

4. SOUTHERN BLOT DE LA FILAMINA C

A la figura 11 veiem el resultat del *Southern Blot* per estudiar la regió no traduïda posterior a l'exó 48 de la Filamina C, que conté 11 repeticions de nucleòtids AC (veure Figura 12) . Per tal de poder esbrinar si existia una expansió de repeticions típica d'entitats neurodegeneratives com la Distròfia miotònica congènita i la oculofaríngea i en relació, en alguns casos, amb el fenomen de l'anticipació, podent afectar al processament, estabilitat i vida mitja de l'ARN, es va procedir a hibridar l'ADN genòmic en la regió 3' del gen de la Filamina C (al final del fragment 29 de PCR, després de l'exó 48) on es troba l'esmentada regió amb una sonda generada per PCR. Es mostren els resultats amb els enzims de restricció *Nae I* i *Nco I* en el pacient 34 i en l'individu control 43. En el cas de l'enzim *Nae I* esperaríem una banda d'unes 1,7 Kb. No veiem aquesta banda ni a control ni a pacient, apareixent una banda comú però de tamany molt més gran. Probablement la digestió no es va produir correctament. La banda inferior lleugerament més petita que es veu al pacient podria ser una inespecificitat i en tot cas, si estiguèssim davant una expansió, el que hauríem de trobar a un individu afecte seria una banda diferencial de major tamany. En quant a l'enzim *Nco I* obtenim la banda del tamany esperat (1,9 Kb) tant a control com pacient. Així, tot i que un enzim no arribés a funcionar correctament, sembla que, a partir del resultat amb *Nco I*, podem dir que no sembla haver-hi una expansió en aquesta regió.

