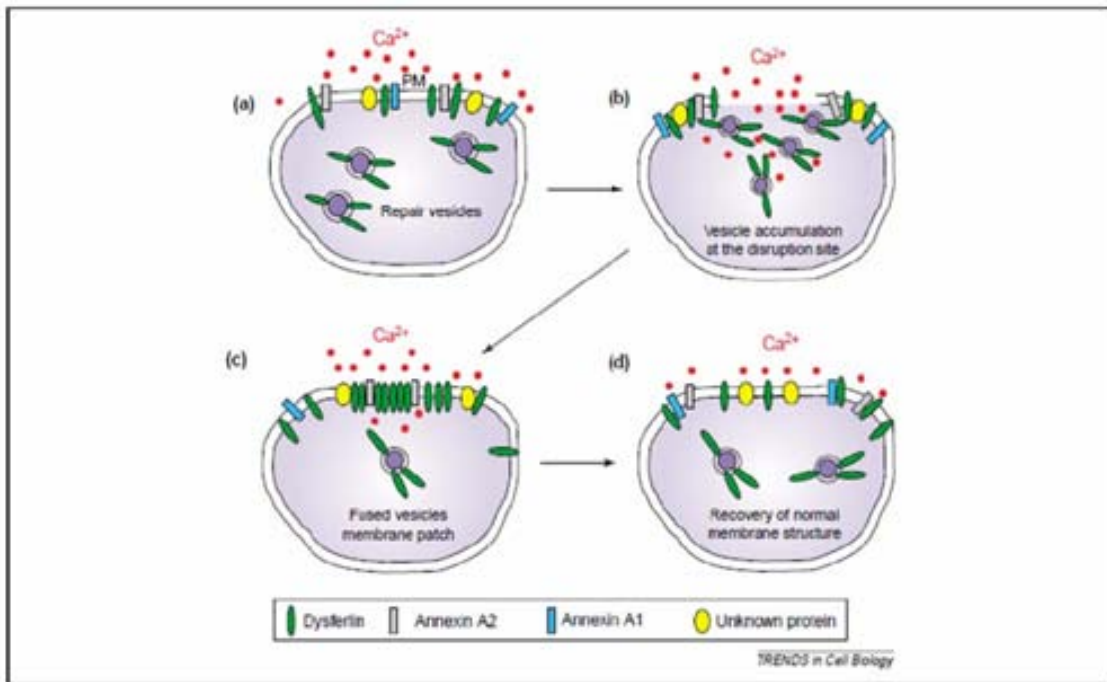


Figura 5. Modelo de reparación del sarcolema propuesto por Bansal y Campbell en 2004. [Bansal and Campbell, 2004]

Se cree que la disferlina podría ser esencial en el paso de fusión vesicular, facilitando así la adhesión con la membrana plasmática mediante la interacción con otras moléculas. Las vesículas fusionadas sellan las pequeñas perforaciones de la membrana, lo que explicaría la incapacidad de reparación en la membrana perforada de los pacientes LGMD2B y Miyoshi. Esta falta de reparación originará una necrosis progresiva de la fibra muscular [Bansal and Campbell, 2004].

Observaciones ultraestructurales de músculos esqueléticos con déficit de disferlina muestran regiones subsarcolémicas con agregados prominentes en forma de pequeñas vesículas y un sarcolema con pequeñas perforaciones, de tipo "microvilli", en

lugar de un aspecto liso y continuo, apoyando el modelo anteriormente citado [Han and Campbell, 2007].

En un trabajo reciente, se describe que las biopsias de pacientes con disferlinopatía muestran un mayor número de fibras inmaduras, en comparación con otros tipos de distrofia muscular, una regeneración atenuada, una limpieza retardada de fibras necróticas y una fase inflamatoria prolongada. El resultado acumulativo de la escasa regeneración secuencial puede ser clave en el desarrollo del fenotipo distrófico en las disferlinopatías. Se hipotetiza que las fibras necróticas persistentes promueven más reacción inflamatoria dirigiendo a las células miogénicas hacia un proceso fibrótico [Chiu *et al*, 2009]. Aunque la disferlina es una proteína básica en la reparación del sarcolema, ella no participa directamente en la movilización de las vesículas intracelulares [Bansal *et al*, 2003]. Por consiguiente, deben existir otras proteínas capaces de desarrollar este proceso.

Recientemente se ha descrito la mitsugumina-53 (*MG53*), una proteína de la familia TRIM específica de músculo, que es un componente esencial para la maquinaria de reparación de la membrana. Mitsugumina-53 actúa como sensor de la oxidación reclutando vesículas intracelulares a los sitios dañados para recuperar la lesión a modo de parche, siempre actuando en sincronía con la proteína caveolina-3. Hay evidencias de que mitsugumina-53 interactúa también con la disferlina para facilitar el tráfico de vesículas intracelulares durante la reparación. Mutaciones en *CAV-3* dan lugar a una distribución subcelular alterada de mitsugumina-53 y de disferlina. Así, la localización alterada de mitsugumina-53 podría ser utilizada como marcador

de distrofia muscular. Tanto mitsugumina-53 como caveolina-3 y disferlina co-inmunoprecipitan y podrían formar un complejo proteico por interacción física. El fallo en la función de cualquiera de estas proteínas podría afectar potencialmente a la capacidad de reparación del sarcolema [Cai *et al*, 2009b].

En la actualidad, el modelo propuesto consistiría en que la entrada de medio oxidativo extracelular activa a mitsugumina-53 facilitando el transporte de vesículas al sitio de la membrana perforado, siempre con la participación de caveolina-3. La formación del "parche" de reparación dependería de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática, proceso a su vez dependiente de la presencia de calcio extracelular y de la actividad de factores de fusión como la disferlina [Cai *et al*, 2009a].

1.7- El gen *DYSF*

El gen implicado en LGMD2B y MM fue localizado inicialmente en el *locus* 2p12-p14 [Bashir *et al*, 1998], observándose en dos grandes familias la presencia de individuos con fenotipo MM e individuos con fenotipo LGMD2B [Bashir *et al*, 1996, Bejaoui *et al*, 1995][Illarioshkin *et al*, 2000, Weiler *et al*, 1999]. Se pensó que ambas enfermedades podrían tener un defecto genético común con un fenotipo modificado por factores adicionales. Finalmente se estableció que el gen *DYSF* mapeaba en el locus 2p13.1-p13.3 entre los marcadores D2S2443 y D2S291 [Bashir *et al*, 1996]. Dos grupos de investigadores diferentes clonaron simultáneamente el gen *DYSF*. Utilizando técnicas de clonaje posicional Lin *et al* basaron su trabajo en una familia con fenotipo

MM y Bashir *et al* en una familia con fenotipo LGMD2B [Liu *et al*, 1998, Bashir *et al*, 1998, Bashir *et al*, 1996].

El gen *DYSF* se expande a lo largo de 150 Kb y contiene 55 exones codificantes. Se transcribe en un transcrito predominante de 8,5 Kb expresado de forma mayoritaria en músculo esquelético y corazón. La secuencia de cDNA contiene una pauta de lectura abierta (ORF de *Open Reading Frame*) de 6243 pares de bases y codifica para una proteína de 2080 aminoácidos, de función aún no exactamente definida y con una homología significativa con el factor de espermatogénesis Fer-1 del nematodo *C. elegans* [Liu *et al*, 1998]. Se ha detectado alta expresión del gen en músculo esquelético, corazón y placenta y, expresión más débil en cerebro, riñón, pulmón, hígado y páncreas.

NM 003494 Tamaño del DNA: 133.13 Kb 6882 pb



Figura 6. Esquema del gen *DYSF*.

Se han caracterizado el extremo 5'UTR y el promotor de la disferlina en la línea miogénica de ratón C2C12 y en humano. La secuencia anterior a 5' del inicio de transcripción del gen es relativamente larga (914 pb) y contiene 13 codones AUG de inicio de transcripción [Foxton *et al*, 2004].

Se han descrito nuevos transcritos de disferlina relacionados con la identificación de exones alternativos de *DYSF*: exón 1 de *DYSF-v1* (GenBank DQ267935), exón 5a (GenBank DQ976379) y exón 40a (genBank EF015906) [Pramono *et al*, 2009]. Un reciente estudio no ha podido detectar la presencia de mutaciones en los exones alternativos *DYSF-v1*, 5a y 40a. En este mismo estudio se extrapola que la frecuencia de variantes en estos exones es menor al 3,85% y que los transcritos que contienen los exones 5a y 40a son muy infrecuentes en músculo esquelético. Por lo tanto, es poco probable que mutaciones en estos exones sean responsables de una disferlinopatía primaria [Krahn *et al*, 2010]. Existen más de 350 mutaciones de todo tipo (*missense*, *nonsense*, *splicing*, *deleciones*...etc) descritas hasta la fecha (www.dmd.nl) que se distribuyen a lo largo de todo el gen, sin existir "hotspots" aparentes.

1.8- Proteína

La disferlina tiene un peso molecular aproximado de 237 kDa y presenta un patrón de expresión muy amplio. En humanos se ha observado su expresión en músculo esquelético, corazón, placenta y en menor grado en hígado, pulmones, riñones y páncreas. No se ha observado expresión en fibroblastos ni en matriz extracelular [Anderson *et al*, 1999]. Su homología a nivel aminoacídico con la proteína fer-1 de *C.elegans* es el origen de su denominación (27% idéntica, 57% idéntica o similar) [Achanzar and Ward, 1997].

La disferlina es una proteína de tipo II estando su extremo C-terminal localizado en la parte extracelular.

INTRODUCCIÓN

Experimentos de inmunoprecipitación detectaron la co-precipitación de disferlina con caveolina-3, proteína localizada en la membrana del músculo esquelético y cardíaco implicada en la formación de caveolas. No se conoce el mecanismo de interacción entre estas dos proteínas pero sí se ha observado una reducción de caveolina-3 y en ocasiones también de disferlina en pacientes con caveolinopatía (LGMD1C), mientras que no existe cambio secundario de caveolina-3 en la mayoría de los pacientes con disferlinopatía [Walter *et al*, 2003]. No obstante, existen descripciones de pacientes LGMD2B sin alteraciones secundarias de caveolina-3 y calpaína-3 [Campanaro *et al*, 2002]. Estudios recientes demuestran que las caveolinas son imprescindibles para la localización de la disferlina en la membrana plasmática.

Matsuda y colaboradores detectaron una reducción de la inmunoreactividad de la afixina, proteína involucrada en la unión entre la integrina y el citoesqueleto, en el sarcolema de pacientes con LGMD2B y MM. La interacción entre disferlina y afixina quedó demostrada mediante un estudio de inmunoprecipitación donde las dos proteínas co-precipitaban juntas. Los autores sugirieron que la afixina jugaría un papel importante en la reparación muscular juntamente con la disferlina [Matsuda *et al*, 2005].

Huang y colaboradores comprobaron que una proteína denominada AHNAK co-inmunoprecipita con disferlina, encontrándose el sitio de unión entre el dominio C2A de disferlina y el dominio carboxiterminal de AHNAK. Ante una reducción o ausencia de disferlina se observa en músculo la pérdida secundaria de AHNAK. Los datos obtenidos por este grupo sugieren que la disferlina participa en el reclutamiento y la

estabilización de AHNAK en el sarcolema, participando ésta última en el proceso de reparación muscular, aunque de manera aún no definida [Huang *et al*, 2008].

Mitsugumina-53 regula procesos dinámicos de fusión de membrana y de exocitosis en músculo estriado. La ausencia de mitsugumina-53 impide la diferenciación de mioblastos, mientras que su sobreexpresión potencia el tráfico de vesículas y la fusión con el sarcolema. Mitsugumina-53 también interviene en el ensamblaje de la maquinaria de reparación sarcolemal restaurando la integridad celular tras el daño en la fibra muscular [Weisleder *et al*, 2009] .

Los modelos de ratón con disferlinopatía presentan un fenotipo muscular moderado al igual que los ratones *knockout* de *MG53*. Sin embargo, aún no se conoce la conexión entre el fallo en la reparación de la membrana y el desarrollo de la distrofia muscular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- Familias y pacientes estudiados

La muestra analizada incluye pacientes diagnosticados de disferlinopatía, referidos al Servicio de Genética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau procedentes de centros del territorio español y de algunos centros europeos. En paralelo, se confirma la reducción o ausencia de disferlina mediante análisis inmunohistoquímico y de Western Blot con anticuerpos anti-disferlina en monocitos de sangre periférica y/o biopsia muscular. Los pacientes estudiados presentaban los diferentes fenotipos descritos: Distrofia de cinturas tipo 2B (LGMD2B), Miopatía de Miyoshi (MM) y Distrofia Tibial Anterior (DAT). En todas las familias se ha estudiado el caso índice y los individuos emparentados que han dado su consentimiento para ser explorados.

El estudio clínico y molecular se ha realizado en un total de 70 familias, en las que se analizó el gen *DYSF* con el objetivo de identificar y caracterizar las posibles mutaciones causantes de la patología.

2.2- Análisis del RNA

Dado el gran tamaño del gen *DYSF* y el hecho de que las mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de toda la secuencia del gen, las técnicas de detección de mutaciones son laboriosas y económicamente costosas. Así, con el objetivo de optimizar el estudio del gen, se ha diseñado un protocolo de

análisis mutacional mediante el estudio del RNA mensajero (mRNA).

La mayor parte de los genes eucariotas de clase II contienen la secuencia traducible en segmentos discontinuos, los exones, interrumpidos por fragmentos de secuencia generalmente más larga, los intrones, que no forman parte del RNA maduro. Los intrones se eliminan del transcrito primario mediante un proceso molecular conocido como *splicing*, que tiene lugar de manera exacta y precisa en los lugares de corte o *splice sites*. La selección de los extremos del intrón o sitios de *splicing* es básica para la fidelidad y efectividad del proceso y viene determinada por el sitio de *splicing* 5' o donador, la secuencia de punto ramificado (*branch point*) y el sitio de *splicing* 3' o aceptor del pre-mRNA. La alteración de estas secuencias, idénticas en todos los intrones conocidos, puede afectar el proceso de maduración del transcrito y generar mRNAs anormales que darán lugar a su vez a proteínas defectuosas o deletéreas.

2.2.1- Obtención de RNA y cDNA

El RNA total se extrae de células mononucleares de sangre periférica (PBMC del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) gracias a la expresión excepcional del gen *DYSF* en monocitos. Dada la extrema labilidad del RNA, la extracción de sangre se realiza en tubos CPT (BD Vacutainer® CPT™) lográndose así una conservación óptima de la muestra desde el momento de la extracción hasta el de su procesamiento, ya que permiten la separación de las células mononucleares desde el mismo momento de la extracción. Contienen 0,45 ml de solución de

citrato de sodio 0.1M, un gel separador y 1 ml de solución de Ficoll Hypaque, con una concentración de 6,4% de ficoll y una densidad de 1,077 Kg/l. Permiten el transporte de la muestra en condiciones estables durante 48 horas a temperatura ambiente. En caso de que no sea posible la utilización de tubos CPT, la extracción de sangre se realiza en tubos EDTA convencionales, requiriéndose en este caso un transporte inmediato de la muestra, con tal de garantizar la menor degradación posible del RNA de la misma.

Procesamiento de tubos CPT:

Una vez extraída la sangre directamente en el tubo CPT, se centrifuga durante 10 minutos a 2500 r.p.m. con un rotor basculante, observándose la separación de dos fases dentro del tubo. Los eritrocitos y los neutrófilos caen al fondo del tubo por debajo de la barrera de gel, quedando un sobrenadante por encima de la misma, el cual contiene plasma con una banda de linfocitos y una banda de monocitos (figura 8). A su llegada al laboratorio, se traspasa el sobrenadante que contiene las células mononucleares a tubos falcon de 15 ml y se enrasa con suero fisiológico hasta 15 ml. Se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 minutos a 1700 r.p.m., obteniéndose un pellet de linfocitos y monocitos lavados en el fondo del tubo. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc., Houston, USA), que mantendrá el RNA estable durante más de 9 meses libre de contaminación por proteínas o DNA. De este modo la muestra se conserva a -80 °C hasta el momento de la extracción del RNA.

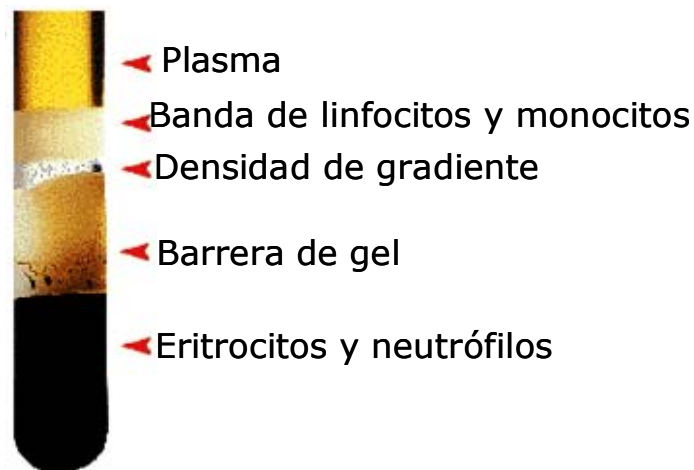


Figura 8. Imagen de las diferentes fracciones sanguíneas obtenidas tras centrifugación en tubo CPT.

2.2.2- Extracción de RNA

El protocolo de extracción de RNA es el siguiente:

Resuspender el pellet de PBMC en 1 ml de Ultraspec.

Incubar 5 minutos a 4°C.

Añadir 200 µl de cloroformo absoluto.

Agitar manualmente durante 15 segundos mezclando las dos fases.

Incubar en hielo durante 5 minutos.

Centrifugar a 4°C a 12000 r.p.m. durante 15 minutos.

Recoger la fase acuosa superior y medir el volumen recuperado.

Hacer una dilución 1:1 con isopropanol absoluto.

Agitar mezclando las dos fases.

Incubar 10 minutos a 4°C.

Centrifugar a 4°C y 12000 r.p.m. durante 10 minutos.

Descartar el sobrenadante.

Añadir 1 ml de etanol al 75%.

Centrifugar a 4°C y 12000 r.p.m. durante 5 minutos.

Descartar el sobrenadante, conservando el pellet de RNA al final del tubo.

Dejar secar el pellet a temperatura ambiente durante 20 minutos aproximadamente.

Diluir el pellet seco con 20 μ l de agua estéril.

Una vez obtenido el RNA se calcula su concentración y pureza mediante una lectura espectrofotométrica a partir de una dilución de RNA 1:100.

2.2.3- Retrotranscripción a cDNA

La síntesis de una cadena de DNA complementaria (cDNA) requiere una mezcla de mRNA a modo de molde y una DNA polimerasa dependiente de RNA, la transcriptasa inversa. Aprovechando la cola de poli(A) presente en el extremo 3' de los mRNAs, se utiliza como cebador un oligo(dT), el cual hibrida por complementariedad con dicha secuencia de poli(A). Así, el RNA obtenido se retrotranscribe a cDNA utilizando la técnica de primer oligo(dT) (Invitrogen, Carsbad, CA, USA).

Se parte de 10 μ l de RNA extraído (la concentración final de RNA tendrá que estar entre 1 y 5000 ng/ μ l). Se añade 1 μ l de oligodT y 1 μ l de difosfonucleótidos (dNTPs).

Se incuba esta mezcla a 65°C durante 5 minutos.

Se enfría a 4°C después de la incubación.

Se añade al mismo tubo 4 μ l de tampón, 2 μ l de DTT y 1 μ l de RNAsa *out*.

Se incuba a 37°C durante 2 minutos.

Se enfría a 4°C después de la incubación.

Se añade 1 μ l de M-MLV RT.

Se incubó a 37°C durante 50 minutos y seguidamente a 70°C durante 15 minutos.

*Todos los reactivos utilizados pertenecen a un kit comercial (Invitrogen, Carsbad, CA, USA).

2.2.4- Amplificación de *DYSF*

Una vez obtenido el cDNA, procedemos a realizar la amplificación y el análisis mutacional del gen *DYSF*. Para ello, se han diseñado 13 parejas de *primers* que cubren los 55 exones del gen. Los *primers* se han diseñado mediante el software Primer-BLAST disponible online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Con la finalidad de obtener la máxima informatividad, los exones se incluyeron en más de un fragmento, creando un solapamiento de fragmentos (ver figura 9 y tabla 4).

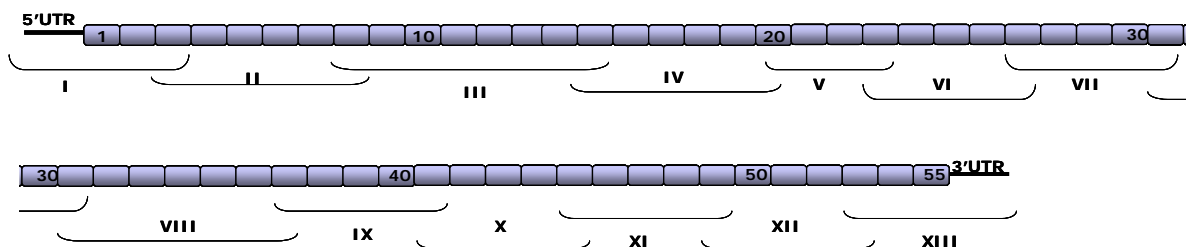


Figura 9. Diseño y distribución de los fragmentos de amplificación a lo largo de la secuencia de cDNA.

Cada uno de los fragmentos se amplifica mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con unas condiciones estándares y comunes para todos ellos.

Las reacciones de amplificación contienen:

1 μ l de cDNA

Tampón de PCR 10X

0.8 mM de cloruro magnésico ($MgCl_2$)

0.8 mM de dinucleótidos fosfato (DNTPs)

0.2 μ M de cada pareja de *primers*

0.5 U de DNA *Taq* polimerasa (Ecotaq ETAQ500).

El programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Finalmente una extensión larga a 72°C durante 10 minutos. Cada pareja de *primers* requiere una temperatura de hibridación específica para obtener una buena amplificación.

Las temperaturas de hibridación (T_h) para cada fragmento, así como la secuencia de los *primers* utilizados, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 4. Fragmentos de cDNA diseñados para la amplificación del gen *DYSF*.

