



TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat: Bioquímica i Biologia Molecular. Opció Bioquímica Clínica i Patologia Molecular. Bienni 93-95

ANÀLISI GENÈTICO-MOLECULAR D'UNA NOVA FORMA DE DISTRÒFIA MUSCULAR DE MALUC AUTOSÒMICA DOMINANT EN UN EXTENS PEDIGRÍ

Memòria presentada per Lluís Palenzuela i Díaz per optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular

Tesi doctoral realitzada conjuntament al Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular dels Hospitals Vall d'Hebron de Barcelona i al Departament de Neurologia de la Universitat de Columbia a Nova York, sota la co-direcció del Dr. Antoni L. Andreu i el Dr. Michio Hirano

Tesi adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona

Tutor: Dr. Simó Schwartz Riera

L'interessat:

Lluís Palenzuela i Díaz

Els Directors de la tesi:

Dr. Antoni L. Andreu i Périz

Dr. Michio Hirano

A la meva família...

Agraïments

Sempre amb el risc d'oblidar a algú, voldria expressar el meu agraïment a moltes persones que han estat importants per a mi abans, durant i m'agradaria que també després d'aquesta tesi.

En primer lloc, una especial i carinyosa menció als meus pares, que tot i saber de les dificultats que implica tot el que he tractat de fer, sempre m'han recolzat i ajudat. Són molts els favors que he rebut per manca de temps i poques les hores que he pogut compartir darrerament amb ells.

No menys carinyós vol ser el meu record per la meva germana, que els que em tracten i coneixen una mica saben com la porto amb mi. Són uns quants els moments difícils que recordo tirant de la seva espatlla.

També gràcies a les àvies, avis, tiets i cosins, alguns ja no entre nosaltres pero igualment presents per mi.

A en Toni, gràcies al qual he pogut arribar a prendre contacte directe amb la recerca, a viure experiències noves i molt valuoses i a desenvolupar un projecte divertit, superant moments difícils i rebent bons consells.

A l'Anna, per acollir-me, recolzar-me i animar-me en tot moment, fent possible que visqués en un ambient de recerca autèntic, de gran nivell i molt enriquidor.

Al Dr. Callís, el meu gran introductor i recolzament a l'hospital, en el qual tant he après i tant bona gent he conegut.

Al Dr. Castellanos i tots els companys del laboratori d'Hormones, on tant vaig aprendre i tant a gust m'hi vaig trobar en els meus primers contactes amb la ciència.

A tants i tants companys que he tingut al laboratori: David i Òscar, la ciència combinada amb l'atletisme; Cristina C., per aquelles abundants "perdona, una pregunta" ; Cristina A., gran companya d'escriptori; Cristina P., aquí i allà; Olga, gran treballadora; Montse, la dolceta; Anna M., la facility aventurera; Maya, la meva primera "profà" al lab, de gran sensibilitat, tot i no apreciar els meus acudits; Joan, per la seva immensa paciència i eterna disponibilitat a ajudar-te. També record per les Núries, Tòfol, Ricardo, Israel, Toni S., els nous, etc...

Als meus amics, pels moments d'evasió, per les nits a Port, les escapades a la neu i aquella magnífica sensació de no passar els anys.

I would like to gratefully acknowledge Dr. Michio Hirano for his enthusiasm, help and patience. I felt like at home in his lab, where I lived new and exciting experiences.

ÍNDEX

<u>RESUM</u>	1
<u>INTRODUCCIÓ</u>	3
1. FISIOLOGIA DEL MÚSCUL	5
2. LA UNIÓ NEUROMUSCULAR	9
3. EL COMPLEX DITROFINA-GLICOPROTEÏNA (DGC)	14
3.1 La distrofina	16
3.2 Altres components del DGC	18
4. LA FILAMINA	21
4.1 Característiques i isoformes	21
4.2 Funcions i interaccions	23
5. DISTRÒFIES MUSCULARS: CARACTERÍSTIQUES FENOTÍPIQUES I GENOTÍPIQUES	25
5.1 Ditròfies musculars de maluc (<i>Limb Girdle Muscle Dystrophies</i> o LGMD)	28
5.2 Classificació i identificació de gens implicats	30
5.2.1 LGMD d'herència autosòmica dominant	32
5.2.1.1 LGMD 1A	32
5.2.1.2 LGMD 1B	33
5.2.1.3 LGMD 1C	34
5.2.1.4 LGMD 1D	35
5.2.1.5 LGMD 1E	36
5.2.1.6 Fenomen d'anticipació	37
5.2.2 LGMD d'herència autosòmica recessiva	38