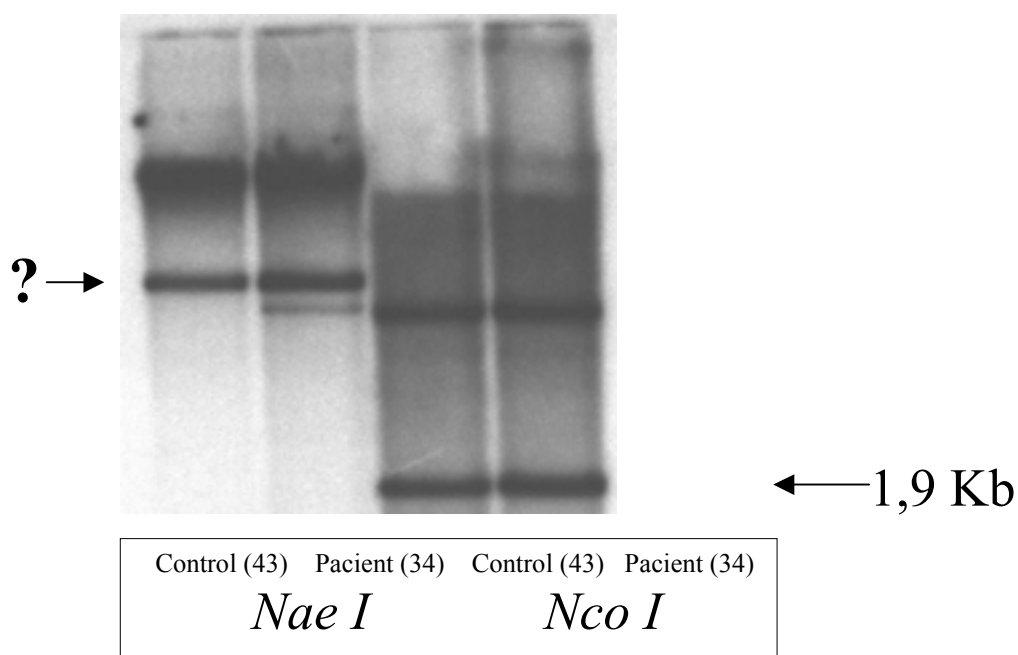


Figura 11: *Southern Blot* de la regió de repeticions AC posterior a l'exó 48 de la Filamina C.

```

27181 GCACTACCGg tgagtgcctg gagctgggga acaggggtgac ttctgggggt gcttggccac
27241 tagtctgggtg ctgctttgct ccagaggtag gggccctgct tcctaagcca ggagtcccca
27301 cagaggctgt ccagggagct ggggcccagt cctcttggc cacaagccct tcctgcctc
27361 agccttgcta cctctggccc ccagGTGTGT CATCAGAGTT CATCGTGAAC ACCCTGAATG
27421 CCGGCTCGGG GGCCTTGTCT GTCAACATTG ATGGCCCCCTC CAAGGTGCAG CTGGACTGTC
27481 GGGAGTGTCC TGAGGGCCAT GTGGTCACTT ATACTCCCAT GGCCCTGGC AACTACCTCA
27541 TTGCCATCAA GTACGGTGGC CCCAGCACATA TCGTGGGCAG CCCCTTCAAG GCCAAGGTCA
27601 CTGgtgagtg ccagtttggg ggaggtccac ccagcctgca gccagccca gcttggaggg
27661 ctccgggtggc cagcacatc taggcatatg tctgccccca gacatcatgg tcagtttacc
27721 agggctagag gtgggctggt ctctacacag tacacgttct gtggagtcgg gcatgatcac
27781 gtaaaaatgc cattcttctt cctcatcgtg gccctcact ccttcagctc tggcctgcgc
27841 tggctcctca ggctctagca ccactttctt ccctcctggc ttcccatatt cctccgctcc
27901 aagaagacac agtcgggtatt gagcaagcct ccctcttga gctgtctgt aggatgagtt
27961 ggggtgggtgt tcctttgtaa agtggctctt accctgtgag tttagcctgag ttcccagaca
28021 aagcctgcaa ggatgagggg cgcagcatct gaggccccag ccttaggggt gagccagat
28081 tggagctggc agctcagggc cctgggtggg aatgaggctg tgctcctaga gtggcccttg
28141 gaggaatttg agggggagcc tcaaatgcag gcagtgagtc ccacaggggtg gcagtgctgg
28201 ccgagggctc cctgcctggg gaagaacagg aagcccttct gactaggttt gtgccccctc
28261 caccacccc tcagGTCCGA GGCTGTCCGG AGGCCACAGC CTTCACGAAA CATCCACGGT
28321 TCTGGTGGAG ACTGTGACCA AGTCTCCTC AAGCCGGGGC TCCAGCTACA GCTCCATCCC
28381 CAAGTTCTCC TCAGATGCCA GCAAGGTGGT GACTCGGGGC CCTGGGCTGT CCCAGGCCTT
28441 CGTGGGCCAG AAGAACTCCT TCACCGTGGG CTGACGAAA GCAGGCAGgt ggcgggggga
28501 gggcgtctcc cggggtgtga gcaagaagcc gtcagggagc aggggtgtggg tcacagttagg
28561 gactccctgg tgtgagcctg tccctctgcc tccctctcca gGCACCAACA TGATGATGGT
28621 GGGCGTGAC GGCCTCAAGA CCCCTGTGA GGAGGTGTAC GTGAAGCACA TGGGGAACCG
28681 GGTGTACAAT GTCACCTACA CTGTCAAGGA GAAAGGGGAC TACATCCTCA TTGTCAAGTg
28741 GGGTGACGAA AGTGTCCCTG GAAGCCCCTT CAAAGTCAAG GTCCCTTGa tcccaaaagt
28801 gcctccccag cctcagcccc cacctccagc cacacacaca ttacacacac acacacacac
28861 acacaaatgt gccacaccca gacacgcaca gaatcagaca ctacaaacac ctgccttggg
28921 ggtgaagtga aggcccagcc tccccacccc accgcgcccc aggggttggg ggacctgtc
28981 tgtgtcagac agtgtocctc cctggaatgt gacatgaggc cgactggggc caggctcagg
29041 ggcagaggct gggacacaag gggctggcga gggctgagc gccaggggag ccctgagttt
29101 ctggcggggc tgagcagtg gggagcattg tgttgtgggt gtctgtgtgt gaggctcacc
29161 tcaaaactgca ccgcccggca gataccctcc tgaccccag gacttggctt ggtctctctg
29221 gtggctacaa ccccagagtt ttaaggactt ggaaaggaaa gcacaatcag agaagaaaac
29281 agccccgaa ccagcaggag tggcctggca catggaccgg cctgagcgat gtgactcca
29341 cccaagccag gctcccaggg ggctgattt ctctctcact gtctcttttt ttaaaatggt
29401 tgcacggctc tgccatgggg ggcctttttt acacactgcg aggccagct ttctagggac
29461 tttgca

```

Figura 12: Seqüència l'ADN genòmic de la Filamina C (Nº d'accés a GenBank: AF252549). En lletres majúscules i subratllades es detallen les parts exòniques. En negreta apareixen els 2 encebadors utilitzats per produir la sonda utilitzada pel *Southern Blot* (F28F entre els exons 45 i 46 i T1R a la regió 3' UTR). En vermell es pot distingir la repetició ac.