	Exones	Secuencias de los <i>primers</i> (5'->3')	PCR (pb)	Th (°C)
I	5'UTR, 1, 2, 3	DYSF1F: TTGGGAGACTCCGCAGCCGG DYSF1R: TGGGACCTTGGCTTCCCCCA	600	60
II	3, 4, 5, 6, 7, 8	DYSF 2F:GGGCTCTGAGCTTCATGTGGTGG DYSF2R: ACCACCGTGATAAAGATGGGCTCA	678	63
III	8, 9, 10, 11, 12, 13,14, 15	DYSF3F: CAGGGCAGACCAAGCGGACG DYSF3R: TGTGAGTCAGGCGGTCCCAGT	678	63
IV	15, 16, 17, 18, 19, 20	DYSF4F: CGGCCAACCTCAGTGGAACC DYSF4R: CTGAGTGGTGGAGGCCAGCG	599	60
V	21, 22, 23	DYSF5F: GCGGCCTTCTACTCAGCCACC DYSF5R: CCGCTGGTATGCCACACGCT	639	63
VI	23, 24, 25, 26, 27	DYSF6F: GTCTGCGTGCCCTGGCAGAG DYSF6R: CCCAGTGGGCACTCAATGTCATCC	640	60
VII	27, 28, 29, 30, 31	DYSF7F: CCCGGAGGCCAGTGGATCTACA DYSF7R: GTCCATCGCAGCCAGGTCCC	624	63

VIII	31, 32, 33, 34, 35, 36, 37	DYSF8F: CCGTCTCCACCTTGAGCTTCGG DYSF8R: ATGTTCCGCAGGCCCCATGC	646	63
IX	37, 38, 39, 40, 41	DYSF9F: ACCCCAGAGGGAGGCCAACA DYSF9R: ACAGGCCCTCAAAGGCCTCCA	622	63
X	41, 42, 43, 44, 45	DYSF10F: GGGGAGAGGGAAAAGTGCGGC DYSF10R: CCGCCACTGGTTCGGTCCAG	623	63
XI	45, 46, 47, 48, 49	DYSF11F: GCTGCTGTCCAAGTTTGGGGCT DYSF11R: TGCACGTCTGTCTTTTGCTTGTGT	564	63
XII	49, 50, 51, 52, 53	DYSF12F: ACGGGGGAGAAGATGAGCGACA DYSF12R: GCGCCTTGGGTCCTCAAGCT	570	60
XIII	53, 54, 55, 3'UTR	DYSF13F: ACTGGCGGGCAAGCTGGAAA DYSF13R: GCGTTGGGTTGGGGGAGAAGG	525	60

El control de amplificación de cada fragmento de cDNA se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa (1,5%) visualizando las bandas amplificadas mediante un transiluminador.

2.2.5- Purificación del producto amplificado.

Las muestras se purifican mediante una técnica enzimática con ExoSap-it. (GE Healthcare, USA). Se trata de un proceso mediante el cual se eliminan del producto amplificado aquellas parejas de *primers* y dinucleótidos que no se han incorporado a la

MATERIAL Y MÉTODOS

reacción y han quedado sobrantes. Para ello, se mezclan 5µl de muestra con 2 µl de ExoSap-it. Se colocan los tubos con la mezcla en un termociclador y se aplica un programa que consiste en:

94°C → 6min.

37°C → 15 min.

80°C → 15 min.

4°C

A continuación se realiza una reacción de secuencia con el kit de secuenciación de DNA (BIG DYE 3.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a partir de los productos amplificados y purificados. En la reacción se emplea una premix (ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) que incorpora los siguientes reactivos: tampón de la reacción, dNTPs (90%), ddNTPs (10%) y la enzima ADN polimerasa.

Cada tubo de reacción de secuencia contiene:

- 2 µl de muestra amplificada y purificada
- 1 µl de *primer* (3µM) F: *forward* (directo) o R: *reverse* (reverso), según convenga
- 1 µl de Big DYE terminador v3.1
- 4.5 µl de agua estéril
- 1.5 µl de tampón Big DYE

Los tubos se introducen en un termociclador con un programa que consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, 24 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 15 segundos y extensión a 60°C durante 6 minutos. Finalmente se realiza una extensión larga a 60°C durante 10 minutos.

Una vez finalizada la reacción de secuencia, las muestras se precipitan para eliminar sales e impurezas, así como los excedentes de reactivos. La precipitación se realiza con un kit comercial que se basa en un sistema de filtración en placa por vacío (Millipore, Billerica, MA). Se diluye la reacción de secuencia añadiendo 20 μl de *injection solution*, proporcionada por la casa comercial junto con las placas de filtración. Las reacciones de secuencia diluidas se transfieren a una placa SEQ₉₆, a la que se le aplica un vacío de 25 pulgadas hasta que se haya filtrado todo el líquido por los poros de filtración. Se añade a cada pocillo 20 μl de *injection solution* y se le aplica de nuevo el mismo sistema de vacío. Se añaden 20 μl más de *injection solution* y se coloca la placa en agitación durante 10 minutos. Seguidamente se recoge el volumen y se traspara a una placa de secuenciación, diluyéndose el volumen recogido con 10 μl de formamida.

Finalmente se analiza cada fragmento amplificado, purificado y precipitado mediante secuenciación directa y reversa con un kit comercial de secuenciación de DNA (BIG DYE 3.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en un secuenciador automático (ABRIPRISM 3130 Avant, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que realiza una electroforesis capilar automatizada basándose en los principios de secuenciación de Sanger (Sanger, 1975). Una vez obtenidas las secuencias, se analizan comparándolas con la secuencia de referencia del gen *DYSF* (NM_003494.2).

Los cambios nucleotídicos observados se confirman en DNA genómico (gDNA) del paciente mediante secuenciación directa del exón que contiene el cambio. Si el cambio no ha sido descrito

previamente en la literatura, se analizan 120 cromosomas de población control. Además, se analiza el posible efecto patogénico de la mutación identificada mediante un software específico: ALAMUT (Alamut® - Mutation Interpretation Software). La comparación de las predicciones *in silico* junto con el análisis del mRNA y el análisis de controles es útil para confirmar su validez.

2.3- Amplificación de *MG53*

La amplificación del gen *MG53* se realiza a partir de DNA. Para ello, se han diseñado 6 parejas de *primers* que cubren los 7 exones del gen (tabla 5). Los *primers* se han diseñado mediante el software Primer-BLAST disponible online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Cada uno de los exones se amplifica mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con unas condiciones estándares y comunes para todos ellos. Las reacciones de amplificación contienen:

1 µl de DNA

Tampón de PCR 10X

1.6 mM de cloruro magnésico (MgCl₂)

0.8 mM de dinucleótidos fosfato (DNTPs)

0.2 µM de cada pareja de *primers*

0.5 U de DNA *Taq* polimerasa (Ecotaq ETAQ500).

El programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 65°C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Finalmente una extensión larga a 72°C durante 10 minutos. La secuencia de los *primers* utilizados, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 5. Primers de amplificación para el gen *MG53*.

Exones	Secuencias de los <i>primers</i> (5'->3')	PCR (pb)
1	MG53-1F: ACTGTGTGCCCATCACGCGT MG53-1R: GCAGCCTCCACTGCAATTCTCAGC	427
2	MG53- 2F: CTAGGGCTGGGCCAGGGCTG MG53-2R: CCAGGAGCTCGTGAGCCTCTCT	587
3, 4	MG53-3,4F: GTGGGTGGCATCCCCATCACTT MG53-3,4R: GCTTATCCCTGCCCTCTCTGGG	567
5	MG53-5F: TGACGTTGCACTCAGCATTCTAGT MG53-5R: TTGCGGGTGTGCAGGCACAAT	226
6	MG53-6F: GTGCGATGTGGGGAGATCCTGGAA MG53-6R: TCCAGAGGCAAAGGGGCAATGG	337
7	MG53-7F: AGACCCCAGCGAGGCAGAAAC MG53-7R: AGATCCCCCAGTTCCCAGCC	755

2.3.1- Purificación del producto amplificado.

Las muestras se purifican mediante la técnica enzimática con ExoSap-it. (GE Healthcare, USA). Se trata de un proceso mediante el cual se eliminan del producto amplificado aquellas parejas de *primers* y dinucleótidos que no se han incorporado a la reacción y han quedado sobrantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para ello, se mezclan 5 μ l de muestra con 2 μ l de ExoSap-it. Se colocan los tubos con la mezcla en un termociclador y se les aplica un programa que consiste en:

94°C → 6 min.

37°C → 15 min.

80°C → 15 min.

4°C

A continuación se realiza una reacción de secuencia con el kit de secuenciación de DNA (BIG DYE 3.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a partir de los productos amplificados y purificados. En la reacción se emplea una premix (ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) que incorpora los siguientes reactivos: tampón de la reacción, dNTPs (90%), ddNTPs (10%) y la enzima ADN polimerasa.

Cada tubo de reacción de secuencia contiene:

- 2 μ l de muestra amplificada y purificada
- 1 μ l de *primer* (3 μ M) F: *forward* (directo) o R: *reverse* (reverso), según convenga
- 1 μ l de Big DYE terminador v3.1
- 4.5 μ l de agua estéril
- 1.5 μ l de tampón Big DYE

Los tubos se introducen en un termociclador con un programa que consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, 24 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 15 segundos y extensión a 60°C durante 6 minutos. Finalmente se realiza una extensión larga a 60°C durante 10 minutos.

Una vez finalizada la reacción de secuencia, las muestras se precipitan para eliminar sales e impurezas, así como los excedentes de reactivos (dNTPs, enzimas, primers... etc.). La precipitación se realiza con un kit comercial que se basa en un sistema de filtración en placa por vacío (Millipore, Billerica, MA). Se diluye la reacción de secuencia añadiendo 20 μ l de *injection solution*, proporcionada por la casa comercial junto con las placas de filtración. Las reacciones de secuencia diluidas se transfieren a una placa SEQ₉₆, a la que se le aplica un vacío de 25 pulgadas hasta que se haya filtrado todo el líquido por los poros de filtración. Se añade a cada pocillo 20 μ l de *injection solution* y se le aplica de nuevo el mismo sistema de vacío. Se añaden 20 μ l más de *injection solution* y se coloca la placa en agitación durante 10 minutos. Seguidamente se recoge el volumen y se traspasa a una placa de secuenciación, diluyéndose el volumen recogido con 10 μ l de formamida.

Finalmente se analiza cada fragmento amplificado, purificado y precipitado mediante secuenciación directa y reversa con un kit comercial de secuenciación de DNA (BIG DYE 3.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en un secuenciador automático (ABRIPRISM 3130 Avant, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que realiza una electroforesis capilar automatizada basándose en los principios de secuenciación de Sanger [Sanger and Coulson, 1975]. Una vez obtenidas las secuencias, se analizan comparándolas con la secuencia de referencia del gen *MG53* (NM_001008274).

2.4- Técnica de *MLPA*

La técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (*MLPA*) se ha utilizado para la detección de pérdidas (deleciones) o ganancias (duplicaciones) de material genético. Actualmente esta técnica permite analizar 40 de los 55 exones del gen *DYSF*. Esta técnica se basa en la amplificación de sondas específicas previamente hibridadas a las secuencias diana del DNA. Cada sonda consiste en dos oligonucleótidos que hibridan en zonas adyacentes dentro de la secuencia diana del DNA. A continuación estas sondas hibridadas son ligadas y posteriormente se procede a su amplificación mediante PCR con una única pareja de *primers*, ya que todas las sondas contienen secuencias idénticas en sus extremos.

El análisis de las muestras se ha realizado mediante un kit comercial (MRC-Holland B.V: SALSA MLPA KIT P268 (<http://www.mrc-holland.com>):

Inicialmente se valora la muestra mediante una lectura espectrofotométrica de su concentración de DNA y sales. En caso de presentar un DNA rico en sales, se purifica mediante columnas de afinidad (GE Healthcare). La concentración de la muestra debe ajustarse a 20 ng/ μ l con TRIS/EDTA 10/0.1 mM.

El primer paso de la técnica es una desnaturalización seguida de una reacción de hibridación. Se ponen 5 μ l de la dilución 20ng/ μ l (100 ng DNA) de cada muestra problema en tubos de 0.2ml y se analizan a la vez de 3 a 5 controles de individuos sanos. Cada ensayo se realiza por duplicado. Se desnaturaliza mediante una incubación a 98°C durante 5 minutos seguida de un enfriamiento a 25°C.

En este momento, se añade a cada tubo la mix de sondas que vienen preparadas comercialmente: 1.5 μl de sonda "probemix" + 1.5 μl de "salsa MLPA buffer", obteniendo un volumen final de 3 μl por tubo. Se incuba esta mezcla a 95 °C durante 1 minuto y se deja 16 horas a 60°C para su hibridación en un termociclador.

Reacción de hibridación :

98°C 5'

25°C hold

95°C 1'

60°C hold

El siguiente paso es la ligación y para ello se prepara una mezcla (mix ligasa) de 3 μl de "buffer A" + 3 μl de "buffer B" + 25 μl de agua estéril + 1 μl de ligasa. El volumen final es 32 μl por tubo.

Se disminuye la temperatura a 54°C (dentro del termociclador) y a dicha temperatura se añade la mix ligasa a cada tubo. Se procede, entonces, a una incubación a 54°C durante 15 minutos y a 98°C durante 5 minutos. En este punto, es posible parar el proceso y conservarlo a 4°C.

Reacción de ligación:

1. 54°C hold

2. 54°C 15'

3. 98°C 5'

4. 15°C hold

Se prosigue con una reacción de PCR para lo cual se requiere una mezcla de 4 μl de "PCR buffer" + 26 μl de agua estéril, llegando a un volumen final por tubo de 30 μl . Se prepara una mix polimerasa, que consta de: 2 μl de "FAM PCR primers" + 2 μl de

MATERIAL Y MÉTODOS

"enzyme dilution buffer" + 5.5 μ l de agua estéril + 0.5 μ l de polimerasa. Se añaden 10 μ l de reacción de ligación a la mix de PCR y se incuba a 60°C. Una vez alcanzada la temperatura, se añaden 10 μ l de mix polimerasa a cada tubo e inmediatamente empieza la reacción. Es importante realizar estos últimos pasos con cierta celeridad.

Reacción de PCR:

9. 76°C *hold*

10. 35 ciclos:

11. 95°C 30''

12. 60°C 30''

13. 72°C 1'

14. 72°C 20'

15. 15°C *hold*

Una vez realizada la PCR se procede a la electroforesis del producto amplificado. Se prepara una placa de secuenciación, añadiendo a cada pozo 14.5 μ l de formamida+ 0,5 μ l de ROX 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)+ 1 μ l de reacción de PCR. Se desnaturalizan las muestras a 96°C y se procesan en un secuenciador automático (ABRIPRISM 3130 Avant, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

El análisis del número de copias exónicas y la detección de duplicaciones o deleciones en alguno de los alelos, se realiza mediante una normalización con la ayuda de una hoja Excel, o bien, realizando un análisis automático con el software específico "Coffalyser" (Figura 10).

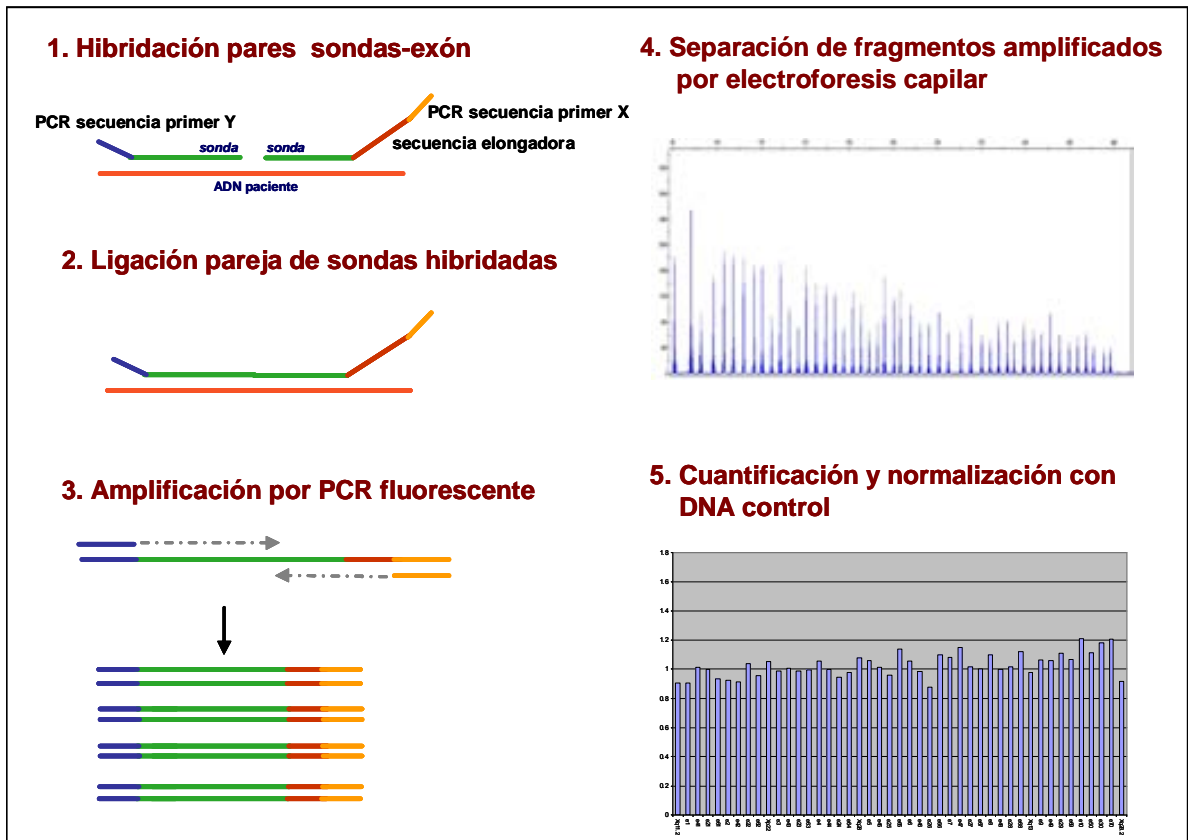


Figura 10. Esquema de las distintas etapas que conforman la técnica de *MLPA*.

3. OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el estudio molecular del gen *DYSF* en pacientes de población española con sospecha clínica de Distrofia de cinturas autosómica recesiva tipo 2B (LGMD2B) y Miopatía Distal tipo Miyoshi (MM). La identificación de mutaciones en estos pacientes y sus familiares permite establecer un pronóstico de la evolución de los síntomas, facilita el asesoramiento genético y proporciona las bases para la aplicación de terapias futuras.

Los objetivos concretos del trabajo son:

1. Estudio del gen *DYSF* en pacientes afectados de disferlinopatía, nunca antes estudiado en población española.
2. Diseño de una estrategia técnica del análisis del gen *DYSF*.
 - a. Optimización del diagnóstico mediante la utilización de RNA *vs* DNA.
 - b. Análisis de grandes reordenamientos del gen.
3. Caracterización del espectro mutacional en nuestra población.
4. Establecimiento de la relación genotipo-fenotipo.
5. Análisis molecular de posibles genes modificadores.

4. RESULTADOS

4.1- Mutaciones identificadas en *DYSF* en pacientes afectos de disferlinopatía de población española

A continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos del análisis molecular del gen *DYSF* en 70 familias (ver tabla 6). Este análisis ha permitido la identificación de diferentes mutaciones, para cuya nomenclatura se han seguido las recomendaciones internacionales emitidas por la Sociedad de Variantes Genómicas Humanas (HGVS del inglés *Human Genome Variation Society*) [den Dunnen and Antonarakis, 2001]. Se considera la referencia Genebank NM_003494 como secuencia de referencia y la primera base del codón iniciador Metionina como la posición número 1. Se han identificado 56 mutaciones diferentes en *DYSF*, 32 de ellas no descritas anteriormente en la literatura.

RESULTADOS

Tabla 6. Mutaciones identificadas en el gen *DYSF* en las familias estudiadas.