OBJECTIUS	41
MATERIALS I MÈTODES	45
1. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES	47
2. EXTRACCIÓ D'ADN TOTAL A PARTIR DE SANG TOTAL PERIFÈRICA (MÈTODE <i>SALTING-OUT</i>)	48
2.1 Rentat de les cèl.lules	48
2.2 Lisi d'eritròcits	48
2.3 Lisi de leucòcits i digestió de proteïnes	48
2.4 Extracció salina	49
2.5 Rentat, preparació de la solució i mesura de la concentració.....	49
Tampons-reactius utilitzats.....	50
3. EXTRACCIÓ D'ARN TOTAL (MÈTODE CHOMCZINSKY-SACCHI)	51
3.1 Homogeneïtzació de la mostra	51
3.2 Extracció fenòlica.....	51
Tampons-reactius utilitzats.....	52
4. ANÀLISI DE MICROSATÈLLITS MARCATS AMB FLUORESCÈNCIA	53
4.1 Amplificació de microsatèl.lits polimòrfics mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)	53
4.1.1 Condicions marcadors PE <i>Applied Biosystems</i>	53
4.1.2 Condicions marcadors <i>Research Genetics</i>	55
4.2 Preparació de la mostra per la injecció i anàlisi per fluorescència en l'autoanalitzador <i>ABI PRISM™ 310</i>	56
Tampons-reactius utilitzats.....	56
Taules Marcadors <i>Linkage Mapping Set i Research Genetics</i>	57
Individus inclosos.....	65
5. ANÀLISI DE MICROSATÈLLITS MARCATS AMB P³²	66

5.1 Amplificació per PCR utilitzant encebadors marcats amb P ³²	66
5.2 Preparació del gel d'acrilamida.....	68
5.3 Càrrega de les mostres i electroforesi	68
5.4 Assecat del gel, exposició i revelat	69
Tampons-reactius utilitzats.....	69
Taula Marcadors <i>Research Genetics</i>	70
Individus inclosos.....	71
6. AMPLIFICACIÓ DEL GEN CANDIDAT (FILAMINA C).....	72
6.1 Reacció PCR per l'anàlisi dels exons	72
6.2 Reacció PCR d'obtenció del cADN (ADN complementari) del gen Filamina C	73
Tampons-reactius utilitzats.....	74
Taules encebadors.....	75
7. PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR	78
8. REACCIÓ PCR DE SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA.....	79
9. PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE SEQÜENCIACIÓ	80
10. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA I INJECCIÓ AL SEQÜENCIADOR	81
11. SOUTHERN BLOT (Estudi d'expansió de repeticions de la Filamina C)	82
11.1 Preparació de la sonda	82
11.2 Purificació de la banda del producte a utilitzar com a sonda.....	83
11.3 Tractament de l'ADN amb enzims de restricció.....	83
11.4 Electroforesi, tractament del gel i transferència.....	84
11.5 Marcatge de la sonda amb [α P ³² -dATP]	85
11.6 Purificació i valoració del marcatge de la sonda.....	85
11.7 Pre-hibridació i hibridació.....	86
11.8 Rentats, exposició i revelat.....	86

Tampons-reactius utilitzats.....	87
12. NORTHERN BLOT	88
12.1 Preparació de les sondes.....	88
12.2 Purificació de les sondes	89
12.3 Marcatge de les sondes amb $[\alpha P^{32}]dATP$, purificació i valoració del marcatge	90
12.4 Electroforesi, tractament del gel i trnasferència.....	90
12.5 Pre-hibridació i hibridació.....	91
12.6 Rentats, exposició i revelat.....	91
Tampons-reactius utilitzats.....	91
13. CLONATGE DE BANDES DIFERENCIALS DE LA FILAMINA C-92	
13.1 Amplificació de la regió d'interès i purificació	92
13.2 Reacció de lligació.....	93
13.3 Transformació	93
13.4 Cultiu bacterià.....	94
13.5 Obtenció de l'ADN bacterià.....	94
13.6 PCR de control	94
13.7 Minipreparació de l'ADN plasmídic (Miniprep)	95
Solucions utilitzades.....	96
13.8 PCR de seqüenciació.....	96
Tampons-reactius utilitzats.....	97
14. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DE LA FAMÍLIA OBJECTE D'AQUEST ESTUDI.....	98
15. APROXIMACIÓ METODOLÒGICA A L'ESTUDI GENÈTIC D'AQUEST PEDIGRÍ: ESTUDI D'ANÀLISI DE LLIGAMENT (LINKAGE ANALYSIS).....	103
15.1 Fonament teòric de la tècnica de l'anàlisi de lligament	103
15.2 Càlculs i suport informàtic.....	108