5. NORTHERN BLOT DE LA FILAMINA C

Es va valorar el nivell d'expressió de la Filamina C en individus afectes respecte dels sans, tot hibridant l'ARN total amb una sonda de cADN. Com a control de normalització es va hibridar el mateix filtre amb una sonda de ciclofilina A. L'assaig es va realitzar amb mostres dels individus del pedigrí n°s 1 (IV-5), 29 (IV-1), 30 (IV-3) i 31 (V-1) i de 4 controls externs sans. En el moment d'obtenir les biòpsies es considerava que tots quatre individus de la família eren afectes, comprovant-se després d'examins clínics posteriors que només ho eren realment els individus 29 i 31, servint finalment els individus 1 i 30 com a controls interns. Tot i així, a la figura 13 es pot observar que no hi han diferències significatives d'expressió entre individus afectes i sans.

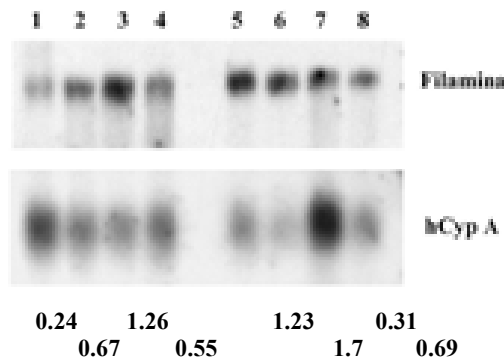


Figura 13 : *Northern Blot* de la Filamina C i de ciclofilina A com a control per normalitzar. Als carrers 1 a 4 es mostra el resultat de 4 individus controls sans externs i als carrers 5 a 8 el resultat de 4 individus del nostre pedigrí (pacients 1, 30, 31 i 29). A la part inferior s'indiquen els valors relatius de densitometria.

6. ESTUDI D'UNA REGIÓ RICA EN G/C. COMPROVACIÓ DE LA PRESENCIA D'EXPANSIONS/REDUCCIONS

Es va tractar d'esbrinar si podia existir un canvi en la seqüència nucleotídica codificant a partir d'una mutació tipus *splicing*, doncs tot observant la seqüència de l'ADN genòmic, hi han certes zones intròniques repetitives de G i C susceptibles de patir expansions o reduccions i que podrien afectar l' *splicing*. Un cop amplificat el cADN de la Filamina C en un individu control extern i en l'individu afecte nº 31 (V-1) entre els exons 21 i 24 (producte de 659 pb) es va trobar la banda esperada en tots dos i a més una banda extra més petita en l'individu afecte (veure Figura 14). Un cop retallades i clonades les bandes de l'individu control i les de l'individu afecte, aquestes es van seqüenciar i les bandes esperades de 659 pb van donar la seqüència normal però la banda més petita adicional que apareixia en l'individu afecte va resultar ser una inespecificitat, doncs al fer una anàlisi de *BLAST* la seqüència no tenia cap semblança amb la del fragment de la Filamina C amplificat. A la Figura 15 es mostra la seqüència genòmica de la Filamina C entre els exons 21 i 24, amb les regions intròniques riques en G/C.

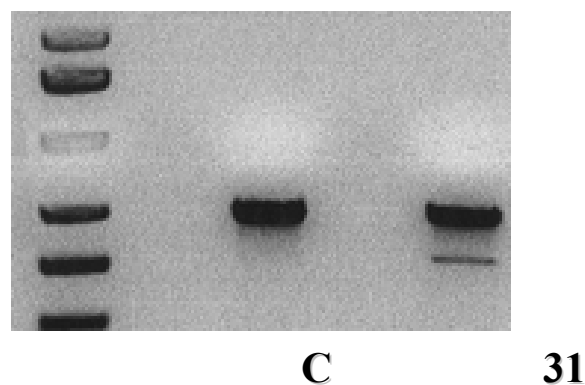


Figura 14: Amplificació del cADN de la Filamina C. El control C presenta la banda esperada de 659 pb i l'individu afecte 31 presenta aquesta banda i una més petita.