FAMILIA	PACIENTE Y FAMILIARES	MUTACIÓN 1	EXÓN	MUTACIÓN 2	EXÓN
I	I.1	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)	29	c.1357C>T (p.Pro453Ser)	15
	I.2	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)			
	I.3	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)			
	I.2	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)			
II	II.1	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)	18		
	II.2	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)			
	II.3				
III	III.1	-			
	III.2	-			
IV	IV.1	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34
V	V.1	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34

	V.2	-			
VI	VI.1	c.2813T>G (p.Leu938Arg)	27		
	VI.2	c.2813T>G (p.Leu938Arg)			
VII	VII.1	c.5572G>A (p.Asp1858Asn)	50	c.5966G>A (p.Trp1989X)	53
	VII.2	c.5572G>A (p.Asp1858Asn)			
	VII.3			c.5966G>A (p.Trp1989X)	
	VII.4	c.5572G>A (p.Asp1858Asn)			
	VII.5	c.5572G>A (p.Asp1858Asn)			
	VII.6			c.5966G>A (p.Trp1989X)	
VIII	VIII.1	c.5525+2T>A	49	c.4334-2A>G	40
	VIII.2	c.5525+2T>A			
IX	IX.1	c.1180+5G>C			
	IX.2	-			
X	X.1	c.3116G>T (p.Arg1039Leu)	29	c.5302C>T (p.Arg1768Trp)	47
	X.2	c.3116G>T (p.Arg1039Leu)		c.5302C>T (p.Arg1768Trp)	
XI	XI.1	c.2875C>T (p.Arg959Trp)	27	c.2875C>T (p.Arg959Trp)	27

RESULTADOS

	XI.2	c.2875C>T (p.Arg959Trp)			
	XI.3	c.2875C>T (p.Arg959Trp)			
	XI.4	c.2875C>T (p.Arg959Trp)		c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)	30
	XI.5	-			
XII	XII.1	-		-	
XIII	XIII.1	c.2055+1G>A	21	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34
XIV	XIV.1	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)	26	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)	26
	XIV.2	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)		c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)	
	XIV.3	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)			
	XIV.4	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)			
	XIV.5	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)			
	XIV.6	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)			
	XIV.4	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)			
XV	XV.1	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)	30		
XVI	XVI.1	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)	44	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)	44

	XVI.2	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)			
	XVI.3	-			
	XVI.4	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)			
	XVI.5	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)			
	XVI.6	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)			
	XVI.7	c.4882G>A (p.Gly1628Arg)			
XVII	XVII.1	c.5667+1G>A	50	c.5667+1G>A	50
	XVII.2	c.5667+1G>A			
	XVII.3	c.5667+1G>A			
XVIII	XVIII.1	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53
	XVIII.2	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	XVIII.3	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	XVIII.4	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	XVIII.5	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	XVIII.6	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
XIX	XIX.1	c.5289G>C (p.Glu1763Asp)	47		

RESULTADOS

	XIX.2	c.5289G>C (p.Glu1763Asp)			
	XIX.3	c.5289G>C (p.Glu1763Asp)			
	XIX.4	c.5289G>C (p.Glu1763Asp)			
	XIX.5	-			
	XIX.6	-			
	XIX.7	-			
	XIX.8	-			
	XIX.9	-			
	XIX.10	-			
XX	XX.1	c.5289G>C (p.Glu1763Asp)	47		
	XX.2	c.5289G>C (p.Glu1763Asp)			
	XX.3	-			
	XX.4	-			
	XX.5	-			
XXI	XXI.1	c.1020C>A (p.Ser340Arg)	11	c.1020C>A (p.Ser340Arg)	11
XXII	XXII.1	c.1020C>A (p.Ser340Arg)	11	c.1168G>A (p.Asp390Asn)	12

	XXII.2	c.1020C>A (p.Ser340Arg)			
	XXII.3	c.1168G>A (p.Asp390Asn)		c.3181delC (p.Gln1061ArgfsX59)	30
XXIII	XXIII.1	-		-	
XXIV	XXIV.1	c.3112C>T (p.Arg1038X)	29	[c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)][c.1180+5G>A]	30
	XXIV.2	c.3112C>T (p.Arg1038X)	29	[c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)][c.1180+5G>A]	30
	XXIV.3	c.3112C>T (p.Arg1038X)			
	XXIV.4	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)			
	XXIV.5	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)			
	XXIV.6	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)			
	XXIV.7	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)			
	XXIV.8	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)			
	XXIV.9	[c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)][

RESULTADOS

		c.1180+5G>A]			
XXV	XXV.1	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)	37	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)	37
	XXV.2	c.3992G>T (p.Arg1331Leu)	37		
	XXV.3	c.3992G>T (p.Arg1331Leu)			
XXVI	XXI.1	-			
XXVII	XXVII.1	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)	29	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)	29
	XXVII.2	c.3130C>A (p.Arg1044Ser)			
XXVIII	XXVIII.1	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)	26	-	
XXIX	XXIX.1	c.4253G>A (p.Gly1418Asp)	39	c.5302C>T (p.Arg1768Trp)	47
XXX	XXX.1	c.3892A>G (p.Ile1298Val)	36	c.3892A>G (p.Ile1298Val)	36
XXXI	XXXI.1	[c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)], [c.2500A>G(p.Ile834Val)]	18,24	c.3196_3191dup (p.Ala1064_Glu1065dup)	30
XXXII	XXXII.1	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)	30	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)	30
XXXIII	XXXIII.1	-		-	
XXXIV	XXXIV.1	c.895G>C (p.Gly299Arg)	9	c.5952G>C (p.Lys1984Asn)	53
XXXV	XXXV.1	c.2064_2068dup (p.Glu690AlafsX8)	22		

	XXXV.2	c.2064_2068dup (p.Glu690AlafsX8)			
	XXXV.3	-			
XXXVI	XXXVI.1	C.509C>A (p.Ala170Glu)	6	-	
XXXVII	XXXVII.1	c.2875C>T (p.Arg959Trp)	27	c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup)	30
XXXVIII	XXXVIII.1	c.5077C>T (p.Arg1693Trp)	46	c.1639-6T>A	19
XXXIX	XXXIX.1	c.154T>C (p.Trp52Arg)	3	c.701G>A (p.Gly234Glu)	7
	XXXIX.2	c.701G>A (p.Gly234Glu)			
XL	XL.1	c.5999G>A (p.Arg2000Gln)	53	c.5194G>T (p.Glu1732X)	46
	XL.2	c.5999G>A (p.Arg2000Gln)			
XLI	XLI.1	c.2875C>T (p.Arg959Trp)	27	c.593_594dup (p.Gly199ProfsX29)	6
	XLI.2	c.2875C>T (p.Arg959Trp)			
	XLI.3	c.2875C>T (p.Arg959Trp)			
	XLI.4	c.593_594dup (p.Gly199ProfsX29)			
	XLI.5	c.593_594dup (p.Gly199ProfsX29)			
	XLI.6	c.593_594dup (p.Gly199ProfsX29)			

RESULTADOS

XLII	XLII.1	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51
	XLII.2	c.5713C>T (p.Arg1905X)		c.5713C>T (p.Arg1905X)	
	XLII.3	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLII.4	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLII.5	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLII.6	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLII.7	-			
	XLII.8	-			
	XLII.9	-			
XLIII	XLIII.1	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51
	XLIII.2	c.5713C>T (p.Arg1905X)		c.5713C>T (p.Arg1905X)	
	XLIII.3	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIII.4	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIII.5	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIII.6	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIII.7	c.5713C>T (p.Arg1905X)			

	XLIII.8	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIII.9	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIII.10	-			
XLIV	XLIV.1	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51
	XLIV.2	c.5713C>T (p.Arg1905X)		c.5713C>T (p.Arg1905X)	
	XLIV.3	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	XLIV.4	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
XLV	XLV.1	2858dupT (p.Phe954ValfsX2)	27	2858dupT (p.Phe954ValfsX2)	27
	XLV.2	2858dupT (p.Phe954ValfsX2)		2858dupT (p.Phe954ValfsX2)	
	XLV.3	2858dupT (p.Phe954ValfsX2)			
	XLV.4	2858dupT (p.Phe954ValfsX2)			
	XLV.5	-			
	XLV.6	-			
XLVI	XLVI.1	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53	c.6124C>T (p.Arg2042Cys)	54
	XLVI.2	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53	c.6124C>T (p.Arg2042Cys)	54
	XLVI.3	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			

RESULTADOS

	XLVI.4	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	XLVI.5	c.6124C>T (p.Arg2042Cys)			
XLVII	XLVII.1	c.5594delG (p.Gly1865AlafsX101)	50	c.5594delG (p.Gly1865AlafsX101)	50
XLVIII	XLVIII.1	c.3967C>T (p.Gln1323X)	37	c.4497delT (p.Phe1499LeufsX3)	41
XLIX	XLIX.1	c.5323C>T (p.Gln1775X)	47	c.5323C>T (p.Gln1775X)	47
L	L.1	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53
	L.2	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)		c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	
	L.3	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	L.4	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
	L.5	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)			
LI	LI.1	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)	18	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)	18
	LI.2	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)		c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)	
	LI.3	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)			
	LI.4	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)			
	LI.5	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)			
	LI.6	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)			

	LI.7	c.1555G>A (p.Leu508CysfsX108)			
	LI.8	-			
	LI.9	-			
LII	LII.1	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51
	LII.2	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	LII.3	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	LII.4	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
	LII.5	c.5713C>T (p.Arg1905X)			
LIII	LIII.1	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51	c.5713C>T (p.Arg1905X)	51
LIV	LIV.1	c.3992G>T (p.Arg1331Leu)	37	-	
LV	LV.1	c.1984_1994del (p.Ser662GlyfsX6)	21	-	
LVI	LVI.1	c.5525+3A>G (p.Arg1810_Gly1842delinsSer)	49	c.5525+3A>G (p.Arg1810_Gly1842delinsSer)	49
LVII	LVII.1	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)	46	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53
	LVII.2	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)		c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	
	LVII.3	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)		c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	

RESULTADOS

	LVII.4	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)			
	LVII.5	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)			
	LVII.6	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)			
	LVII.7	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)			
	LVII.8	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)			
	LVII.9	c.5159delG (p.Arg1720LeufsX2)			
	LVII.10	-		-	
LVIII	LVIII.1	c.1020C>A (p.Ser340Arg)	11	-	
	LVIII.2	c.1020C>A (p.Ser340Arg)	11	-	
LIX	LIX.1	c.1353+1G>A (p.Phe452MetfsX39)	14	c.1353+1G>A (p.Phe452MetfsX39)	14
LX	LX.1	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53	c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3)	53
LXI	LXI.1	-		-	
LXII	LXII.1	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34	-	
LXIII	LXIII.1	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)	37	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)	37
	LXIII.2	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)			
	LXIII.3	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)			

	LXIII.4	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)			
	LXIII.5	c.4003G>A (p.Glu1335Lys)			
	LXIII.6	-		-	
LXIV	LXIV.1	c.5594delG (p.Gly1865AlafsX101)	50	c.5594delG (p.Gly1865AlafsX101)	50
LXV	LXV.1	c.1120G>C (p.Val374Leu)	12	c.1120G>C (p.Val374Leu)	12
	LXV.2	c.1120G>C (p.Val374Leu)		c.1120G>C (p.Val374Leu)	
	LXV.3	c.1120G>C (p.Val374Leu)		c.1120G>C (p.Val374Leu)	
	LXV.4	c.1120G>C (p.Val374Leu)		c.1120G>C (p.Val374Leu)	
	LXV.5	c.1120G>C (p.Val374Leu)			
LXVI	LXVI.1	c.3805G>T (p.Glu1269X)	34	c.4969G>A (p.Glu1657Lys)	45
LXVII	LXVII.1	c.2163-2A>G	22i	Delección exón 23 y 24	
LXVIII	LXVIII.1	Delección exón 4			
LXIX	LXIX.1	c.3181delC (p.Gln1061ArgfsX59)	30	-	
LXX	LXX.1	c.3181delC (p.Gln1061ArgfsX59)	30	-	

4.2- Estudio del gen DYSF en pacientes afectados de disferlinopatía de procedencia europea.

Abnormal expresión of dysferlin in skeletal muscle and monocytes supports primary dysferlinopathy in patients with one mutated allele.

M.Meznaric, L. González-Quereda, E. Gallardo, N. de Luna, P. Gallano, M. Fanin, C. Angelini, B. Peterlin and J. Zidar.

European Journal of Neurology 2010. Article first published online: 18 OCT 2010 DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.03240.x



Resumen:

Antecedentes: En algunos casos, la confirmación definitiva de disferlinopatía no se puede conseguir mediante el análisis del DNA ya que se detecta la mutación sólo en uno de los alelos.

Pacientes y Métodos. La expresión de disferlina en músculo esquelético y en monocitos de sangre periférica (PBM) se analizó mediante Western Blot en dos pacientes adultos no emparentados. Se utilizó el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) para calcular los cambios relativos en el mRNA de disferlina determinado mediante PCR cuantitativa a tiempo real. El gen *DYSF* se estudió mediante secuenciación directa del cDNA y del DNA genómico así como mediante el análisis por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

Resultados: En ambos pacientes se demostró una reducción severa de disferlina comparable tanto en músculo esquelético como en PBM. La expresión del mRNA de disferlina se vio significativamente reducida. Se detectó una mutación nueva en el exón 47 (c.5289G>C) en el gen de la disferlina en estado heterocigoto, que causa un cambio aminoacídico (p.Glu1763Asp). No se detectó deleción ni duplicación alguna mediante el análisis por MLPA.

Conclusiones: Las anomalías en disferlina y/o en el mRNA de disferlina son un criterio diagnóstico de disferlinopatía cuando el análisis mutacional detecta solamente una mutación en un único alelo. El análisis del mRNA de disferlina puede ser útil para distinguir heterocigotos sintomáticos de pacientes.

SHORT COMMUNICATION

Abnormal expression of dysferlin in skeletal muscle and monocytes supports primary dysferlinopathy in patients with one mutated allele

M. Meznaric^a, L. Gonzalez-Quereda^b, E. Gallardo^c, N. de Luna^c, P. Gallano^b, M. Fanin^d, C. Angelini^d, B. Peterlin^e and J. Zidar^f

^aInstitute of Anatomy, Medical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia; ^bServei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma, Barcelona, CIBERER U705, Spain; ^cServei de Neurologia i Laboratori de Neurologia Experimental, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma, Barcelona, CIBERNED, Spain; ^dDepartment of Neurosciences, University of Padua, Padua, Italy; ^eInstitute of Human Genetics, University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia; and ^fInstitute of Clinical Neurophysiology, University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia

Keywords:

dysferlin mRNA, dysferlinopathy, heterozygous state, Miyoshi myopathy

Received 19 June 2010

Accepted 13 September 2010

Background: In some cases, a definitive confirmation of dysferlinopathy cannot be achieved by DNA test, because the mutation is detected in one allele only.

Patients and methods: Dysferlin expression in skeletal muscle and peripheral blood monocytes (PBM) was studied by Western blot in two unrelated adult patients. The comparative C_T method ($\Delta\Delta C_T$) was used to calculate relative changes in dysferlin mRNA determined from real-time quantitative PCR experiments. The dysferlin gene was studied by direct sequencing of cDNA and genomic DNA and by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis.

Results: A comparable severe reduction in dysferlin was demonstrated in both skeletal muscle and PBM. The expression of dysferlin mRNA was significantly reduced. A novel mutation in exon 47 (c.5289G>C) of the dysferlin gene in the heterozygous state, causing an amino acid change (p.Glu1763Asp), was detected in both patients. The MLPA analysis did not reveal any deletion or duplication.

Conclusions: Dysferlin and/or dysferlin mRNA abnormalities are diagnostic for dysferlinopathy when mutational analysis detects a mutation in one allele only. Analysis of dysferlin mRNA can be helpful for distinguishing symptomatic heterozygotes from such patients.

Introduction

In autosomal recessive muscular dystrophies owing to dysferlin deficiency (dysferlinopathies), dysferlin absence or reduction can be demonstrated in skeletal muscle [1,2] and/or in peripheral blood monocytes (PBM) [3,4]. Dysferlin abnormalities were also demonstrated in symptomatic and asymptomatic definite heterozygotes for dysferlin gene mutation [5–7] as well as in a symptomatic heterozygote, the sister of the patient with LGMD2B [5].

In 12% [4] – 32% [8] of patients with dysferlin abnormalities in skeletal muscle, mutational analysis

did not detect mutation in both alleles. To further characterize the disease in such patients, we performed Western blot of dysferlin on PBM and quantified dysferlin mRNA.

Patients and methods

The research protocol was approved by the National Medical Ethics Committee of the Republic of Slovenia (Number 150/09/09).

Patient 1 was a 32-year-old female patient. In addition to proximal weakness of the lower limbs, the patient had been unable to walk on her toes and heels since the age of 18 years. Her brother, aged 23 years, had asymptomatic hyperCKemia. Patient 2 was a sporadic 41-year-old male patient who had previously been active in sports and presented in late adolescence with distal myopathy, first affecting the calves and becoming

Correspondence: M. Meznaric, Institute of Anatomy, Medical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia (tel.: +386 1 543 7307; fax: +386 1 543 7301; e-mail: marija.meznaric@mf.uni-lj.si).

wheelchair dependent within 19 years. Both patients have high CK activity. Electromyography revealed myopathic changes. The parents of neither patient had muscle weakness.

Western blot analysis of dysferlin in muscle [1] and PBM [3] was performed as described, except that PBM were separated using BD Vacutainer CPT tubes. Direct sequencing of cDNA and genomic DNA and relative quantification of dysferlin mRNA by comparative C_T method ($\Delta\Delta C_T$) were used [4,5]. Deletions/duplications in the dysferlin gene were screened by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis [9], using a SALSA MLPA P268-DYSF kit (MRC Holland, Amsterdam). Direct sequencing [4] of exon 47 of the dysferlin gene was also performed in 200 control chromosomes from 100 Slovenian blood donors.

Results

Dysferlin in muscle was reduced to 15% in patient 1 and was not detectable in patient 2; dysferlin in PBM was reduced to 7% in patient 1 and 2% in patient 2.

Mutational analysis of dysferlin cDNA, obtained from dysferlin mRNA of PBM, revealed a novel point mutation in the heterozygote state in exon 47 in both patients and was confirmed by the sequencing of exon 47 of total genomic DNA. The mutation consisted of a Guanine to Cytosine change in the 5289 nucleotide position (c.5289G>C), which indicates a glutaminic acid to asparagine replacement in codon 1763 (p.Glu1763Asp) of dysferlin. This mutation was not detected in 200 control chromosomes from 100 Slovenian healthy individuals. The mother, grandfather and brother of patient 1 were heterozygotes for the novel mutation, which was not detected in the father of patient 2; his mother's DNA was not available. MLPA analysis of the dysferlin gene did not reveal any deletion or duplication.

Additionally, real-time PCR quantification showed reduced levels of dysferlin mRNA in both patients (Fig. 1).

Discussion

Our patients differ from described symptomatic heterozygotes [5–7]: the age of onset was much earlier, and muscle weakness and biochemical abnormalities were much more severe in our patients. Interestingly, when dysferlin mRNA levels were analysed in symptomatic heterozygotes, they showed normal expression [5]. Conversely, the expression of dysferlin mRNA in our patients was significantly reduced. These data suggest that in cases in which only *one mutation is found, analysis of dysferlin mRNA* can be helpful

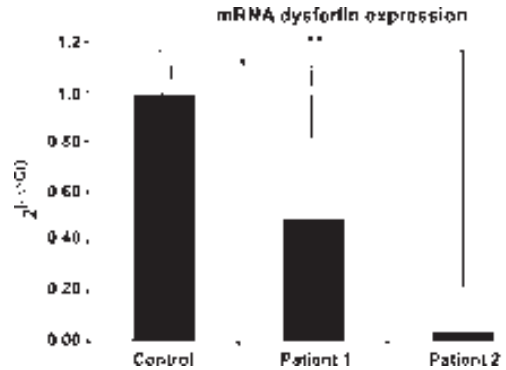


Figure 1 Real-time quantitative PCR data from peripheral blood monocytes. Dysferlin mRNA is significantly reduced in patient 1 and 2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

for distinguishing symptomatic heterozygotes from patients.

Dysferlin mutations in Slovenian patients have not so far been described. The mutation detected in our patients in exon 47 (c.5289G>C), in the heterozygous state, is a novel one, not reported in the Leiden open variants database [10]. Point mutations, duplications and deletions in the second dysferlin allele have been excluded, but not mutations in the non-coding DNA sequence, which may have an etiopathogenic role [11]. Autosomal dominant inheritance (with variable penetrance) has never been reported in dysferlinopathies.

Dysferlin mRNA abnormalities in our patients suggest that our patients are indeed compound heterozygotes in whom we were not able to demonstrate the mutation in the second allele. Monitoring of dysferlin mRNA might also be useful in therapeutic trials for dysferlinopathies [12].

In conclusion, dysferlin and/or *dysferlin mRNA* abnormalities are diagnostic for dysferlinopathy when mutational analysis detects a mutation in one allele only. Analysis of dysferlin mRNA can be helpful for distinguishing symptomatic heterozygotes from such patients.

Acknowledgements

Muscle biopsies were provided by the Neuromuscular Tissue Bank of the University of Ljubljana, a partner in the Eurobiobank/TREAT-NMD network (www.eurobiobank.org). The study was supported by a grant from the Fondo de Investigacion Sanitaria FIS06/0455 and 09/1944 to EG, a grant from FIS08/0347 and CIBERER U705 to PG, Telethon grant #GTB07001 and Eurobiobank/TREAT-NMD to CA, Slovenian Research Agency grants J3-2377 to BP and P3-043 to MM.

References

1. Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH Jr, Angelini C. Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology* 2001; **56**: 660–665.
2. Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, *et al.* Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. *J Mol Neurosci* 2001; **17**: 71–80.
3. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, de Luna N, Illa I, Brown RH Jr. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 2002; **51**: 129–133.
4. de Luna N, Freixas A, Gallano P, *et al.* Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscular Disord* 2007; **17**: 69–76.
5. Illa I, de Luna N, Dominguez-Perles R, *et al.* Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 2007; **68**: 1284–1289.
6. Fuschillo S, Torrente Y, Balzano G. Severe respiratory and skeletal muscles involvement in a carrier of dysferlinopathy with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 2010; **55**: 1091–1093.
7. Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C. Muscle protein analysis in the detection of heterozygotes for recessive limb girdle muscular dystrophy type 2B and 2E. *Neuromuscular Disord* 2006; **16**: 792–799.
8. Nguyen K, Bassez G, Bernard R, *et al.* Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum Mutat* 2005; **26**: 165.
9. MRC-Holland. <http://www.mlpa.com>. (accessed 17/06/2010)
10. den Dunnen J. <http://www.dmd.nl>. (accessed 19/06/2010)
11. Gal A, Siska E, Nagy Z, Karpati G, Molnar MJ. Challenges for the genetic screening in dysferlin deficiency – report of an instructive case and review of the literature. *Clin Neuropathol* 2008; **27**: 289–294.
12. Aartsma-Rus A, Singh K, Fokkema I, *et al.* Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies? *Eur J Hum Genet* 2010; **18**: 889–894.

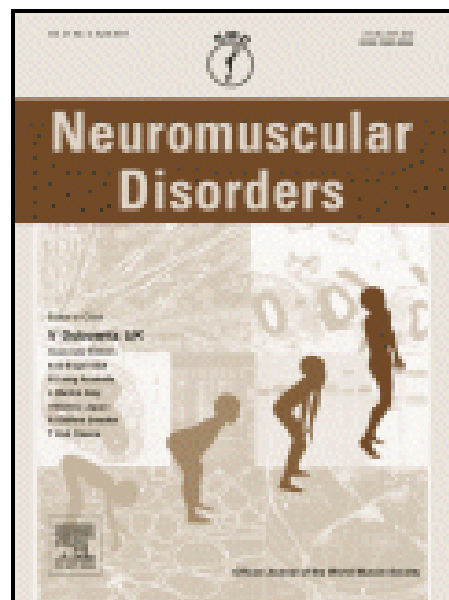
4.3 - Un nuevo fenotipo de disferlinopatía con inicio congénito.

A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset.

Paradas C, González-Quereda L, de Luna N, Gallardo E, García-Consuegra I, Gómez H, Cabello A, Illa I, Gallano P.

*Authors Paradas C and González-Quereda L contributed equally to this work.

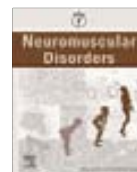
Neuromuscul Disord. 2009 Jan;19(1):21-5. Epub 2008 Dec 11.
doi:10.1016/j.nmd.2008.09.015



Resumen:

Se describen dos pacientes que presentan una enfermedad neuromuscular congénita con un nuevo fenotipo de disferlinopatía.

Ambos pacientes mostraban al nacer debilidad proximal en la cintura pélvica y en los músculos flexores del cuello. Es destacable la presencia de niveles normales de CK durante los primeros años de vida. La resonancia magnética no mostró anomalías pero las secuencias STIR (*Short Time Inversion Recovery*) mostraron un marcado mioedema en el *gastrocnemius* y en los músculos isquiotibiales a la edad de 5 años. La biopsia muscular mostró un patrón distrófico moderado y ausencia de disferlina. El análisis del gen de la disferlina (*DYSF*) mostró una mutación p.Ala927LeufsX21 en estado homocigoto en ambos pacientes. Este nuevo fenotipo amplía el espectro clínico de las disferlinopatías.