RESULTATS	111
1. ANÀLISI DE MICROSATÈLLITS MARCATS AMB FLUORESCÈNCIA	113
1.1 Exclusió de les 5 regions cromosòmiques de localització de les 5 formes de LGMD autosòmiques dominants prèviament conegudes. Anàlisi de lligament a 3 punts.....	113
1.1.1 Resultats de l'anàlisi de lligament a 3 punts	118
1.2 Estudi <i>wide genomic screening</i> amb marcadors fluorescents repartits pels 22 cromosomes autosòmics. Anàlisi de lligament a 2 punts.....	124
1.2.1 Resultats dels panells inicials	124
1.2.2 Resultats dels marcadors addicionals	147
2. ANÀLISI DE MICROSATÈLLITS DE ADICIONALS MARCATS AMB P³²	150
2.1 Taula Resultats Cromosoma 17.....	153
2.2 Resultats Cromosoma 7.....	154
2.2.1 Taules <i>Lod Scores</i> i mapa de la regió candidata	154
2.2.2 Gel marcador D7S635	156
2.2.3 Anàlisi d'haplotips i delimitació de la regió candidata	158
3. ANÀLISI MUTACIONAL DEL GEN DE LA FILAMINA C I ALTRES GENS CANDIDATS	162
4. SOUTHERN BLOT DE LA FILAMINA C	164
5. NORTHERN BLOT DE LA FILAMINA C	166
6. ESTUDI D'UNA REGIÓ RICA EN G/C. COMPROVACIÓ DE LA PRESENCIA D'EXPANSIONS/REDUCCIONS	167

<u>DISCUSSIÓ</u>	169
1. PEDIGRÍ OBJECTE D'ESTUDI	172
2. EXCLUSIÓ DE LES 5 FORMES LGMD AUTOSÒMIQUES DOMINANTS PRÈVIAMENT DESCRITES.....	173
3. DESCRIPCIÓ DE LA REGIÓ CANDIDATA FINAL AL CROMOSOMA 7.....	174
4. ANÀLISI MUTACIONAL DE GENS CANDIDATS	181
5. ESTUDI EXHAUSTIU DEL GEN DE LA FILAMINA C	182
5.1 Estudi d'una regió susceptible d'expansions al gen de la Filamina C	182
5.2 Anàlisi del nivell d'expressió del gen de la Filamina C	184
5.3 Estudi d'una regió rica en G/C en el gen de la Filamina C. Comprovació de la presència d'expansions/reduccions	185
6. PERSPECTIVES DE FUTUR-ALTRES GENS CANDIDATS.....	186
6.1 ADP- <i>Rybosylation factor 5</i> (ARF5).....	187
6.2 Fascina 3 (FSCN3)	188
6.3 Calumenina.....	190
6.4 LOC63220 (Similar a la subunitat de 14 kDa de l'ATPsa vacuolar).	191
6.5 TRN-SR (Transportina-SR).....	192
6.6 UBE2H (<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2H</i>).....	193
6.7 HSPC216 (<i>Homo Sapiens Hypothetical protein</i>)	195
6.8 KIAA0265 (<i>Kelch-like protein</i>).....	196
<u>CONCLUSIONS</u>	197

REFERÈNCIES..... 201

RESUM

La present tesi ha abordat l'estudi genètico-molecular d'una extensa família espanyola afectada per una nova forma de distròfia muscular de maluc (*Limb-girdle muscle dystrophy*, LGMD) amb herència autosòmica dominant. Un cop definida la clínica de forma detallada s'han comparat les seves característiques amb les de les altres 5 formes autosòmiques dominants prèviament conegudes. Si bé ja alguns dels trets clínics eren diferencials, mitjançant l'anàlisi de lligament de marcadors polimòrfics s'han pogut excloure aquestes 5 formes com a responsables de la malaltia en la família estudiada. Un cop establert que ens trobàvem davant d'una nova forma genèticament diferenciada, s'ha procedit a fer una anàlisi de lligament completa, tot analitzant un ampli grup de marcadors polimòrfics dispersos pels 22 cromosomes autosòmics, comprovant manual i estadísticament la seva segregació respecte el fenotip clínic. Com a resultat, s'ha pogut trobar el *locus* de la malaltia al braç llarg del cromosoma 7, concretament a la regió 7q31-q32. Mitjançant l'estudi de marcadors addicionals i considerant la valuosa informació del 4 individus recombinants trobats en diferents parts del pedigrí, s'ha pogut establir una regió candidata d'unes 3,7 megabases, entre els marcadors D7S680 i D7S2544, dins el mapa genètic del consorci humà i en la qual s'han identificat una sèrie de gens candidats i de *expressed sequence tags* (EST). El continu avenç en el projecte Genoma Humà ha suposat un gran ajut a l'hora de situar i escollir marcadors i gens dins el cromosoma 7.

S'ha estudiat a fons un dels gens candidats, la Filamina C, proteïna que lliga actina. S'ha pogut excloure la Filamina C com a gen responsable de la nostra nova forma de LGMD després de no trobar-se cap mutació present en tots els individus afectes en co-segregació amb la malaltia ni cap alteració en el nivell d'expressió a nivell de mARN (àcid ribonucleic missatger).

Podem concloure que ens trobem davant una nova forma d'LGMD autosòmica dominant genèticament diferenciada que caldria anomenar LGMD1F, segons la nomenclatura de l'OMIM (*On-line Mendelian Inheritance in Man database*).