15301 CTGACCATTG AGATCCTGTC GGATGCCGGG GTCAAGGCCG **AGGTGCTGAT** **CCACAACAAC** Exó 21
15361 GCGGATGGCA CCTACCACAT CACCTACAGC CCTGCCTTCC CTGGCACCTA CACCATTACC
15421 ATCAAGTATG GCGGGCATCC CGTGCCCAA TTCCCCACCC GTGTCCATGT GCAGCCTGCG
15481 GTCGATACCA GTGGCGTCAA GGTCTCAGGG CCTGGTGTG AGCCACACGg tgagtggaca
15541 ggaggagcca agaaaggtca agtggcaggt gcaggagctg ggtagtccgt gggagggagg
15601 gaagaagagc tgagagctgg aagagcaacc tgggggtaag ggagggctct cggagcagcc
15661 ccagagtcct tactggccca gaaaccccag agaaggagtg gaggggaaga ccgggggtgg
15721 agattggcct ctgctcttgt ggcaaaactg cacctgcctc tgggcgtttt tctggagaga
15781 tctcttcttt catgtgctta aggggtaccc tgatocaaaa agctaaaact ctgctctgga
15841 cgggggcacg gggaaagctt tggggtagag gatgacaaga gtcagaagac agtaagtggg
15901 aatggggccat ctgccagggg ccagaccctg gctaggcatg ggccacggca gagggatgca
15961 agaccagggc ccacagcctg gtgggtgact caagtgaaca gagaatgtca ctacatggag
16021 aagggagtga aggcagaggg tggagctcac agaggtgcag gggaggggtg ggggccaggg
16081 tccgattaga ggagcagcct gggagttggg gagtgggaga ggagggggag aggaggggtg
16141 gagggagggg agaggagggg aagaggagag ggagaggaga gggaaaggag ggggagagga
16201 gagggagcat ctgtgtgaag gctgccccca cccctgctga acacgccacc cctgggctcc
16261 agGTGTCCTG CGGGAGGTGA CCACTGAGTT CACTGTGGAT GCAAGATCCC TAACAGCCAC Exó 22
16321 AGGCGCAAC CACGTGACGG CTCGTGTGCT CAACCCCTCG GGGGCCAAGA CAGACACCTA
16381 TGTGACAGAC AATGGGGACG GCACCTACCG AGTGCAGTAC ACCGCTACG AGGAGGgtga
16441 gggccggtgg gccaggctag tgggcagggc tgggcaagtg ggcagggccg ggatctgatg
16501 atattgccct cggggcagga ggggtggtgg gggcgcacac tccctgattg atgcccctgt
16561 ggctggcttc cagGCGTGCA TCTGGTGGAG GTCCTGTATG ATGAGGTCGC TGTGCCAAG Exó 23
16621 AGCCCTTCC GAGTGGGCGT GACCGAGGGC TGTGATCCCA CCCGCGTCCG AGCCTTCGGG
16681 CCAGGCCTGG AGGGTGGCTT GGTCAACAAG GCCAACCGAT TCACTGTGGA GACCAGgtat
16741 cctccccctt tgctagccta aatctgtgac caccctttcc cagcccctgg ccctcctcgc
16801 tcatcccctc gcctgggctc cagccccacc ccatcctctc tcaggggtga ggcaggagca
16861 gaccccctcc aggaccccag attggcccct gtagctcggt tctcctcagc tgggtcccca
16921 gcggcctgcc ctctttcctc cctgtcccc cattcagcta ctccctcatc ctcactcact
16981 ggtccttatga agctgatggg gggatgttat ctctcagGGG AGCGGGCACC GGGGGCCTTG Exó 24
17041 GCCTAGCCAT CGAGGGTCCC TCGGAAGCCA AGATGTCCTG CAAGGACAAC AAGGATGGTA
17101 GCTGCACCGT GGAGTACATC CCCTTCACTC CTGGAGACTA TGACGTCAAC ATCACCTTCG
17161 GGGGGCGGCC CATCCAGgt gtgcagagag agtggtcggg gtctcagggg agacaagggg

Figura 15: Regió de la Filamina C rica en G/C estudiada per comprovar la presència d'errors d' *splicing*. En negra es destaquen els encebadors per amplificar el cADN. En majúscules i subratllats apareixen els exons i en minúscules les regions intròniques amb diverses seqüències G/C repetitives.