Case report

A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset

C. Paradas^{a,1}, L. González-Quereda^{b,c,1}, N. De Luna^{d,e}, E. Gallardo^{d,e}, I. García-Consuegra^f, H. Gómez^g, A. Cabello^f, I. Illa^{d,e}, P. Gallano^{b,c,*}

^a Department of Neurology, Hospital de Valme, Sevilla, Spain

^b Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), C/Pare Claret 167, 08025, Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain

^d Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

^f Neuropathology Section, Department of Pathology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^g Department of Pediatrics, Complejo Hospitalario Zafra-Llerena, Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2008

Received in revised form 27 August 2008

Accepted 25 September 2008

Keywords:

Dysferlin

Congenital muscular dystrophy

LGMD2B

ABSTRACT

We report two patients with a new phenotype of dysferlinopathy presenting as congenital muscular disease. Both patients showed weakness in proximal lower limbs and neck flexor muscles at birth. The presence of normal CK levels during the first years should be noted. Initial MRI showed no abnormalities but short-time-inversion-recovery (STIR) sequences revealed a striking myoedema in gastrocnemius and hamstring muscles at the age of 5. Muscle biopsy showed mild dystrophic features and the absence of dysferlin. Dysferlin gene (*DYSF*) analysis revealed a p.Ala927LeufsX21 mutation in a homozygous state in both siblings. This new phenotype widens the clinical spectrum of dysferlin myopathies.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dysferlin myopathies are autosomal recessive muscular dystrophies caused by mutations in the *DYSF* [1]. Different phenotypes have been described including limb girdle muscular dystrophy 2B [2], Miyoshi myopathy [3], distal anterior compartment myopathy [4] hyperCKemia, proximo-distal pattern and pseudometabolic disease [5].

Identical mutations in *DYSF* have been associated with different phenotypes but the reason for this clinical heterogeneity remains unclear [6,7]. The largest series of dysferlinopathy patients define the second decade of life as the most common period of onset of the disease [3,8]. The youngest symptomatic patient reported was 10 years old [9]. Young subjects with early onset of the disease or in pre-symptomatic stage have been identified by CK elevation or MRI findings [10,11]. No congenital cases have been associated with mutations in *DYSF*.

This study describes a non-consanguineous family with two affected siblings presenting a congenital onset associated with a homozygous frameshift mutation in *DYSF*.

* Corresponding author. Address: Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), C/Pare Claret 167, 08025, Barcelona, Spain. Tel.: +34 932919361; fax: +34 932919494.

E-mail address: pgallano@santpau.cat (P. Gallano).

¹ These authors are contributed equally to this work.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

We report two caucasian patients, brother and sister, from a family without recognized consanguinity, with no familiar history of neuromuscular disease. The parents were from the same small village of the South of Spain. Neurological examination and functional tests were performed.

2.2. Magnetic resonance imaging (MRI) protocol

We performed a MRI study in both patients and in all the mutation carriers in the family using a 1.5 T scanner (Magnetom; Siemens, Erlangen, Germany). MRI sections were obtained from axial and coronal planes of pelvic, thigh and leg muscles, using a T1-weighted spin echo sequence (TR = 700; TE = 30) and a STIR sequence (TR = 3500; TE = 60; TI = 150) with a slice thickness of 10–12 mm. The scans were examined to detect abnormalities in muscle bulk and signal intensity within the different muscles.

2.3. Muscle biopsy

A muscle biopsy of *rectus femoris* in patient 1 was processed for histochemistry and immunohistochemistry using monoclonal antibodies to dystrophin (DYS1, DYS2 and DYS3), α , β , γ , and δ

sarcoglycans, merosin 300 kDa, dysferlin (Novocastra, Newcastle, UK), merosin 80 kDa (Chemicon, Temecula, USA) and α -dystroglycan (Upstate, Temecula, USA) as previously described. Dysferlin immunoblot analysis was performed twice using the same monoclonal antibody. The amount of protein was quantified as the percentage of the control muscle and the sample myosin ratio by a densitometry technique, using ImageJ, 1.38 \times (NIH, USA).

2.4. Immunoblot analysis of peripheral blood monocytes (PBM)

Dysferlin expression in PBM was studied in patient 1 and eleven relatives. PBM isolation was performed as previously described [12,13]. Immunoblot was performed using monoclonal antibodies to dysferlin (NCL-Hamlet, Novocastra) and to β -actin (Sigma, Saint Louis, USA). IRDye[®]800 conjugate goat anti-mouse was used as a secondary antibody (Licor, Lincoln, Nebraska, USA). Fluorescent bands corresponding to dysferlin and β -actin were acquired and analyzed using an Odyssey Infrared Imaging System and software Odyssey 2.1 (Licor). Immunoblot analysis was performed at least twice for each sample.

2.5. Genetic analysis

DYSF molecular analysis was performed in cDNA and gDNA in all members of the family. The RNA was extracted from PBM using Ultraspec (Biotech Laboratories, Houston, USA) and was retrotranscribed with the oligo(dT) primer technique (Invitrogen, Carlsbad, USA). We amplified and direct sequenced the entire dysferlin cDNA using 14 sets of oligonucleotide primers covering the 55 exons as previously described [12]. The identified mutation was confirmed in the gDNA.

Fukutin-related protein (*FKRP*) and Caveolin-3 (*CAV-3*) genes were sequenced because of their involvement in early onset muscular dystrophies [14,15].

In order to establish some familiar relationship between the progenitors, DNA samples from both patients and their relatives underwent genotypic analysis with four intragenic and extragenic microsatellite markers (D2S292, D2S291, D2S286, D2S443) using the primers listed in the Genome Database.

3. Results

3.1. Neurological examination

The propositus (patient 1) is a 5-year-old boy who was evaluated because of weakness in the legs. No control over his head and generalized hypotonia were observed since the age of 2-months. All motor milestone acquisitions were delayed and he was able to walk independently at 19 months. He had difficulty walking, running and climbing stairs. He was able to stand up but needed support on his thighs. No significant worsening was detected in motor development after the age of 4. Neurological examination at the age of 5 showed neck flexor and pelvic muscle weakness with Gowers' sign. He ran and walked with Trendelenburg's sign and he was able to stand on his tiptoes (Fig. 1A). The serum CK level was normal (100–200 U/l, $N < 200$) before the age of 3, and was markedly raised (1262 U/l) after this age.

Patient 2 is a 2-year-old girl, with hypotonia at birth and faint weeping. She had difficulty controlling her head. The motor development was delayed. She started to walk at 21 months, always looking for external support, and was unable to stand up independently. Neurological examination at the age of 2 showed proximal weakness. The head fell backward as



Fig. 1. No difficulty standing on tiptoes (A) and Gower's sign (B) in patient 1. No control of the head (C) and proximal weakness (D) in patient 2.

the body was pulled forward, corroborating neck flexor muscle weakness (Fig. 1B). There were no abnormalities in muscle bulk. The CK levels were slightly elevated (241 U/l).

In both patients, the arms, facial and bulbar motor functions were preserved. There were no skeletal deformities, rigid spine, facial dimorphism or sensory abnormalities. All reflexes were normal.

None of the heterozygous family members showed any sign of neuromuscular disease.

3.2. MRI findings

In patient 1 a MRI was performed at the age of 5. The T1-weighted sequences showed no alterations in muscle bulk or fatty replacement. The MRI STIR sequences showed myoedema, which was limited to hamstrings and the medial gastrocnemius muscles with a bilateral and symmetric distribution (Fig. 2).

In patient 2 a MRI was performed at the age of 2. The T1-weighted and STIR sequences of pelvic, thigh and leg muscles were normal.

The MRI imaging showed no abnormalities in the asymptomatic carriers.

3.3. Muscle biopsy

Muscle biopsy showed mild dystrophic features including fiber-size variability, central nuclei, splitting, slightly increased endomysial and perimysial connective tissue and some necrotic

fibers. No inflammatory features were observed. Dysferlin expression was absent in the sarcolemma of all muscle fibers confirmed by immunoblot analysis (Fig. 3). The expression of dystrophin, sarcoglycans, merosin and α -dystroglycan was normal.

3.4. Immunoblot analysis of PBM

The quantification of dysferlin expression calculated as dysferlin/ β -actin, showed a 97% dysferlin reduction in patient III:3. Relatives I:1, II:2, II:3, II:4 and II:8 showed a reduction of dysferlin that varied from 68% to 40% and relatives I:2, II:1, II:5, II:6, II:7 and I:4 showed normal levels of dysferlin (reduction \leq 10%) (Fig. 3).

3.5. Genetic analysis

We identified a homozygous frameshift mutation p.Ala927LeufsX21 in both siblings which was previously described [11]. The subjects I:1, II:2, II:3, II:4, II:8 were heterozygous for the mutation (Fig. 3). This mutation consisted of a single G base deletion at nucleotide position 2779, in exon 26, causing a premature stop codon at mRNA level. The remaining family members had no mutations in *DYSF* gene. No mutations were found in *FKRP* and *CAV-3* genes.

Both patients were homozygous for the tested markers (D2S292, D2S291, D2S286, D2S443) and shared the same haplotype with all the mutation carriers as well.

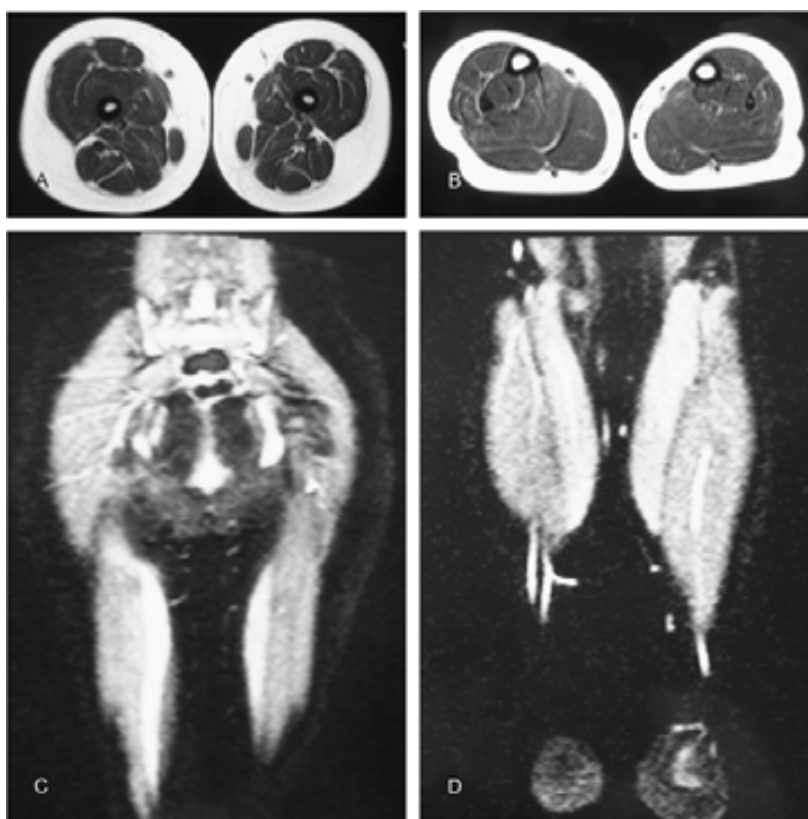


Fig. 2. The T1 MRI sequences in patient 1 showed no fatty degeneration (A and B) while STIR MRI sequences showed symmetric myoedema on hamstring (C) and gastrocnemius muscles (D).

4. Discussion

We describe a new phenotype of dysferlinopathy resembling congenital muscular dystrophies (CMD) caused by a mutation in *DYSF*. This new phenotype is characterized by a postnatal hypotonia, motor development delay and marked weakness of pelvic and neck flexor muscles. There is no evidence of involvement of other organ systems unlike many CMD. Although our patients are only 2- and 5-year-old, the disease course seems to be slowly progressive since the patients acquired motor tasks. It should be pointed out that serum CK level was normal until the age of 3, increasing 6 times after this age. This finding represents a basic difference with adult phenotypes and must be considered for the screening of dysferlinopathies at pre-symptomatic stage. MRI of patient 2 was normal at the age of 2. However, STIR sequences in patient 1 at the age of 5 demonstrated myoedema with no fatty replacement, affecting hamstrings and medial gastrocnemius. These findings resemble to those described in adult pre-symptomatic dysferlinopathies [10]. This pattern of muscle involvement, not previously reported in other CMD, is characteristic of this new phenotype. STIR sequences may become a useful tool to monitor the efficacy of future treatments.

CMD and congenital myopathies are the main hereditary muscular diseases that can lead to muscle weakness from birth, characterized by immunohistochemistry abnormalities in the muscle biopsy and the clinical course [16,17]. Some genes like *FKRP*, *COL-VI* or *CAV-3* are associated with both congenital and adult onset dystrophies [15,18]. However, no congenital forms of dysferlin-

opathy have been previously reported. We reasonably excluded the possibility of a double-trouble since the rest of immunohistochemical and molecular studies were normal and, the phenotype of our patients did not share the characteristic features of other well defined CMD related to defects in alpha-glycosylation or to other genes.

The fact that the typical onset of dysferlinopathies is around the second decade of life could be explained by progressive muscle degeneration due to defective sarcolemma repair [19]. In our patients no inflammation and no specific structural muscle alterations were observed except for mild dystrophic changes. These features probably reflect that muscle degeneration in dysferlinopathies become significant several years after birth with increasing muscular activity, especially after walk acquisition, and it could explain the normal CK level at birth in our patients. The congenital onset in dysferlinopathies never before has been reported, and it could be attributed to genetic modifier factors that may be responsible for the phenotype variability of this muscular dystrophy [20].

The *DYSF* mutation found in our patients was in a homozygous state, in spite of no recognized consanguinity between the progenitors. Nevertheless, the possibility of an ancient common ancestor was not possible to rule out in a village as small as that they came from, and the result of the haplotype study suggested an ancient consanguineous relationship. The p.Ala927LeufsX21 mutation has been previously described and associated with different phenotypes, including asymptomatic hyperCKemia at second decade [5,11]. This homozygous mutation in our patients results in an absence of dysferlin expression. The heterozygous relative carriers

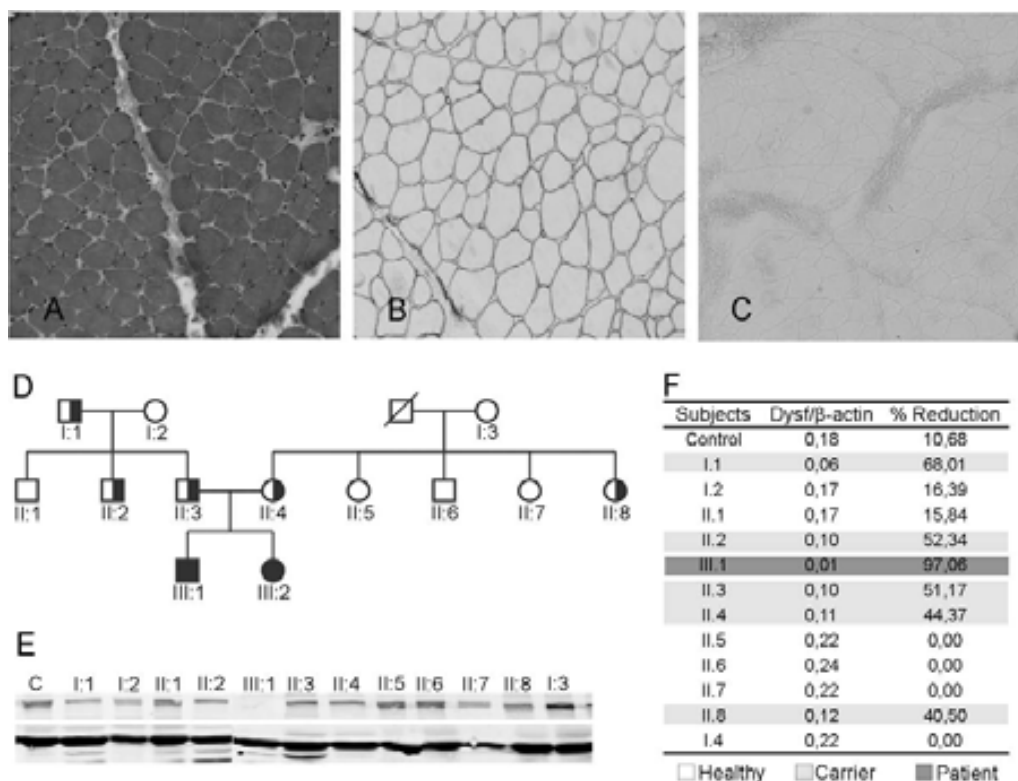


Fig. 3. (A) H&E staining of muscle biopsy from patient 1 shows mild dystrophic changes. (B) Integrity of sarcolemma is demonstrated by normal spectrin staining. (C) Labeling with the anti-dysferlin monoclonal antibody Hamlet1 is completely negative in all muscle fibers in patient 1. (D) Pedigree. Propositus is indicated as III:1 (filled square) and III:2 corresponds to the affected sister (filled circle). Open squares and circles denote healthy relatives; half-filled squares and circles indicate carriers of one mutation in *DYSF*. (E) Western-blot of PBM. Upper panel corresponds to dysferlin. Lower panel shows β -actin expression used as loading control. (F) Quantification data of dysferlin expression obtained using the software Odyssey 2.1.

showed reduced levels of dysferlin and even the carriers with a severe reduction in the expression had no clinical symptoms, suggesting that low expression of dysferlin could be enough to prevent muscle pathology and clinical symptoms. This finding is important in the development of future therapeutic approaches based on the restoration of dysferlin expression levels in patients with a dysferlinopathy.

In conclusion, the two patients described in this report constitute a new phenotype of dysferlinopathy that resembles CMD and widens the clinical spectrum of dysferlin myopathy, adding new data on the natural history of the disease.

Acknowledgment

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria PI06/0455, PI05/2457 and CIBERER U-705.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.nmd.2008.09.015](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.09.015).

References

- [1] Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20(1):31–6.
- [2] Passos-Bueno MR, Bashir R, Moreira ES, et al. Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD2B) in three families allows refinement of the candidate region. *Genomics* 1995;27(1):192–5.
- [3] Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* 1986;109(Pt 1):31–54.
- [4] Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49(1):130–4.
- [5] Nguyen K, Bassez G, Krahn M, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 2007;64(8):1176–82.
- [6] Argov Z, Sadeh M, Mazor K, et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain* 2000;123(Pt 6):1229–37.
- [7] Vilchez JJ, Gallano P, Gallardo E, et al. Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol* 2005;62(8):1256–9.
- [8] Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2008;29(2):258–66.
- [9] Cupler EJ, Bohlega S, Hessler R, McLean D, Stigsby B, Ahmad J. Miyoshi myopathy in Saudi Arabia: clinical, electrophysiological, histopathological and radiological features. *Neuromuscul Disord* 1998;8(5):321–6.
- [10] Brummer D, Walter MC, Palmbach M, et al. Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations. *Acta Myol* 2005;24(1):6–16.
- [11] Leshinsky-Silver E, Argov Z, Rozenboim L, et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: a frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscul Disord* 2007;17(11–12):950–4.
- [12] Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R, et al. Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 2007;68(16):1284–9.
- [13] De Luna N, Freixas A, Gallano P, et al. Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord* 2007;17(1):69–76.
- [14] Brockington M, Yuva Y, Prandini P, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001;10(25):2851–9.
- [15] Madrid RE, Kubisch C, Hays AP. Early-onset toe walking in rippling muscle disease due to a new caveolin-3 gene mutation. *Neurology* 2005;65(8):1301–3.
- [16] Goebel HH. Congenital myopathies in the new millennium. *J Child Neurol* 2005;20(2):94–101.
- [17] Laing NG. Congenital myopathies. *Curr Opin Neurol* 2007;20(5):583–9.
- [18] Mercuri E, Cini C, Pichiecchio A, et al. Muscle magnetic resonance imaging in patients with congenital muscular dystrophy and Ullrich phenotype. *Neuromuscul Disord* 2003;13(7–8):554–8.
- [19] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423(6936):168–72.
- [20] Heydemann A, Doherty KR, McNally EM. Genetic modifiers of muscular dystrophy: implications for therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772(2):216–28.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1- Espectro mutacional del gen *DYSF*

A continuación se comentan los resultados obtenidos en el análisis molecular del gen *DYSF* en las familias estudiadas afectadas de disferlinopatía.

Si analizamos el tipo de las 56 mutaciones diferentes identificadas observamos que veintiséis eran de tipo *missense*, 7 de tipo *nonsense*, 11 pequeñas inserciones o deleciones, 2 deleciones exónicas detectadas mediante la técnica de *MLPA* y las 10 restantes fueron mutaciones que alteraban el correcto *splicing* del gen. De las 56 mutaciones identificadas 32 de ellas no habían sido descritas anteriormente en la literatura.

Las mutaciones identificadas han aparecido en estado homocigoto en 28 casos índice (40%) y en estado heterocigoto en 21 de ellos (30%). Se ha detectado la presencia de una única mutación en 15 casos índice (21,4%) y no se ha detectado mutación alguna en 6 casos (8,6%) a pesar de presentar reducción o ausencia de la proteína en el estudio inmunohistoquímico y/o Western Blot.

En cuanto a su distribución, las mutaciones se encuentran localizadas a lo largo de toda la secuencia del gen, sin identificarse ningún *hotspot* (figura 11). A pesar de no existir una mutación particularmente prevalente, los cambios c.5979dupA (p.Glu1994ArgfsX3) en el exón 53 y c.3191_3196dup (p.Ala1064_Glu1065dup) en el exón 30, aparecen repetidamente en nuestra población (5 y 6 veces, respectivamente).

DISCUSIÓN

Ésta última, c.3191_3196dup podría considerarse la mutación más frecuente en la serie de pacientes españoles con disferlinopatía (ver tabla 7).

Tabla 7. Mutaciones diferentes en el gen *DYSF* en población española.

Nomenclatura en cdna	Nomenclatura en proteína	Exón	Vista	Tipo de mutación	Dominio proteico	Antes descrita
c.154T>C	p.Trp52Arg	3		<i>Missense</i>	C2A	sí
c.509C>A	p.Ala170Glu	6		<i>Missense</i>	-	no
c.593_594dup	p.Gly199ProfsX29	6		Pequeñas del/dup	-	sí
c.701G>A	p.Gly234Glu	7		<i>Missense</i>	C2B	sí
c.895G>C	p.Gly299Arg	9		<i>Missense</i>	C2B	no
c.1020C>A	p.Ser340Arg	11	3	<i>Missense</i>	-	sí
c.1120G>C	p.Val374Leu	12		<i>Missense</i>	-	no
c.1168G>A	p.Asp390Asn	12		<i>Missense</i>	C2C	sí
c.1180+5G>C	?	12i	2	<i>splicing</i>		no
c.1353+1G>A	p.Phe452MetfsX39	14		<i>splicing</i>	C2C	sí
c.1357C>T	p.Pro453Ser	15		<i>Missense</i>	C2C	sí
c.1555G>A (r.1523_1556del)	p.Leu508CysfsX108	18	3	<i>splicing</i>	-	sí
c.1639-6T>A	?	18i		<i>splicing</i>	-	sí
c.1984_1994del	p.Ser662GlyfsX6	21		Pequeñas del/dup	-	sí
c.2055+1G>A	?	21i		<i>splicing</i>		sí
c.2064_2068dup	p.Glu690AlafsX8	22		pequeñas del/dup	-	sí
c.2163-2A>G	?	22i		<i>splicing</i>		sí
c.2500A>G	p.Ile834Val	24		<i>Missense</i>	-	no

c.2779delG	p.Ala927Leu fsX21	26	2	Pequeñas del/dup	DysFN	no
c.2813T>G	p.Leu938Arg	27		<i>Missense</i>	-	sí
c.2858dupT	p.Phe954Val fsX2	27		Pequeñas del/dup	DysfN	no
c.2875C>T	p.Arg959Trp	27	3	<i>Missense</i>	DysfN	no
c.3116G>T	p.Arg1039Leu	29		<i>Missense</i>	DysfC	sí
c.3112C>T	p.Arg1038X	29		<i>Stop</i>	DysfC	no
c.3130C>A	p.Arg1044Ser	29	2	<i>Missense</i>	DysfC	sí
c.3191_3196dup	p.Ala1064_ Glu1065dup	30	6	Pequeñas del/dup	-	no
c.3181delC	p.Gln1061Arg fsX59	30	3	Pequeñas del/dup	-	no
c.3805G>T	p.Glu1269X	34	4	<i>Stop</i>	-	sí
c.3892A>G	p.Ile1298Val	36		<i>Missense</i>	-	no
c.3967C>T	p.Gln1323X	37		<i>Stop</i>	-	no
c.4003G>A	p.Glu1335Lys	37	2	<i>Missense</i>	-	no
c.3992G>T	p.Arg1331Leu	37	2	<i>Missense</i>	-	no
c.4253G>A	p.Gly1418Asp	39		<i>Missense</i>	C2E	no
c.4334-2A>G	?	39i		<i>splicing</i>		sí
c.4497delT	p.Phe1499Leu fsX3	41		pequeñas del/dup	-	no
c.4882G>A	p.Gly1628Arg	44		<i>Missense</i>	C2F	sí
c.4969G>A	p.Glu1657Lys	45		<i>Missense</i>	C2F	sí
c.5077C>T	p.Arg1693Trp	46		<i>Missense</i>	-	no
c.5194G>T	p.Glu1732X	46		<i>Stop</i>	-	no
c.5159delG	p.Arg1720Leu fsX2	46		pequeñas del/dup	-	sí
c.5289G>C	p.Glu1763Asp	47	2	<i>Missense</i>	-	sí
c.5302C>T	p.Arg1768Trp	47	2	<i>Missense</i>	-	no
c.5323C>T	p.Gln1775X	47		<i>Stop</i>	-	sí

DISCUSIÓN

c.5525+3A>G	p.Arg1810_ Gly1842 delinsSer	49		<i>splicing</i>	C2G	sí
c.5525+2T>A	?	49i		<i>splicing</i>		sí
c.5572G>A	p.Asp1858Asn	50		<i>Missense</i>	C2G	sí
c.5667+1G>A	?	50		<i>splicing</i>		sí
c.5594delG	p.Gly1865Ala fsX101	50	2	pequeñas del/dup	C2G	no
c.5713C>T	p.Arg1905X	51	5	<i>Stop</i>	C2G	sí
c.5966G>A	p.Trp1989X	53		<i>Stop</i>	-	sí
c.5952G>C	p.Lys1984Asn	53		<i>Missense</i>	-	sí
c.5979dupA	p.Glu1994Arg fsX3	53	5	Pequeñas del/dup	-	no
c.5999G>A	p.Arg2000Gln	53		<i>Missense</i>	-	no
c.6124C>T	p.Arg2042Cys	54		<i>Missense</i>	-	no
deleción exón 23 y 24				Deleción MLPA		sí
deleción exón 4				deleción MLPA		sí

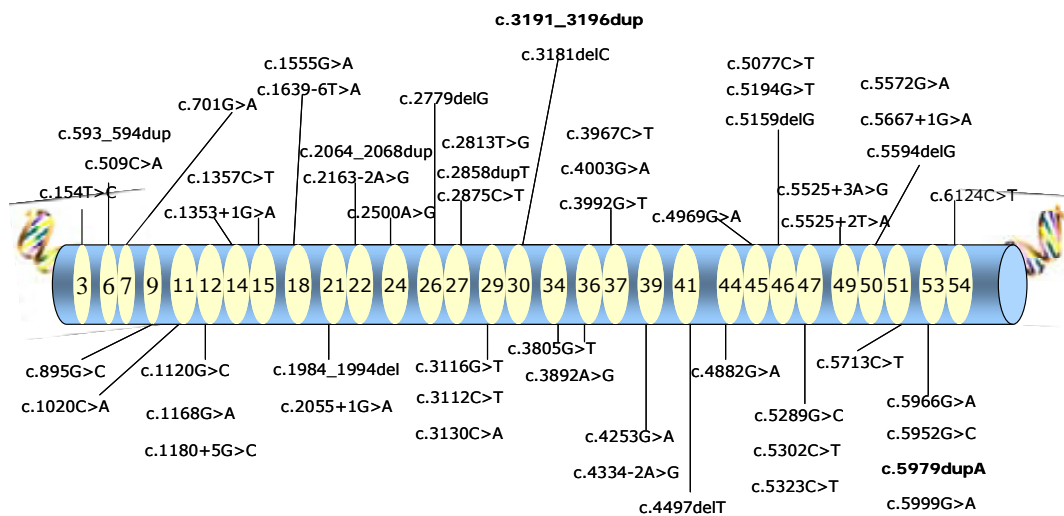


Figura 11. Distribución de las mutaciones a lo largo de *DYSF*.

5.1.1- Relación genotipo-fenotipo

Las mutaciones se distribuyen a lo largo de toda la secuencia del gen sin observarse *hotspots*. Si consideramos los dominios proteicos afectados no se observa particularidad alguna que permita establecer una relación genotipo-fenotipo. Algunas mutaciones afectan los dominios de disferlina descritos: C2, DysFN y DysFC (Figura 12). Los dominios DysFN y DysFC se han observado en proteínas peroxisomales de levaduras, en disferlina y en mioferlina. Actualmente se desconoce su función si bien se postula que podrían tener un papel en la señalización celular (<http://smart.embl.de/>). Respecto a los dominios C2, se sabe que el dominio C2A une fosfolípidos de manera dependiente de calcio. El resto de dominios C2 también une fosfolípidos pero de forma menos eficaz y sin necesidad de la presencia calcio [Therrien *et al*, 2009]. Asimismo, hemos identificado mutaciones en regiones del gen que no codifican para ninguno de los dominios citados, siendo igualmente patológicas y sin diferencias fenotípicas

DISCUSIÓN

respecto a las mutaciones localizadas en algún dominio C2, DysFN ó DysFC. (Figura 12)

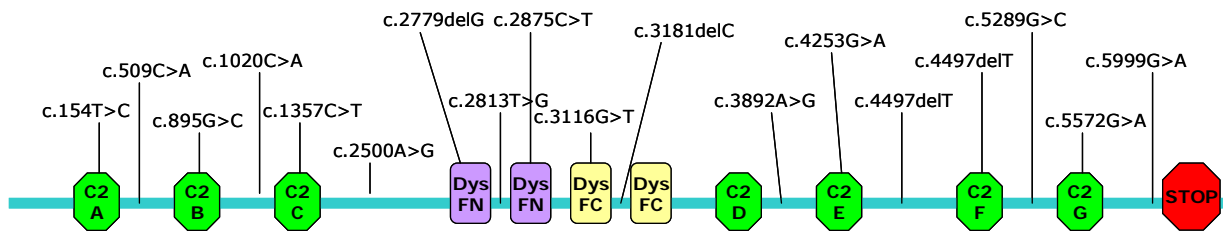


Figura 12. Distribución de las mutaciones respecto a los dominios proteicos de disferlina.

SMART: http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.plDomains within *Homo sapiens* protein [DYSF HUMAN](#) (O75923)

5.2- Ventaja del análisis de mRNA vs DNA

Uno de los objetivos de este trabajo era el diseño e implantación de una estrategia diagnóstica del gen *DYSF* debido al elevado número de exones que lo conforman. Anteriormente al análisis del mRNA, el procedimiento para estudiar el gen *DYSF* consistía en secuenciar cada uno de los 55 exones que lo componen, lo que supone una inversión considerable en tiempo y en costes económicos.

La disferlina se localiza mayoritariamente en el sarcolema de las células musculares aunque también se expresa en monocitos [Ho *et al*, 2002]. No se conoce completamente el motivo por el cual una proteína que tiene como principal diana de acción el tejido muscular, se exprese también en monocitos de sangre periférica.

Además, la expresión de disferlina en dichos monocitos correlaciona perfectamente con su expresión en músculo esquelético [Ho *et al*, 2002]. Se cree que esta expresión de disferlina en monocitos estaría relacionada con la actividad macrofagocítica anormalmente elevada que se ha observado en pacientes con disferlinopatía [Nagaraju *et al*, 2008].

La expresión de disferlina en monocitos nos permitió confirmar la transcripción del mRNA en dichas células. Todo ello nos condujo al diseño de un protocolo de análisis mutacional a partir de mRNA procedente de monocitos de sangre total, evitando de este modo la obligatoriedad de acudir a un método invasivo como es la biopsia muscular. Además este método reduce considerablemente el tiempo de estudio del gen ya que mediante la amplificación de 13 fragmentos es posible analizar los 55 exones que lo constituyen. Pero indudablemente la ventaja mayor de este método es la detección de cambios a nivel intrónico y/o exónico que alteran el *splicing* natural del gen y que pasarían desapercibidos mediante el análisis del DNA genómico.

El *splicing* anómalo se observa en las secuencias de mRNA a modo de inserciones de intrones enteros o parte de ellos, o bien de escisiones (*skipping*) completas o parciales de exones. A menudo, estas inserciones y/o deleciones comportan la ruptura de la pauta de lectura. A pesar de que la secuenciación del mRNA es una prueba empírica por sí misma de una alteración en el *splicing*, las mutaciones que lo originan se suelen analizar *in silico* mediante *softwares* especializados como prueba teórica complementaria. *ESEfinder* (*ESE*, del inglés *Exonic Splicing Enhancer*) es un programa informático capaz de identificar

DISCUSIÓN

posibles secuencias potenciadoras de *splicing*. Estas secuencias conforman los sitios de unión para unas proteínas ricas en serina y arginina: SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55, las cuales marcan los exones para que no sean excluidos del mRNA maduro durante el proceso de *splicing* del pre-mRNA. La comparación del análisis de una secuencia mutada con una secuencia normal permite identificar las ganancias o pérdidas de secuencias ESE predichas, las cuales pueden variar el correcto procesamiento del mRNA.

Con la finalidad de ejemplarizar este último punto, comentaremos en detalle la mutación **c.1555G>A** situada en el exón 18. Si observamos esta mutación en DNA genómico, únicamente podemos observar el cambio de una guanina por una adenina en la posición nucleotídica 1555 (Figura13), lo que aparentemente se trataría de una mutación *missense* que se traduciría a un cambio aminoacídico nombrado como **p.Gly519Arg**.

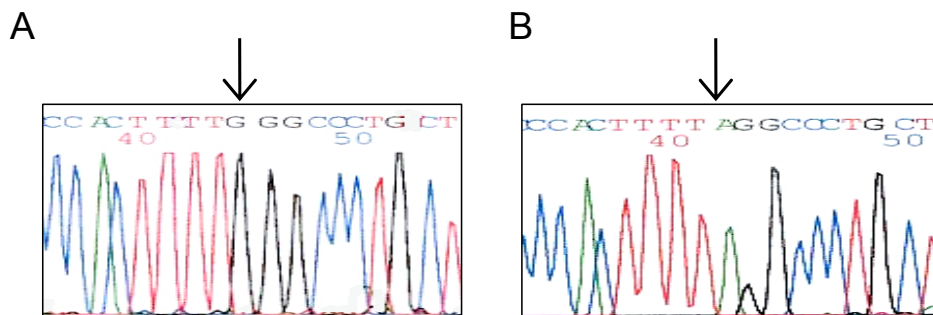


Figura 13. Secuencia del exón 18 en DNA genómico. A control normal, B paciente con la mutación en homocigosis)

Por el contrario el análisis del RNA muestra la pérdida de 34 pares de bases del exón 18 (Figura 14).

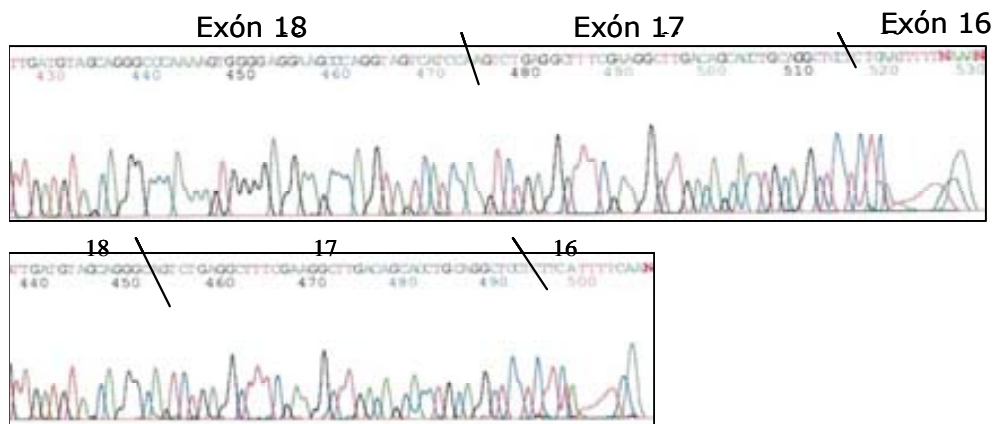


Figura 14. Arriba: secuencia reversa de cDNA de un control normal. Abajo: secuencia reversa del paciente con la mutación c.1555G>A en homocigosis. Se observa como faltan las primeras 34 pares de bases del exón 18.

Este resultado no concuerda con lo esperado en presencia de una mutación *missense*. Lo que aquí ha ocurrido es que el cambio c.1555 G>A ha activado una secuencia aceptora críptica de *splicing* anulándose el sitio aceptor natural. Esto provoca que el corte de *splicing* se sitúe 34 pares de bases (pb) hacia el interior del exón 18, eliminándose estas 34 pb como si formaran parte del intrón (Figura 15). Esto conlleva también una ruptura de la pauta de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro. Finalmente, el cambio nucleotídico c.1555G>A no se traduce a un cambio aminoacídico p.Gly519Arg como era de esperar, sino que comporta el cambio p.Leu508CysfsX108.

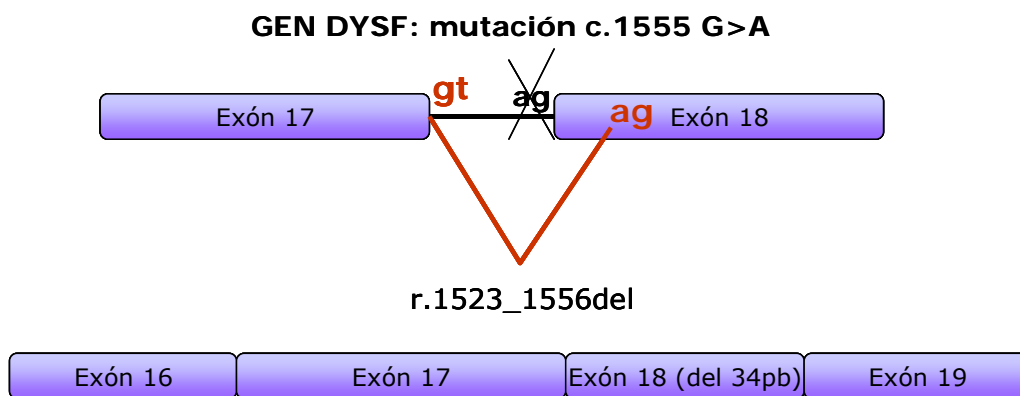


Figura 15. Esquema del *splicing* anormal que ha tenido lugar debido a la mutación c.1555G>A. r: mRNA; gt: donador de *splicing*; ag: aceptor de *splicing*.

El análisis *in silico* del cambio encontrado mediante *ESEfinder* corroboró lo ya observado en mRNA (Figura 16).



Figura 16. Análisis del efecto de la mutación c.1555G>A sobre el *splicing* mediante el programa *ESEfinder*.

Esta alteración del proceso de *splicing* jamás se hubiera observado con el análisis exclusivo del DNA genómico.

Desafortunadamente, las predicciones de *splicing* basadas en las secuencias *ESE* no son definitivas y deben considerarse con precaución. En la siguiente figura se muestra a modo de ejemplo, la mutación **c.1353+1G>A** detectada en la secuenciación del mRNA de un paciente. Se observa como el *splicing* del intrón 14 se ve alterado a causa de la destrucción del sitio donador, y en consecuencia se produce una retención del intrón 14 en el mRNA maduro. Sin embargo, el análisis de esta mutación con el programa *ESEfinder* no predecía alteración alguna en el proceso de *splicing* (Figura 17).

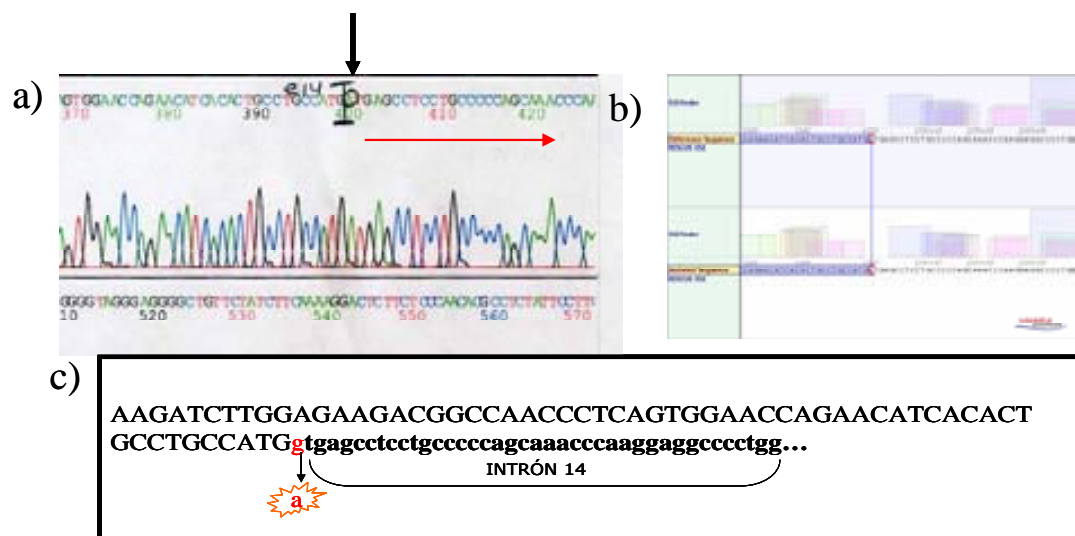


Figura 17. Mutación c.1353+1 G>A. a) Electroferograma. La flecha indica el cambio que se produce en el sitio donador de *splicing*. La flecha roja señala la zona del intrón 14 que queda retenida en el mRNA. b) Análisis de c.1353+1G>A mediante *ESEfinder*. c) Secuencia intrónica que queda transcrita en el mRNA maduro.

5.3- Características específicas en población española

Como ya hemos comentado anteriormente, *DYSF* es un gen muy heterogéneo desde el punto de vista mutacional y sin *hotspots* aparentes. En la siguiente tabla se comparan los porcentajes de las mutaciones identificadas por distintos grupos de estudio [Guglieri *et al*, 2008] [Klinge *et al*, 2010] [Krahn *et al*, 2009a].

Tabla 8. Análisis mutacional en diferentes series de pacientes.

	SERIE ESPAÑOLA (SANT PAU)	SERIE ITALIANA	SERIE FRANCESA	SERIE INGLESA
MÉTODO ESTUDIO	Secuenciación RNA y posterior confirmación en DNA	Secuenciación 55 exones en DNA	Screening por DHPLC y secuenciación de variantes	Secuenciación 55 exones en DNA
TAMAÑO MUESTRA	n= 70	n= 37	n= 134	n= 32
2 MUTACIONES	70 %	62,2 %	66,4 %	89 %
1 MUTACIÓN	21,4%	16,2 %	22,4 %	11 %
0 MUTACIONES	8,6 %	21,6 %	11,2 %	0 %
TIPO DE MUTACIÓN MÁS FRECUENTE	<i>Missense</i>	<i>Frameshift</i>	<i>Frameshift</i>	<i>Missense, Nonsense, Frameshift</i>
MUTACIÓN MÁS PREVALENTE	c.3191_3196dup exón 30	c.2875C>T exón 27	c.855+1delG exón 8	¿?

En el año 2008 se constituyó una red de colaboración europea para el estudio mutacional del gen *DYSF*, de la que formamos parte activa con el fin de poner en común los resultados obtenidos por los distintos centros. Los resultados aportados por el grupo inglés diferían de los que habían sido publicados en la literatura, debido probablemente a un sesgo en la selección de los pacientes incluidos [Klinge *et al*, 2010].

Las disferlinopatías presentan un modo de herencia autosómico recesivo, de manera que son necesarias dos mutaciones, una en cada alelo del gen, para que se produzca patología.

El análisis de los resultados obtenidos en las diferentes cohortes, muestra que en nuestro grupo el porcentaje de pacientes con las dos mutaciones identificadas es ligeramente superior al de las otras series de pacientes. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que nuestro grupo es el único que sistemáticamente analiza el mRNA. Como ya se ha explicado anteriormente, el estudio del mRNA permite detectar ciertas mutaciones que pasan desapercibidas en un estudio a nivel de DNA genómico.

Otro de los resultados a destacar en las series francesa, italiana y española es la identificación de una o ninguna mutación en un número no despreciable de pacientes. Esta limitación diagnóstica constituye un tema de debate que se ha reflejado en la literatura y en las reuniones científicas. Aunque se desconoce la causa de esta limitación, la teoría más aceptada postula que probablemente existan más genes implicados en la patología de las disferlinopatías.

5.4- Búsqueda de grandes deleciones o duplicaciones

Tras el análisis completo del gen *DYSF*, en veintiuno de los setenta casos índices de nuestra muestra no se identificaron las dos mutaciones requeridas para el diagnóstico genético de la enfermedad. En 15 de ellos se identificó una única mutación mientras que en 6 pacientes no se identificó ninguna.

Como ya es sabido, en ocasiones grandes reordenamientos en los genes (deleciones/duplicaciones exónicas) no pueden ser detectados mediante secuenciación. En estos casos es imprescindible la utilización de otra estrategia diagnóstica que permita completar el estudio. Teniendo esto en cuenta y ante la imposibilidad de establecer un diagnóstico genético completo en 21 pacientes, se llevó a cabo el análisis de las muestras de DNA genómico mediante la técnica de *MLPA*. Únicamente se identificó una deleción del exón 4 en heterocigosis en un paciente sin previa mutación identificada y, una deleción de los exones 23 y 24 en heterocigosis en otro paciente con una sola mutación identificada previamente.

La técnica de *MLPA*, aunque es de utilidad para la detección de deleciones y duplicaciones exónicas, no ha resultado ser en nuestro estudio la solución definitiva para aquellos pacientes en los que no se ha logrado identificar las dos mutaciones. Sin embargo, Krahn y colaboradores [Krahn *et al*, 2009b] realizaron el análisis de *MLPA* en un grupo de 12 pacientes, todos ellos con ausencia o reducción de la expresión de disferlina, obteniendo una tasa de éxito superior: 4 deleciones y una duplicación.

5.5- Estudio de genes modificadores: *MG53*

Estudios recientes han dado a conocer una proteína llamada mitsugumina-53 de la familia TRIM específica de músculo, que es un componente esencial para la maquinaria de reparación de la membrana muscular. Existe una estrecha interacción entre disferlina y mitsugumina-53 durante el proceso de reparación del sarcolema y el déficit de cualquiera de ellas, junto con el de caveolina-3, origina defectos en la reparación del sarcolema [Cai *et al*, 2009b] .

Los trabajos publicados hasta la fecha habían analizado el papel funcional de mitsugumina-53, pero ninguno de ellos había realizado un estudio mutacional del gen que la codifica (*MG53*) por lo que nos planteamos si *MG53* sería un candidato a modular la expresión y/o función de la disferlina. Así, mutaciones en *MG53* resolverían los casos de aquellos pacientes con una única mutación en *DYSF*. Se procedió a secuenciar los 7 exones que constituyen el gen *MG53* en un grupo de 12 pacientes con una única mutación en *DYSF* sin detectarse mutación alguna en dicho gen.

5.6- Descripción de un nuevo fenotipo de disferlinopatía de inicio congénito

En la literatura se han asociado mutaciones *DYSF* idénticas a diferentes fenotipos, aunque la razón de esta heterogeneidad clínica se desconoce. Las series más grandes de pacientes publicadas definen la segunda década de la vida como el período más habitual de inicio de la enfermedad [Guglieri *et al*, 2008, Krahn *et al*, 2009a, Miyoshi *et al*, 1986], aunque hay pacientes

DISCUSIÓN

descritos que se alejan del citado período de inicio. El paciente sintomático más joven reportado hasta la publicación de nuestro trabajo tenía 10 años de edad [Cupler *et al*, 1998].

En nuestro trabajo describimos una familia no consanguínea con dos hermanos de 3 y 5 años de edad en el momento del diagnóstico, que presentaban una disferlinopatía con inicio congénito y en los cuales se identificó la mutación **p.Ala927LeufsX21** en homocigosis. Este nuevo fenotipo se caracteriza por hipotonía post-natal, retraso en el desarrollo motor y pronunciada debilidad a nivel pélvico y de los músculos flexores del cuello. Es remarcable que los niveles de CK fueran normales hasta los 3 años, incrementándose hasta seis veces a partir de esa edad. Este nuevo fenotipo presenta algunas diferencias respecto a los observados en adultos y debería ser considerado para el análisis de disferlinopatías en estadios pre-sintomáticos. El estudio de imagen de músculo en el paciente más joven se realizó a los dos años de edad y resultó ser completamente normal, mientras que en su hermano mayor se realizó a los 5 años observándose mioedema sin reemplazamiento graso que afectaba a los músculos isquiotibiales y *gastrocnemius* medio. Además, el patrón de afectación muscular observado en estos pacientes no ha sido descrito en ninguna otra distrofia muscular congénita y es característico de este nuevo fenotipo.

Como ya hemos indicado, el inicio de la enfermedad en los pacientes con disferlinopatía se sitúa alrededor de la segunda década de la vida, hecho que se explicaría por la degeneración muscular progresiva debida a los defectos de reparación del sarcolema.

En los pacientes estudiados en este trabajo, a excepción de cambios distróficos moderados, no se observaron alteraciones musculares estructurales específicas. Esto podría reflejar que la degeneración muscular en disferlinopatías empieza a tener relevancia varios años después del nacimiento al incrementarse la actividad muscular.

A pesar de no reportarse consanguinidad en los progenitores, no podemos descartar la posibilidad de un ancestro común ya que ambos presentaban la misma mutación e idéntico haplotipo en 2p13. La mutación **Ala927LeufsX21** identificada en nuestros pacientes se había descrito previamente en la literatura asociada a diferentes fenotipos incluyendo hiperCKemia asintomática. De nuevo nos encontramos ante una situación en la que una misma mutación en *DYSF* es capaz de causar diferentes fenotipos. La identificación de este nuevo fenotipo amplía el espectro clínico de las disferlinopatías y añade nuevos datos a la historia natural de la enfermedad.

En resumen, nuestros estudios sobre el gen *DYSF* han permitido caracterizar el espectro mutacional de los pacientes de población española, identificando nuevas mutaciones no descritas previamente en la literatura. También ha sido posible la descripción de un nuevo fenotipo de disferlinopatía. A nivel técnico hemos establecido un protocolo diagnóstico innovador que permite la detección de mutaciones de una manera más eficiente que otros protocolos diagnósticos.

6. CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- Es posible realizar el estudio mutacional en el RNA total extraído de monocitos circulantes en sangre periférica, evitándose por consiguiente el método invasivo de biopsia muscular
- Existe una gran heterogeneidad mutacional en el gen *DYSF* en pacientes de población española con distrofia muscular de cinturas tipo 2B y miopatía distal tipo Miyoshi.
- No es posible establecer una relación genotipo-fenotipo en pacientes con disferlinopatía.
- La mutación *DYSF* **c.3191_3196dup** es la más prevalente en nuestra población.
- La heterogeneidad mutacional en los pacientes de nuestra población, en lo referente a la localización dentro del gen, es elevada y no se han identificado "hotspots" del mismo modo que en otras poblaciones caucásicas.
- El estudio de *DYSF* en mRNA vs DNA genómico permite:
 - Establecer un diagnóstico molecular de forma más rápida y eficaz.
 - Detectar un mayor número de mutaciones.
 - Detectar todas las mutaciones que alteran el proceso de *splicing*.

CONCLUSIONES

- No se han identificado mutaciones en el gen *MG53*, que codifica para mitsugumina-53, en nuestra serie de pacientes con disferlinopatía por lo que hasta la actualidad no puede ser considerado como gen modificador.
- Se describe un nuevo fenotipo de disferlinopatía con inicio congénito, ampliándose de este modo el espectro clínico de las disferlinopatías y, añadiendo nuevos datos a la historia natural de la enfermedad.

7. ANEXOS



PERGAMON

Neuromuscular Disorders 17 (2007) 69–76



www.elsevier.com/locate/nmd

Dysferlin expression in monocytes: A source of mRNA for mutation analysis

N. De Luna ^{a,1}, A. Freixas ^{b,1}, P. Gallano ^{b,*}, L. Caselles ^a, R. Rojas-García ^a, C. Paradas ^a, G. Nogales ^a, R. Dominguez-Perles ^a, L. Gonzalez-Quereda ^b, J.J. Vílchez ^c, C. Márquez ^d, J. Bautista ^e, A. Guerrero ^f, J.A. Salazar ^g, A. Pou ^h, I. Illa ^a, E. Gallardo ^a

^a Servei de Neurologia i Laboratori de Neurologia Experimental, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma, Barcelona, Spain

^b Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma, Barcelona, Spain

^c Servicios de Neurología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^d Servicios de Neurología, Hospital Universitario Valme, Sevilla, Spain

^e Servicios de Neurología, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

^f Servicios de Neurología, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Spain

^g Servicios de Neurología, Hospital General Carlos Haya, Málaga, Spain

^h Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Received 2 June 2006; received in revised form 28 July 2006; accepted 8 September 2006

Abstract

Dysferlin protein is expressed in peripheral blood monocytes. The genomic analysis of the *DYSF* gene has proved to be time consuming because it has 55 exons. We designed a mutational screening strategy based on cDNA from monocytes to find out whether the mutational analysis could be performed in mRNA from a source less invasive than the muscle biopsy. We studied 34 patients from 23 families diagnosed with dysferlinopathy. The diagnosis was based on clinical findings and on the absence of protein expression using either immunohistochemistry or Western blot of skeletal muscle and/or monocytes. We identified 28 different mutations, 13 of which were novel. The *DYSF* mutations in both alleles were found in 30 patients and only in one allele in four. The results were confirmed using genomic DNA in 26/34 patients. This is the first report to furnish evidence of reliable mutational analysis using monocytes cDNA and constitutes a good alternative to genomic DNA analysis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Peripheral blood monocytes; cDNA; Dysferlin; Dysferlinopathy; Western blot

1. Introduction

Mutations in the dysferlin gene (*DYSF*) cause several muscular dystrophy phenotypes including limb girdle 2B (LGMD2B), Miyoshi myopathy (MM) and distal anterior compartment myopathy (DAT) [1–4].

The *DYSF* gene maps to chromosome 2p13, has 55 exons and codifies a protein of approximately 237 kDa, which is located in the sarcolemma. Its function is unknown but its homology to *FER-1* of *Caenorhabditis elegans* [5] and the presence of six C2 motifs, which are putative calcium-binding domains [6], suggest that it could be implicated in calcium-mediated membrane fusion events and signaling trafficking. Recent studies have demonstrated the involvement of dysferlin in sarcolemma repair events [7,8], muscle regeneration [9] and differentiation [10].

* Corresponding author. Tel.: +34 93 2919361; fax: +34 93 2919494.

E-mail address: pgallano@santpau.es (P. Gallano).

¹ These authors equally contributed to the work.

The confirmation of the clinical diagnosis of dysferlinopathies requires the absence/severe reduction of dysferlin in the muscle biopsy. This can be achieved by Western blot, immunohistochemistry [11,12] and /or genetic analysis [6]. Genetic study provides the definitive diagnosis but this is difficult to perform given the length of the *DYSF* gene and the lack of mutational hot spots [6]. Most of the mutations described correspond to point mutations, deletions of several exons [13] and 5' splicing donor site mutations [14] (see www.dmd.nl).

Dysferlin expression in normal human tissues was detected on blots of heart and term placenta and staining of skeletal muscle sections showed weak labeling of peripheral nerve and the smooth muscle of blood vessels. In normal skeletal muscle, dysferlin is localized predominantly at the periphery of the muscle fiber in the sarcolemma [15]. Other studies have shown that dysferlin may also be present in cytoplasmic vesicles near the sarcolemma. In dystrophic muscles, the immunohistochemical pattern showed numerous fibers with cytoplasmic staining, particularly in necrotic and regenerating fibers. Dysferlin also accumulates predominantly in fast-twitch fibers [16].

We previously reported dysferlin expression in peripheral blood monocytes and developed a method that is less invasive than muscle biopsy to confirm the diagnosis of dysferlinopathies [17]. We observed that the endomysial macrophages of normal human skeletal muscle also express dysferlin [9], although, neither the role of dysferlin in monocytes nor its subsarcolemmal distribution are fully known.

The aim of the present study was to confirm the utility of the peripheral blood test in the diagnosis of dysferlinopathies and the usefulness of peripheral blood monocytes mRNA as a more convenient source to study mutations in the *DYSF* gene, comparing the results with genomic DNA.

2. Patients and methods

2.1. Patients and families

Thirty-four patients from 23 families from different centers in Spain were diagnosed with dysferlin myopathy on the basis of clinical study, skeletal muscle immunohistochemistry, Western blot, or both [4,15,18] (Table 1). In parallel, dysferlin expression in monocytes was studied for confirmation purposes. The patients presented different phenotypes: LGMD2B in 19, MM in 13 and DAT in two.

2.2. Immunohistochemistry of muscle biopsies

Frozen sections from the muscle biopsies from 30/34 patients were processed for immunohistochemistry. Serial 10- μ m sections were fixed in acetone.

After incubation with hydrogen peroxide and a blocking solution containing 2% bovine serum albumin, 10% normal human serum and 3% normal goat serum, the slides were further incubated overnight with a primary monoclonal antibody (10 μ g/ml) to dysferlin (NCL-Hamlet1, Novocastra Laboratories, Newcastle-upon-Tyne, UK) and α -sarcoglycan (NCL-a-SARC, Novocastra Laboratories). A secondary peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) was added for 1 h at room temperature. The sections were developed using diaminobenzidine solution (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

2.3. Western blot of muscle biopsies

Western blot analysis of muscle biopsies from 20 of the 34 patients was performed using a monoclonal antibody to dysferlin, as previously described [18]. Frozen muscle samples were quickly weighed and homogenized with 19 μ l/mg of treatment buffer containing 0.125 mol/L Tris/HCl buffer, pH 6.4, 10% glycerol, 4% SDS, 4 mol/L urea, 10% mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue. Non-specific binding sites on the blots were blocked by incubation in 5% low-fat dried milk powder in phosphate buffer saline. The primary mouse monoclonal antibodies, anti-dysferlin (NCL-Hamlet1, Novocastra Laboratories) (1:300 dilution) and anti-desmin (Novocastra Laboratories) (1:1000) were added simultaneously. Peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (DakoP260, Glostrup, Denmark) was added at a 1:300 dilution. Immunoreactive bands were visualised by an enhanced chemoluminescence system (Pierce, Rockford, USA).

2.4. Isolation of peripheral blood monocytes and immunoblot analysis

Peripheral blood monocytes are the CD14⁺ subpopulation of peripheral blood mononuclear cells. CD14⁺ cell isolation from blood samples of 25 subjects was performed as previously described [17]. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from the whole blood of patients and healthy controls by Ficoll–Hypaque gradient centrifugation (Amersham, Buckinghamshire, UK). Alternatively, BD Vacutainer CPT tubes (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) were used to separate these cells with a single-step protocol that allows transportation of the cells for 48 h at room temperature. Peripheral blood mononuclear cells were washed with a buffer containing 0.5% bovine serum albumin, EDTA 2 mM in PBS and a centrifugation of 1500 rpm for 10 min was performed. Cells were mixed and incubated with anti-CD14-coated microbeads (Milteny Biotec,

Table 1
Summary of *DYSF* mutations: correlation with protein expression and clinical phenotype

Patient	Phenotype	CK level (UI/L)	Muscle IH	Muscle WB	PBM WB	Nucleotide change	Exon	Protein change
I	MM	11,000	Absence	Absence	Absence	c.5563 G>T c.6368 G>A	46 53	p.E1732X p.R2000Q
II.1	2B	5,000	Absence	Absence	Absence	c.3244 C>T	27	p.R959W
II.2	2B	ND	ND	ND	Absence	c.963_964 insCC c.3244 C>T	6 27	p.G199PfsX28 p.R959W
III.1	MM	5,400	Absence	ND	Absence	c.963_964 insCC c.6086 C>T	6 51	p.G199PfsX28 p.R1905X
III.2	MM	5,800	Absence	ND	Absence	c.6086 C>T	51	p.R1905X
IV.1	2B	7,450	Absence	ND	ND	c.3227 dupT	27	p.F954VfsX2
IV.2	2B	11,400	Absence	ND	ND	c.3227 dupT	27	p.F954VfsX2
V.1	MM	4,450	Absence	Absence	Absence	c.6348 dupA c.6493 C>T	53 54	p.E1994RfsX3 p.R2042C
V.2	MM	ND	ND	ND	Absence	c.6348 dupA c.6493 C>T	53 54	p.E1994RfsX3 p.R2042C
VI	2B	ND	Absence	Absence	ND	c.4336 C>T c.4866delT	37 41	p.Q1323X p.F1499LfsX3
VII.1	2B	ND	Absence	Absence	ND	c.6348dupA	53	p.E1994RfsX3
VII.2	2B	ND	Absence	Absence	ND	c.6348dupA	53	p.E1994RfsX3
VIII.1	MM	2,500	Absence	Absence	Absence	c.1924 G>A	18	p.L508_G519>CfsX108
VIII.2	MM	4,500	Absence	Absence	Absence	c.1924 G>A	18	p.L508_G519>CfsX108
IX	2B	2,200	Absence	Absence	Absence	c.5894+3 A>G	IVS49	p.R1810_G1842>S
X	MM	ND	Absence	Absence	Absence	c.4372 G>A	37	p.E1335K
XI.1	2B	1,200	Absence	Absence	Absence	c.1489 G>C	12	p.V374L
XI.2	2B	9,000	Absence	ND	Absence	c.1489 G>C	12	p.V374L
XI.3	2B	ND	Absence	ND	Absence	c.1489 G>C	12	p.V374L
XI.4	2B	ND	Absence	ND	Absence	c.1489 G>C	12	p.V374L
XII	2B	ND	Absence	ND	Absence	c.4174 G>T c.5338 G>A	34 45	p.E1269X p.E1657K
XIII	2B	ND	Absence	Absence	Absence	c.6348dupA	53	p.E1994RfsX3
XIV	2B	1,550	Absence	Absence	Absence	c.5878 G>A c.6272 G>A	49 52	D1837N W1968X
XV	MM	ND	Absence	ND	ND	c.4174 G>T	34	p.E1269X
XVI	DAT	10,000	Absence	ND	ND	c.3429_3430insG	29	p.E1021GfsX11
XVII ^a	2B	2,400	Absence	Absence	Absence	c.2353_2363del	21	p.S662_W665>GfsX6
XVIII.1 ^a	MM	ND	ND	ND	Absence	c.4174 G>T	34	p.E1269X
XVIII.2 ^a	MM	ND	ND	ND	Absence	c.4174 G>T	34	p.E1269X
XIX	2B	ND	Absence	Absence	Absence	c.1722+1 G>A	IVS14	p.M451_F452insIVS14
XX ^a	2B	ND	Absence	Absence	Absence	c.3182 T>G	27	p.L938R
XXI	2B	ND	Absence	Absence	Absence	c.523 T>C c.1070 G>A	3 7	p.W52R p.G234E
XXII	DAT	2,400	Absence	Absence	Absence	c.1726 C>T c.3499 C>A	15 29	p.P453S p.R1044S
XXIII.1	MM	ND	Absence	Absence	ND	c.3485 G>T c.5671 C>T	29 47	p.R1039L p.R1768W
XXIII.2	MM	ND	Absence	Absence	ND	c.3485 G>T c.5671 C>T	29 47	p.R1039L p.R1768W

MM, Miyoshi myopathy; 2B, limb girdle muscular dystrophy type 2B; DAT, distal anterior phenotype. ND, not determined. Novel mutations are depicted in bold. Mutations are numbered taking ATG at nucleotide 369 of the *DYSF* cDNA sequence as the first nucleotide (GenBank Accession No. NM_003494).

^a Individuals with one mutation identified.

Bergisch Gladbach, Germany) for 15 min at 4 °C and separated using MS columns on an MACS magnet according to the manufacturer's instructions (Milteny Biotec). After the elution step two cellular populations were obtained: CD14⁺ cells corresponding to monocytes and CD14⁻ cells. To perform the Western blot, the cell pellet was homogenized with the same treatment buffer as used for muscle samples. In the

immunoblot of monocytes, a monoclonal antibody to dysferlin (NCL-Hamlet, Novocastra) (1/300 dilution) and a monoclonal antibody to β -actin (Sigma, Saint Louis, USA) (1/5000 dilution) as a loading control of the samples were used. Finally, peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (DakoP260) was added at 1/300 dilution. Immunoreactive bands were detected with an enhanced chemoluminescence

system (Pierce). Western blot analysis was performed at least twice for each sample. Furthermore, dysferlin expression in monocytes was compared with that in total peripheral blood mononuclear cells (without CD14⁺ cell isolation) in eight normal subjects in order to confirm the sensitivity of the assay.

2.5. Mutation analysis

Genetic studies in the *DYSF* gene were performed in cDNA and genomic DNA. Dysferlin mRNA is expressed only in CD14⁺ cells and not in the other blood cells (data not shown). However, to provide a sufficient quantity and volume of cells to perform an optimal extraction of total RNA, RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells. The dysferlin cDNA obtained by RT-PCR will only come from the RNA expressed in monocytes. RNA was extracted using Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc., Houston, USA) and reverse transcribed with the oligo(dT) primer technique (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). We amplified the entire dysferlin cDNA using 14 sets of oligonucleotide primers covering the 55 exons as shown in Table 2. The primers were designed using the Primer 3 Input program (primer3_www.cgi v 0.2). In order to obtain the maximum specificity of the primer

sequences, exons were included in more than one fragment (Fig. 2).

Amplification reaction mixtures contained 1 μ l cDNA, 10 \times PCR buffer, 1 or 0.8 mM MgCl₂ (when using primer set DYSF1 or DYSF12), 0.8 mM dNTPs, 0.2 μ M of each set of primers, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase. The amplification profile consisted of initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing for 1 min and extension at 72 °C for 1 min and a large extension at 72 °C for 5 min. Each primer set required a certain annealing temperature for a good amplification (Table 2).

The mutations found in the cDNA were confirmed in the genomic DNA. Total genomic DNA from the peripheral blood of patients was employed as a template for PCR amplification analysis of the mutated exons (primer sequences in www.dmd.nl). Both cDNA and genomic DNA amplified product samples were purified with a QIAquick column PCR purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), and were analysed by direct forward and reverse sequencing, with a DNA sequencing kit (BIG DYE 1.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an automatic sequencer (ABI PRISM 3100 Avant, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Table 2
Oligonucleotide primers used to amplify the *DYSF* mRNA

RNA fragments	Exons	Sequences	PCR products (bp)	Annealing temperatures (°C)
I	5'UTR, 1, 2, 3	DYSF 1F: CCAGCCAGGTGCAAAATG DYSF 1R: TGTTCCCTCCCCATCGTCT	608	51
II	1, 2, 3, 4, 5, 6	DYSF 2F: GACACCGACATCAGCGAT DYSF 2R: CGCTTTGATCCAGGAATGG	502	54
III	6, 7, 8, 9, 10, 11	DYSF3F: AGGAGGAGAGGAAGACACA DYSF 3R: CCAGCACACAAAGGCTTG	609	54
IV	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	DYSF4F: CACGCTATCTCAGGAAGTG DYSF 4R: CCCAGGTAGTCATCCAAGTC	601	54
V	17, 18, 19, 20, 21	DYSF 5F: AAATAGAAGAGGAGCCTGCAG DYSF 5R: CGATTCTATGGCTGATGTCCTC	547	56
VI	21, 22, 23, 24, 25	DYSF 6F: TCTTTGACGGGTGCCACTAC DYSF 6R: GGCACCTTCTCCATCGGAT	618	52
VII	24, 25, 26, 27, 28, 29	DYSF 7F: GAGACAAGCGTGTGGCATAAC DYSF 7R: TACTCCAGCCTTGCTCATC	621	56
VIII	8, 29, 30, 31, 32, 33	DYSF 8F: GAGAAGGTGCTTCCCAAGGA DYSF 8R: GAGACGATGGCATAGGGATC	612	56
IX	31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	DYSF 9F: GGCGTGATGGATGACAAGAG DYSF 9R: ACTTCTCATGTTCCGCGAGGC	686	56
X	37, 38, 39, 40, 41, 42	DYSF 10F: AGAGGGAGGCCAACATCT DYSF 10R: TCCACATTCTCCAGCTGTG	601	56
XI	39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	DYSF 11F: AGACGATGTGAGCCTACT DYSF 11R: ACAGCGAGCCCCAACTT	705	56
XII	44, 45, 46, 47, 48, 49	DYSF 12F: CAGTGAGTGACCAGGATAA DYSF 12R: GGAAAAACCTTCTGGCTC	603	51
XIII	48, 49, 50, 51, 52, 53	DYSF 13F: AGGGGAAGCTGCAGATGT DYSF 13R: GGGTTCATGTTGGGCTCA	693	58
XIV	52, 53, 54, 55, 3'UTR	DYSF 14F: AAGAAAATACTGGCGGGC DYSF 14R: ATGGAAGTGGGGTGATCT	503	56

3. Results

3.1. Clinical features

In our series of 34 patients we observed the three different clinical phenotypes described in dysferlin myopathies (Table 1). The phenotype LGMD2B was found in 19 patients from 13 families, in whom the clinical course was severe.

The MM phenotype characterized by a predominant involvement of the posterior compartment of the legs was found in 13 patients from eight families. In all patients with the MM phenotype, the clinical course was less severe than in those with LGMD2B.

Two patients from unrelated families presented the DAT phenotype [19]. Initial clinical evaluation revealed severe distal weakness, predominantly in the anterior compartment, with a steppage gait and mild proximal weakness in the lower extremities. All the patients had a significant deterioration towards proximal weakness in the lower limbs, which rapidly progressed towards a marked degree of disability.

3.2. Immunohistochemistry and Western blot from muscle biopsies

Muscle biopsy disclosed dystrophic features in the 30 patients in whom it was performed. Immunohistochemistry showed absence of dysferlin staining in the sarcolemma in all the muscular biopsies. None of these biopsies presented patchy sarcolemmal staining. A normal pattern of α -sarcoglycan expression was observed in immunohistochemical analyses, indicating that the integrity of sarcolemma was preserved. Western blot analysis revealed an absence of dysferlin in the 20 skeletal muscle samples, confirming immunohistochemical results.

3.3. Detection of patients using immunoblot of monocytes

Immunoblot of monocytes was performed in 25 patients and in 25 controls. All the patients displayed absence of dysferlin. Dysferlinopathy was confirmed by absence of dysferlin in the muscle biopsy by immunohistochemistry (22/25) and Western blot (15/25). In the remaining 3/25 patients, dysferlinopathy was confirmed by genetic analysis. The reproducibility of the test is 100% since repeated tests of dysferlin expression in monocytes from the same sample yielded the same result, and it always correlated with dysferlin expression in skeletal muscle from the same patient. The absence of dysferlin observed in skeletal muscle (when available) from these patients always correlates with a total absence of dysferlin expression in monocytes from the same patients (Fig. 1).

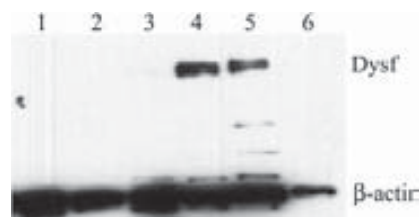


Fig. 1. Western blot analysis in monocytes. Dysferlin expression was absent in monocytes from patients (lanes 1, 2, 3 and 6) compared to the controls (lanes 4 and 5). β -Actin was used as a loading control.

Reliable dysferlin quantification was not feasible in total mononuclear cells but only when the study was done in the CD14-purified cells because dysferlin expression in total peripheral blood mononuclear cells was either low or undetectable in control samples.

3.4. Genetic analysis

All the mutations found in our series were detected in RNA and 26/34 patients were confirmed in genomic DNA. We identified mutations in the *DYSF* gene in all the patients. We found the two mutated alleles in 30 patients. Eighteen of them presented the mutation in a homozygous state and 12 in a heterozygous state. In four patients, we identified only one mutated allele despite a comprehensive screening of the *DYSF* gene. *DYSF* mutational analysis revealed the presence of 28 different mutations (Table 1). Thirteen of them were missense, five nonsense, three microdeletions, four insertions and three splice site mutations. Thirteen mutations have not been described elsewhere: p.W52R, p.G199PfsX28, p.G234E, p.M451_F452insIVS14, p.P453S, p.L508_G519>CfsX108, p.S662_W665>GfsX6, p.L938R, p.E1021GfsX11, p.R1039L, p.R1044S, p.E1269X, and p.E1657K.

The p.W52R mutation consists of a T to C transition at nucleotide position 523 in exon 3, which changes tryptophan into arginine at codon 52. This mutation was detected in one patient clinically diagnosed as LGMD2B.

The p.G199PfsX28 mutation consists of a CC microinsertion at 963_964 nucleotide position in exon 6, which changes glycine into proline and causes a truncated protein. This mutation was detected in two patients from one family, clinically diagnosed as LGMD2B.

The p.G234E mutation consists of a G to A transition in the nucleotide position 1070, which produces a change of glycine into glutamic acid at codon 234 in exon 7. This mutation was identified in one index case diagnosed as LGMD2B.

The p.M451_F452insIVS14 mutation consists of a G to A transition in the nucleotide position 1722 + 1, which produces the retention of intron 14.

Consequently, a stop codon appears 39 triplets downstream. This mutation was found in a LGMD2B patient by the analysis of genomic DNA and mRNA.

The p.P453S mutation consists of a C to T transition in nucleotide position 1726. It changes proline into serine at codon 453 in exon 15 in a patient classified as DAT phenotype.

The p.L508_G519>CfsX108 mutation consists of a G to A transition in nucleotide position 1924. At the mRNA level, this mutation causes a cryptic splicing site that yields a 34 bp deletion leading to a stop codon at 108 triplets of the mutation. The mutation is present in two siblings with MM in a homozygous state.

We found an 11 bp deletion in exon 21, between 2353_2363 nucleotide position. This mutation changes serine into glycine at codon 662 and the frameshift produces stop codon 5 triplets downstream from the deletion. The deletion was confirmed by mRNA and DNA and was identified in the heterozygous index case diagnosed as LGMD2B.

The p.L938R mutation consists of a T to G transversion at nucleotide position 3182 in exon 27, which changes leucine into arginine at codon 938. This mutation was detected in one patient clinically diagnosed as LGMD2B.

The G insertion at nucleotide position 3429 in exon 29 changes glutamic acid into glycine at codon 1021. This mutation produces a premature termination of translation at 11 triplets upstream. This mutation was confirmed by mRNA and DNA and we identified it in the homozygous index case diagnosed as DAT.

The p.R1039L mutation consists of a G to T transversion at nucleotide position 3485. It changes arginine into leucine at codon 1039 in exon 29. This mutation was detected in two siblings diagnosed as MM.

The p.I044S mutation consists of a C to A transversion at nucleotide position 3499 in exon 29, which changes arginine into serine at codon 1044. This mutation was detected in a heterozygous state in one patient clinically diagnosed as DAT.

The nonsense p.E1269X mutation consists of a G to T transversion at nucleotide position 4174 in exon 34, which changes glutamic acid into a stop codon and leads to premature termination of translation at codon 1269. This mutation was identified only by mRNA and was present in three different families. Two of the families were clinically MM (one homozygous and one heterozygous) and the third was diagnosed as LGMD2B. This family was compound heterozygote for E1269X and the missense E1657K mutation. This mutation consists of a G to A transition at nucleotide position 5338 in exon 45, changing glutamic acid into a lysine at codon 1657.

The splicing mutation located in IVS49 consists of an A to G transition at nucleotide position 5894 + 3, which produces an exon skipping due to the involvement of a

splice site. The mutation was found in an LGMD2B index case by analysing DNA and mRNA. This mutation has been previously described at the DNA level but the consequence of the mutation had not been studied in mRNA [20].

The pathogenic nature of these novel mutations was demonstrated by confirming their absence in 180 normal chromosomes. All mutations were annotated by taking ATG at nucleotide 369 of the *DYSF* cDNA sequence as the first nucleotide (GenBank Accession No. NM_003494). The mutations are summarised in Fig. 2 and Table 1.



Fig. 2. Schematic representation of *DYSF* gene: exons (boxes), mRNA fragments (roman numbers) and identified mutations. Novel mutations are depicted in bold.

4. Discussion

Our study demonstrates that molecular analysis of the *DYSF* gene using mRNA from monocytes is a rapid and informative method and constitutes a good alternative to genomic analysis. In 30 patients we identified two mutations (88%) and 64 mutated alleles were detected (94%). These results represent a significant improvement when compared with the results obtained using a different molecular strategy in which both mutations were detected in 67% of the patients and 73% of the total mutated alleles were identified [21]. We could detect at least one mutation in all patients using mRNA from peripheral blood monocytes. All the mutations described in this study abolish dysferlin protein expression in muscle fibers and monocytes. Thus, these results validate our earlier study, which reported that the assay for determining dysferlin protein expression in CD14⁺ peripheral blood monocytes was reliable and effective and could be used to diagnose patients with dysferlinopathy [17] before performing the genetic approach. It should be pointed out, nevertheless, that Western blot of total peripheral blood mononuclear cells is not reliable because it can give rise to false negative results. Given that dysferlin is expressed only in monocytes, which represent 3–7% of total whole blood, it is important to analyze dysferlin expression in this CD14⁺ subpopulation of total peripheral blood mononuclear cells. Moreover, PBMC shipping to diagnostic testing laboratories is easier (i.e., CPT tubes) and cheaper (no need for dry ice) than muscle biopsy transportation for Western blot, immunohistochemistry or genetic analysis.

Mutations in *DYSF* gene have been described using skeletal muscle mRNA [22]. The authors found a deletion of exon 32 that resulted from a mutation in a lariat branch point in intron 31. These results indicate that the mRNA analysis is useful in: (1) the study of mutations in the coding regions, and (2) the identification of the consequence of mutations in non-coding regions of the gene involved in splicing mechanisms. The use of monocytes as a source of mRNA proved to be effective and a less invasive tissue sampling method when compared with muscle biopsy. For instance, it allowed us to identify mutations of especial interest given that they produce abnormal splicing phenomena (p.M451_F452insIVS14, p.L508_G519>CfsX108 and p.R1810_G1842>S) and account for 10% of all the mutations found. The effect of these mutations on mRNA could not have been determined using genomic DNA analysis. We identified 28 different mutations, 12 of which introduced stop codons or frameshift mutations, resulting in premature truncation of the dysferlin protein. Three mutations affected acceptor or donor consensus splicing sites and the remaining 13 defects were missense mutations. In addition, the mutations

identified in this study were scattered all over the gene as observed by other authors [6,21].

No correlation between the type of mutation and the phenotype was found as previously reported [19,21,23] since the same mutation produced different phenotypes (LGMD2B, MM and DAT). Other factors and other genes playing the role of modifiers could account for the clinical heterogeneity in dysferlinopathies.

A severe reduction of dysferlin in skeletal muscle has been reported in patients with dysferlin myopathy [16,24] and also in patients with other muscular dystrophies such as LGMD1C and LGMD2A [13,25,26]. However, absence of dysferlin, as observed in our series using immunohistochemistry or Western blot, was not reported in these muscular dystrophies. Our results suggest that the majority of mutations in the *DYSF* gene must yield an unstable mRNA molecule since in all the cases the expression of protein is abolished. Also, it could indicate that the mechanisms of nonsense-mediated decay in this gene are not restricted to the premature termination codons localized at 5' of the penultimate exon [27].

The mRNA analysis allows us to identify not only the mutation but also the effect produced in mRNA. This effect is not usually observed in genomic DNA. The fact that dysferlin mRNA can be isolated from monocytes considerably facilitates the mRNA approach. Furthermore, RNA isolation from monocytes is useful in patients in whom muscle biopsy is unavailable. Molecular diagnostic laboratories could benefit from this more cost-effective and less time-consuming strategy to explore a large gene such as the *DYSF* gene [21,24]. In the light of our findings, mRNA mutational analysis could be regarded as a suitable alternative to SSP and dHPLC techniques because of its greater rapidity and equal sensitivity.

Acknowledgements

The authors are very grateful to all the patients who participated in this study. We thank M. Muñoz and E. Ortiz for technical support. This study was supported by Research Grants PI020388, PI 03/1387 and C03/05 from the Fondo Investigación Sanitaria (FIS), SAF 03/9240 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and Association Française contre les Myopathies.

References

- [1] Bashir R, Strachan T, Keers S, et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 1994;3(3):455–7.
- [2] Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20(1):31–6.

- [3] Bushby KM. Dysferlin and muscular dystrophy. *Acta Neurol Belg* 2000;100(3):142–5.
- [4] Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49(1):130–4.
- [5] Bashir R, Britton S, Strachan T, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998;20(1):37–42.
- [6] Aoki M, Liu J, Richard I, et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 2001;57(2):271–8.
- [7] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423(6936):168–72.
- [8] Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown Jr RH. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 2003.
- [9] De Luna N, Gallardo E, Illa I. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(10):1104–13.
- [10] De Luna N, Gallardo E, Soriano M, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro”. *J Biol Chem* 2006.
- [11] Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999;122(Pt 8):1403–20.
- [12] Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, et al. Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. *J Mol Neurosci* 2001;17(1):71–80.
- [13] Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 2000;10(8):553–9.
- [14] Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, et al. Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at the sarcolemma. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104(6):615–20.
- [15] Anderson LV, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 1999;8(5):855–61.
- [16] Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 2000;48(6):902–12.
- [17] Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 2002;51(1):129–33.
- [18] Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 1999;154(4):1017–22.
- [19] Vilchez JJ, Gallano P, Gallardo E, et al. Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol* 2005;62(8):1256–9.
- [20] Brummer D, Walter MC, Palmbach M, et al. Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations. *Acta Myol* 2005;24(1):6–16.
- [21] Nguyen K, Bassez G, Bernard R, et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum Mutat* 2005;26(2):165.
- [22] Sinnreich M, Therrien C, Karpati G. Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 2006;66(7):1114–6.
- [23] Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 2000;55(12):1931–3.
- [24] Cagliani R, Fortunato F, Giorda R, et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscul Disord* 2003;13(10):788–95.
- [25] Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, et al. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord* 2004;14(10):659–65.
- [26] Hermanova M, Zapletalova E, Sedlackova J, et al. Analysis of histopathologic and molecular pathologic findings in Czech LGMD2A patients. *Muscle Nerve* 2005;33(3):424–32.
- [27] Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004;36(8):801–8.



Phenotypic variability in a Spanish family with a *Caveolin-3* mutation

Paloma González-Pérez^a, Pía Gallano^b, Lidia González-Querada^b, Eloy Rivas-Infante^c, Susana Teijeira^d, Carmen Navarro^d, Juan Bautista-Lorite^{a,*}

^a Neuromuscular Unit, Department of Neurology and Clinical Neurophysiology, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

^b Department of Genetics, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^c Neuropathology Unit, Department of Pathology, University Hospital Virgen del Rocío, Seville Spain

^d Neuropathology Unit, Department of Pathology, University Hospital of Vigo Meixoeiro, Vigo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2008

Received in revised form 7 September 2008

Accepted 11 September 2008

Available online 19 October 2008

Keywords:

Rippling muscle disease

Distal myopathy

Hyperckemia

Caveolin-3 gene

ABSTRACT

We report a Spanish family affected from a late onset, hand-involved and autosomal dominant distal myopathy associated to *Caveolin-3* mutation. Signs of muscle hyperexcitability and hyperckemia were observed in the youngest relatives but not motor symptoms.

Patients and methods: Neurological examination was performed in all members of the family. Muscle biopsy sample was taken from the proband and DNA genomics was amplified for the two exons of *Cav-3* by the polymerase chain reaction (PCR) in all the affected members and in three asymptomatic relatives.

Results: Signs of muscle hyperexcitability and hyperckemia were observed in the affected members from early ages. *Cav-3* expression was greatly reduced in the sarcolemma of the proband's muscle. Genetic studies revealed a G → A transition at nucleotide position 80 in exon 1 of the *Cav-3* gene (c.80G > A), generating a Arg → Gln change at codon 27 (p.R27Q) of the amino acid chain in heterozygous state, while no mutation was found in unaffected members.

Conclusions: Signs of muscle hyperexcitability and hyperckemia at early ages may predict the development of a late onset autosomal dominant hand-involved myopathy associated to *Cav-3* mutation in the family reported herein.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Caveolin-3 (*Cav-3*) is an integral membrane protein specifically expressed in smooth, cardiac and skeletal muscle cells, although recently it has been identified in astroglia [1,2]. *Cav-3* gene is located in chromosome 3p25. Monomers of 150 amino acids oligomerize to form a high molecular mass scaffolding network which constitutes the main support of the caveolae in skeletal muscle cells [3].

Five autosomal dominant phenotypes associated with *Cav-3* mutations have been described [3]: Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C), rippling muscle disease (RMD), distal myopathy, hyperckemia, and hypertrophic cardiomyopathy. Moreover, a specific *Cav-3* mutation may be associated with different phenotypes within a family [4,5].

We report a Spanish family whose members developed an autosomal dominant hand-involved distal myopathy associated with a *Cav-3* mutation. Interestingly, the youngest members displayed signs of muscle hyperexcitability and hyperckemia before the distal myopathy became apparent clinically.

* Corresponding author. Department of Neurology and Clinical Neurophysiology, University Hospital Virgen del Rocío, Av. Manuel Siurot s/n., 41013 Seville, Spain. Tel.: +34 955 01 35 37; fax: +34 955 01 25 95.

E-mail address: jbautistalorite@gmail.com (J. Bautista-Lorite).

2. Patients and methods

The pedigree of the family is shown in Fig. 1.

2.1. Case reports

I₁ (proband): This patient is a 77-year-old man. At the age of 45, he started to complain of a slow and progressive weakness in his hands. He had difficulty opening doors using keys, buttoning his shirt, and writing. There was no history of cramps, myalgias, involuntary movements, exercise intolerance or fatigue. At this time, neurological examination revealed thenar and hypothenar muscle atrophy in both hands and moderately reduced muscle strength in intrinsic muscles and finger flexors. These symptoms were more marked in the left hand. Calf hypertrophy and *pes cavus* were also observed (Fig. 2). In addition, tapping on skeletal muscles with a reflex hammer revealed the presence of percussion-induced rapid contractions (PIRC), predominantly on distal muscles of upper limbs. The rest of the neurological examination was normal.

Serum creatin kinase (CK) levels were around 643 IU/L (normal level < 180 IU/L). Other biochemical values were normal including lactic and pyruvic acid.

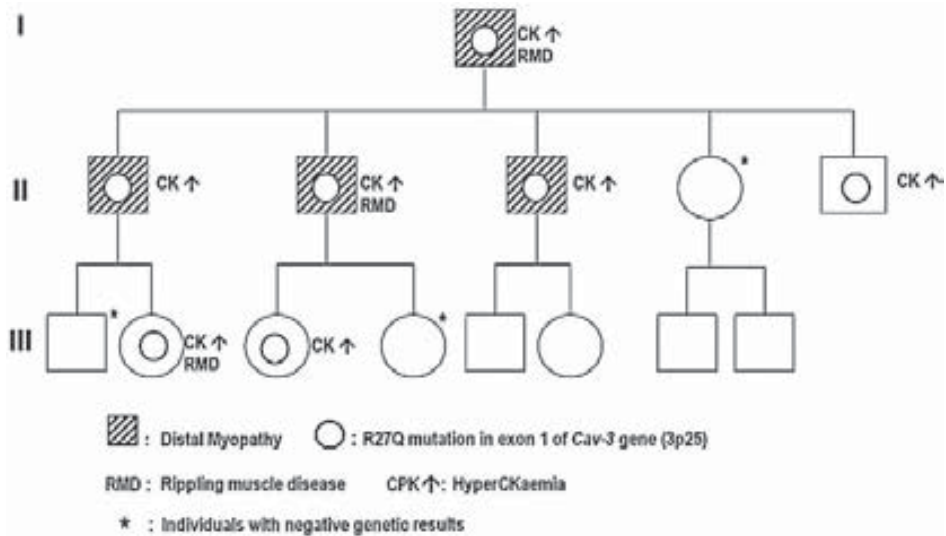


Fig. 1. Pedigree of the family: Crossed symbols depict patients who have developed motor deficit in hands. However, there is no evidence of motor deficit in subjects II₅, III₂ and III₃ who present with hyperckemia and signs of muscle hyperexcitability. Note that *Cav-3* gene mutation was found in the members marked with \odot . I₁: proband. \square : male. \circ : female.

II₁: This is a 52-year-old man, the oldest son of the proband. A high level of CK (767 IU/L) was detected in a routine analysis at the age of 28. In addition, calf hypertrophy and *pes cavus* were also observed. Nine years later, at the age of 37, he complained of weakness in his hands. At that time, neurological examination showed bilateral hypothenar muscle atrophy and asymmetrical paresis of opponens pollicis and interossei muscles, which was more marked in the left hand. The motor deficit has shown a slight progress until today.

II₂: The second son of the proband, a 51-year-old man, was examined at the age of 26 presenting hyperckemia (1223 U/L), calf hypertrophy and *pes cavus*. In addition, PIRC and percussion-induced muscle mounding (PIMM) in biceps brachii and triceps muscles were also observed. Fifteen years later, paresis in interossei muscles and opponens pollicis appeared being more marked in the left hand.

II₃: This patient is a 45-year-old man. Hyperckemia (452 U/L), calf hypertrophy and *pes cavus* were detected at the age of 21. When he was 42, he presented paresis in interossei muscles and thenar muscle atrophy predominantly in the right hand.

II₅: The youngest son of the proband, a 33-year-old man, presented an asymptomatic hyperckemia (619 IU/L) and *pes cavus* from the age of 9. No evidence of motor deficit has been observed to date.

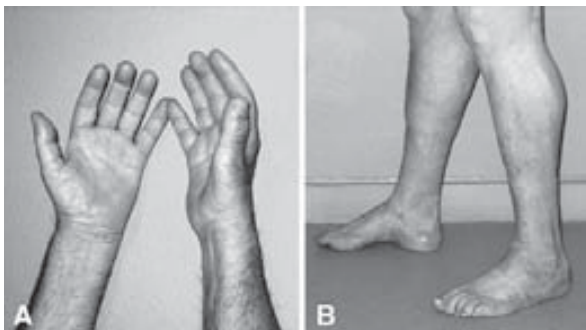


Fig. 2. Proband of the family (I₁): A) Thenar and hypothenar muscle atrophy, predominantly in the left hand. B) Calves hypertrophy and *pes cavus*.

II₂: A 22-year-old woman, the first granddaughter of the proband, was examined at the age of 16, detecting hyperckemia (1177 U/L), PIRC in biceps brachii muscle, calf hypertrophy and *pes cavus*. No evidence of motor deficit has been demonstrated to date.

III₃: A 23-year-old woman presented exercise-induced myalgias and muscle stiffness, predominantly in calves since the age of fifteen. Neurological examination at this age only revealed *pes cavus*, and a high serum CK level (1357 IU/L). Neither muscle hyperexcitability nor motor deficit has been demonstrated.

2.2. Muscle biopsy studies

An open biopsy sample from the left biceps brachii muscle was taken from the proband under local anesthesia and after the patient's informed consent. Routine histochemical stainings were performed on 7 μ transverse sections of frozen muscle with hematoxylin and eosin, modified Gomori trichrome, NADH, SDH and ATPase at basic and acid pH. Immunohistochemistry was performed on gelatinized slides and avidin–biotin complex peroxidase system. Mouse monoclonal antibodies directed against the three different domains of dystrophin (Dys1, Dys2, Dys3), the α , β , γ , δ sarcoglycans, utrophin, dysferlin, (all from Novocastra Laboratories, New Castle upon Tyne, UK) and *Cav-3* (Transduction Laboratory; San Diego, CA) were used. A control muscle biopsy was taken from a patient diagnosed with normal muscle biopsy.

For ultrastructural studies, a small fragment was trimmed into tiny rectangular pieces; fixed in 2.5% of glutaraldehyde, postfixed in osmium tetroxide and embedded in Epon after routine dehydration. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were mounted on copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips CM100 electron microscope.

2.3. Molecular genetic studies

Total genomic DNA from peripheral blood of the seven patients and three family relatives (all subjects gave their informed consent) was amplified for the two exons of the *Cav-3* gene by the polymerase chain reaction (PCR). Primers and conditions used were those described by Minetti et al. [6] The samples were purified with a QIAquick column PCR purification kit (QIAGEN), and analysed by direct forward and

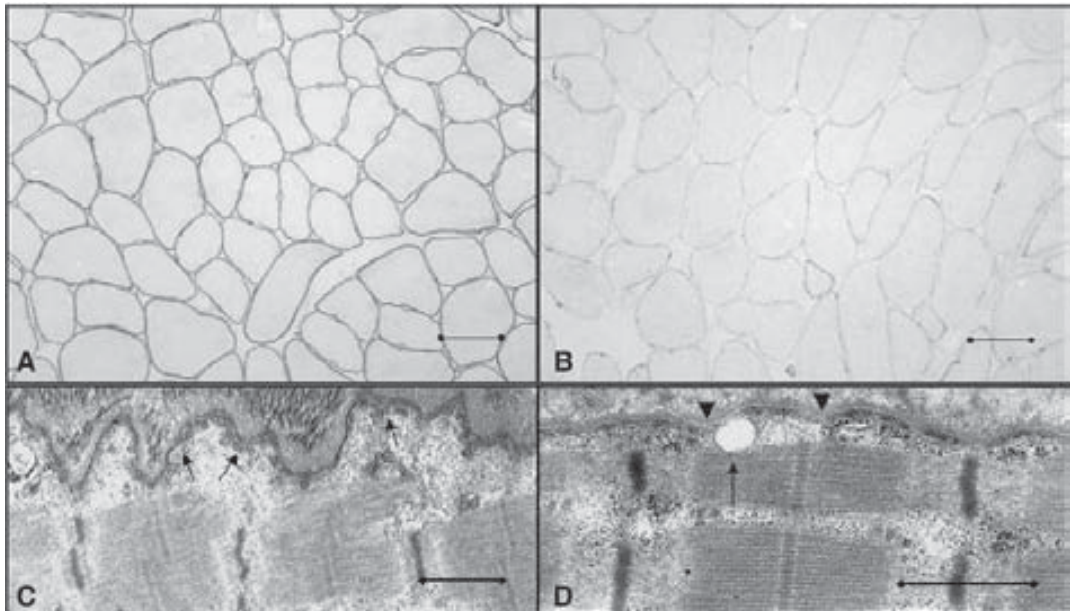


Fig. 3. A and B: Immunohistochemical staining for caveolin-3 antibody of muscle biopsies from a normal control and from the proband. Caveolin-3 expression is severely reduced in the muscle of the proband (B) as compared with the control (A). Original magnification $\times 200$. Bars equal to $50 \mu\text{m}$. C and D: Electron micrographs from a control muscle (C) and from the proband (D). Note normal caveolae (arrows) in C. Original magnification $\times 6600$. Micrograph from the proband's muscle shows focal loss of sarcolemma (arrowheads), absent normal caveolae and large vacuoles in the subsarcolemmal space, measuring from 20 to 45 nm (arrow). Original magnification $\times 11,500$. Bars equal to $1 \mu\text{m}$.

reverse sequencing, using a DNA sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 3100 Avant genetic Analyzer.

3. Results

3.1. Muscle biopsy

There were no dystrophic changes. Slight variation in fiber size and increased number of internal nuclei were the only changes seen with routine histochemical stains. Cav-3 expression was greatly reduced in the sarcolemma as compared with the control muscle biopsy sample. A moderate reduction of the intensity of dysferlin immunolabelling was also observed as compared with the control. Electron microscopy revealed focal loss of sarcolemma, abnormal sarcolemmal folding, absent normal caveolae and enlarged subsarcolemmal space with large vacuoles measuring from 20 to 45 nm (Fig. 3).

3.2. Molecular genetic studies

A G→A transition at nucleotide position 80 in exon 1 of the CAV-3 gene (c.80G>A), generating a Arg→Gln change at codon 27 (p.R27Q) of the amino acid chain in heterozygous state, was detected in the proband (I₁) as well as in the other affected individuals of the family (II₁, II₂, II₃, II₅, III₂ and III₃). It was not found in genomic DNAs from unaffected individuals (II₄, III₁ and III₄). This mutation was described elsewhere (www.dmd.nl). Two different polymorphisms were identified at exon 1 (c.27C>T, c.99C>T) and one in exon 2 (c.123T>C), all of them previously described (www.dmd.nl). Individual II₁ presented c.27C>T and c.123T>C, individual III₂ c.123T>C and individual III₃ c.99C>T.

4. Discussion

We report a Spanish family with a hand-involved autosomal dominant distal myopathy, which becomes apparent clinically in the fourth or fifth decade of life, associated with a Cav-3 mutation. In

addition, muscle hyperexcitability signs and hyperckemia were observed in the youngest members who did not present muscle weakness in hands but the genetic study also revealed a Cav-3 mutation.

Distal myopathy associated with caveolinopathy was first described by Tateyama et al. [7] The distal myopathy reported herein is characterised by thenar and hypothenar muscle atrophy and paresis of interossei and opponens pollicis muscles, slow progression and benign course.

The presence of muscle hyperexcitability suggested an underlying RMD [8,9]. Furthermore, RMD is one of the phenotypes associated with caveolinopathy. Muscle stiffness, exercise-induced pain and cramps are the most common symptoms. PIRC and PIMM are the most striking findings, but rolling movements across the muscle (rippling) constitute the most specific sign [5,8]. In addition, moderate hyperckemia (<10 normal value fold) is frequent in RMD. Calf hypertrophy has also been described [5].

Neurological examination of the reported family showed PIRC in patients I₁, II₂, III₂, PIMM in II₂, moderate hyperckemia in all the affected patients with a range between 452–1357 UI/L, and calf hypertrophy in subjects I₁, II₁, II₂, I₃ and III₂. III₃ is the only patient who presented symptoms such as myalgia and muscle stiffness but muscle hyperexcitability has not been observed to date.

Immunohistochemical studies revealed an almost absent Cav-3 expression on the sarcolemma in the proband. Molecular analysis showed a heterozygous p.R27Q mutation within exon 1 in Cav-3 gene in all affected patients but it was not found in the unaffected members of the family. This mutation was identified in different families presenting different phenotypes (www.dmd.nl).

The presence of a RMD and a distal myopathy within the same family, or even in the same patient, has recently been described [4,5]. Our family presents some peculiarities different from previous reports.

In the first place, the late onset hand-involved distal myopathy constitutes the pattern of presentation of caveolinopathies although signs of muscle hyperexcitability, hyperckemia and calf hypertrophy

were observed in the youngest relatives who were asymptomatic (except the patient III-3). In the second place, patients II₂ and II₃, who were examined at ages 26 and 21 respectively presenting hyperckemia, calf hypertrophy, PIRC and PIMM, developed the first motor symptoms 10 years after.

This suggests that signs of muscle hyperexcitability, in addition to hyperckemia and calf hypertrophy, constitutes a possible predictive factor in developing distal myopathy, and consequently, individuals II₅, III₂ and III₃, in whom the mutation was found, are probably at risk of developing a hand-involved distal myopathy in the future .

References

- [1] Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, et al. Expression of Caveolin-3 in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:15160–5.
- [2] Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, et al. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2 and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 1998;804:177–92.
- [3] Woodman SE, Sotgia F, Galbiati F, Minetti C, Lisanti MP. Mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology* 2004;62:538–43.
- [4] Fischer D, Schoroers A, Blümcke I, Urbach H, Zerres K, Mortier W, et al. Consequences of a novel caveolin-3 mutation in a large German family. *Ann Neurol* 2003;53:233–41.
- [5] Yabe I, Kawashima A, Kikuchi S, Higashi T, Fukazawa T, Hamada T, et al. Caveolin-3 gene mutation in Japanese with rippling muscle disease. *Acta Neurol Scand* 2003;108:47–51.
- [6] Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;18:365–8.
- [7] Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, et al. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology* 2002;58:323–5.
- [8] Torbergson T. Rippling muscle disease. *Muscle Nerve* 2002(Suppl 11):S103–7.
- [9] Lamb GD. Rippling muscle disease may be caused by silent action potentials in the tubular system of skeletal muscle fibers. *Muscle and Nerve* 2005;31:652–8.

8. BIBLIOGRAFIA

Achanzar WE and Ward S (1997) A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci* **110 (Pt 9)**: 1073-1081

Anderson LV and Davison K (1999) Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* **154**: 1017-022

Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougerousse F, Beckmann JS, Bushby KM (1999) Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* **8**: 855-861

Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KM (2000) Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* **10**: 553-559

Bansal D and Campbell KP (2004) Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* **14**: 206-213

BIBLIOGRAFÍA

Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* **423**: 168-172, doi:10.1038/nature01573

Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira Ede S, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K(1998) A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* **20**: 37-42, doi:10.1038/1689

Bashir R, Keers S, Strachan T, Passos-Bueno R, Zatz M, Weissenbach J, Le Paslier D, Meisler M, Bushby K (1996) Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. *Genomics* **33**: 46-52, doi:10.1006/geno.1996.0157

Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben Hamida C, Belal S, Miller RG, McKenna-Yasek D, Weissenbach J, Rowland LP (1995) Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology* **45**: 768-772

Ben Hamida M, Fardeau M, Attia N (1983) Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia.

Muscle Nerve 6:469-480, doi:10.1002/mus.880060702

Bushby KM and Beckmann JS (1995) The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul*

Disord 5: 337-343

Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Pan Z, Nishi M, Komazaki S, Takeshima H, Ma J (2009a) MG53 regulates membrane budding

and exocytosis in muscle cells. *J Biol Chem* 284: 3314-3322, doi:10.1074/jbc.M808866200

Cai C, Weisleder N, Ko JK, Komazaki S, Sunada Y, Nishi M, Takeshima H, Ma J (2009b) Membrane repair defects in muscular

dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *JBiol Chem* 284: 15894-15902,

doi:10.1074/jbc.M109.009589

Campanaro S, Romualdi C, Fanin M, Celegato B, Pacchioni B, Trevisan S, Laveder P, De Pitta C, Pegoraro E, Hayashi YK, Valle

G, Angelini C, Lanfranchi G (2002) Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray. *Hum Mol*

Genet 11: 3283-3298

BIBLIOGRAFÍA

Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jorgensen LH, Laval SH, Charlton R, Barresi R, Straub V, Lochmuller H, Bushby K (2009) Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **18**: 1976-1989, doi:10.1093/hmg/ddp121

Cupler EJ, Bohlega S, Hessler R, McLean D, Stigsby B, Ahmad J (1998) Miyoshi myopathy in Saudi Arabia: clinical, electrophysiological, histopathological and radiological features. *Neuromuscul Disord* **8**: 321-326

den Dunnen JT and Antonarakis SE (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* **109**: 121-124

Duchenne de Boulogne G (1973) Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, ou paralysie myo-sclerosique.

Edwards AS and Newton AC (1997) Regulation of protein kinase C betaII by its C2 domain. *Biochemistry* **36**: 15615 - 15623, doi:10.1021/bi9718752

Erb W (1891) Dystrophia Muscularis Progresiva: Klinische und pathologisch anatomische studien. *DtschZ Nervenheilk* **1**: 173

Foxton RM, Laval SH, Bushby KM (2004) Characterisation of the dysferlin skeletal muscle promoter. *Eur J Hum Genet* **12**: 127-131, doi:10.1038/sj.ejhg.5201092

Fukuhara N, Kumamoto H, Matsubara S, Takamori M (1984) Comparison of distal myopathy and distal muscular dystrophy from the standpoint of muscle pathology. : 186-189

Gowers WR (1902) A Lecture on Myopathy and a Distal Form: Delivered at the National Hospital for the Paralysed and Epileptic. *Br Med J* **2**: 89-92

Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, Cagliani R, Mora M, Fortunato F, Bordoni A, Del Bo R, Ghezzi S, Pagliarani S, Lucchiari S, Salani S, Zecca C, Lamperti C, Ronchi D, Aguenouz M, Ciscato P, Di Blasi C, Ruggieri A, Moroni I, Turconi A, Toscano A, MoggioM, Bresolin N, Comi GP (2008) Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* **29**: 258-266, doi:10.1002/humu.20642

Han R and Campbell KP (2007) Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 409-416, doi:10.1016/j.ceb.2007.07.001

BIBLIOGRAFÍA

Han R, Frett EM, Levy JR, Rader EP, Lueck JD, Bansal D, Moore SA, Ng R, Beltran-Valero de Bernabe D, Faulkner JA, Campbell KP (2010) Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *J Clin Invest* **120**: 4366-4374, doi:10.1172/JCI42390; 10.1172/JCI42390

Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH (2002) A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* **51**: 129-133

Huang Y, de Morree A, van Remoortere A, Bushby K, Frants RR, Dunnen JT, van der Maarel SM (2008) Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **17**: 1855-1866, doi:10.1093/hmg/ddn081

Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH (2001) Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* **49**: 130-134

Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, Markova ED, Wrogemann K (2000) Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* **55**: 1931-1933

Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, Charlton R, Roberts M, Straub V, Barresi R, Lochmuller H, Bushby K (2010) New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**: 946-953, doi:10.1136/jnnp.2009.178038

Klinge L, Dean AF, Kress W, Dixon P, Charlton R, Muller JS, Anderson LV, Straub V, Barresi R, Lochmuller H, Bushby K (2008) Late onset in dysferlinopathy widens the clinical spectrum. *Neuromuscul Disord* **18**: 288-290, doi:10.1016/j.nmd.2008.01.004

Krahn M, Beroud C, Labelle V, Nguyen K, Bernard R, Bassez G, Figarella-Branger D, Fernandez C, Bouvenot J, Richard I, Ollagnon-Roman E, Bevilacqua JA, Salvo E, Attarian S, Chapon F, Pellissier JF, Pouget J, Hammouda el H, Laforet P, Urtizberea JA, Eymard B, Leturcq F, Levy N (2009a) Analysis of the DYSF

BIBLIOGRAFÍA

mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat* **30**: E345-75, doi:10.1002/humu.20910

Krahn M, Borges A, Navarro C, Schuit R, Stojkovic T, Torrente Y, Wein N, Pecheux C, Levy N (2009b) Identification of different genomic deletions and one duplication in the dysferlin gene using multiplex ligation-dependent probe amplification and genomic quantitative PCR. *Genet Test Mol Biomarkers* **13**: 439-442, doi:10.1089/gtmb.2009.0010

Krahn M, Labelle V, Borges A, Bartoli M, Levy N (2010) Exclusion of mutations in the dysferlin alternative exons 1 of DYSF-v1, 5a, and 40a in a cohort of 26 patients. *Genet Test Mol Biomarkers* **14**: 153-154, doi:10.1089/gtmb.2009.0131

Kuhn E and Schroder JM (1981) A new type of distal myopathy in two brothers. *J Neurol* **226**: 181-185

Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH, Jr (1998a) Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi

myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* **20**: 31-36, doi:10.1038/1682

Lo HP, Cooper ST, Evesson FJ, Seto JT, Chiotis M, Tay V, Compton AG, Cairns AG, Corbett A, MacArthur DG, Yang N, Reardon K, North KN (2008) Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscul Disord* **18**: 34-44, doi:10.1016/j.nmd.2007.08.009

Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH, Jr (2001) The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **10**: 1761-1766

Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK (2005) Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 334-340

Meryon E (1852) *On granular & fatty degeneration of the voluntary muscles.*

BIBLIOGRAFÍA

Miller RG, Blank NK, Layzer RB (1979) Sporadic distal myopathy with early adult onset. *Ann Neurol* **5**: 220-227, doi:10.1002/ana.410050303

Miyoshi K, Iwasa M, Kawai H (1982) Autosomal recessive distal muscular dystrophy: a new genetical entity of progressive muscular dystrophy. : 471-483

Miyoshi K, Saijo K, Kuryu Y, Tada Y, Otsuka Y, Oshima Y, et al. (1967) Four cases of distal myopathy in two families. : 113

Miyoshi K, Tada Y, Iwasa M, Kawai H, Nakano M. (1974) Genetical types of distal myopathy. Personal observations of 14 cases in 7 families and other cases in Japan. **14**: 963

Miyoshi K (1977) Genetical types of progressive muscular dystrophy (author's transl)]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* **66**: 769-775

Miyoshi K, Iwasa M, Kawai H, Sasaki N, Kusaka K, Yagita M, Hiasa M, Tada Y (1977) Autosomal recessive distal muscular dystrophy--a new type of distal muscular dystrophy observed characteristically in Japan]. *Nippon Rinsho* **35**: 3922-3928

Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H (1986) Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* **109 (Pt 1)**: 31-54

Murakami S (1975) A case of myopathy localized bilaterally in distal parts of the lower limbs. **36**: 513-516

Nagaraju K, Rawat R, Veszelszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S, Raben N, Plotz P, Hoffman EP (2008) Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol* **172**:774-785, doi:10.2353/ajpath.2008.070327

Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, Gomez H, Cabello A, Illa I, Gallano P (2009) A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* **19**:21-25, doi:10.1016/j.nmd.2008.09.015

Pramono ZA, Tan CL, Seah IA, See JS, Kam SY, Lai PS, Yee WC (2009) Identification and characterisation of human dysferlin transcript variants: implications for dysferlin mutational screening and isoforms. *Hum Genet* **125**: 413-420, doi:10.1007/s00439-009-0632-y

BIBLIOGRAFÍA

Rosales XQ, Gastier-Foster JM, Lewis S, Vinod M, Thrush DL, Astbury C, Pyatt R, Reshmi S, Sahenk Z, Mendell JR (2010) Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve* **42**: 14-21, doi:10.1002/mus.21650

Sanger F and Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**: 441-448

Santa S, Tahira T, Uehera M, Tamura K (1975) Muscular dystrophy: atypical cases. **3**: 221-227

Scoppetta C, Vaccario ML, Casali C, Di Trapani G, Mennuni G (1984) Distal muscular dystrophy with autosomal recessive inheritance. *Muscle Nerve* **7**: 478-481, doi:10.1002/mus.880070610

Selcen D, Stilling G, Engel AG (2001) The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* **56**: 1472-1481

Stevenson A (1953) Muscular dystrophy in Northern Ireland. : 50-91

Takata Y, Kobayashi T, Hiwada K, Kokufu T, Hatakenaka Y (1984) Two cases of autosomal recessive distal muscular dystrophy. **73**: 1246

Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M (2009) Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry* **48**: 2377-2384, doi:10.1021/bi802242r

Ueyama H, Kumamoto T, Nagao S, Masuda T, Horinouchi H, Fujimoto S, Tsuda T (2001) A new dysferlin gene mutation in two Japanese families with limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Neuromuscul Disord* **11**: 139-145

Urtizberea JA (1996) Management of children with neuromuscular diseases: evaluation of 10 years of networks]. *Arch Pediatr* **3 Suppl 1**: 318s-320s

Walter MC, Braun C, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, Schmidt C, Schreiber H, Knirsch UI, Brummer D, Muller-Felber W, Pongratz D, Muller-Hocker J, Huebner A, Lochmuller H (2003) Variable reduction of caveolin-3 in patients with LGMD2B/MM. *J Neurol* **250**: 1431-1438, doi:10.1007/s00415-003-0234-x

BIBLIOGRAFÍA

Walton JN (1991) The muscular dystrophies. In: Walton JN, editor. Disorders of voluntary muscle. p. 519-68

Walton JN (1954) On the clasification, natural history and treatment of the myopathies. **77**: 169-231

Walton JN and Natrass FJ (1954) On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* **77**: 169-231

Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, Nylen E, Keers S, Vafiadaki E, Greenberg CR, Bushby CR, Wrogemann K (1999) Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet* **8**: 871-877

Weisleder N, Takeshima H, Ma J (2009) Mitsugumin 53 (MG53) facilitates vesicle trafficking in striated muscle to contribute to cell membrane repair. *Commun Integr Biol* **2**: 225-226

Welander L (1951) Myopathia distalis tarda hereditaria. **141 (supplement 265)**: 1-124