

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



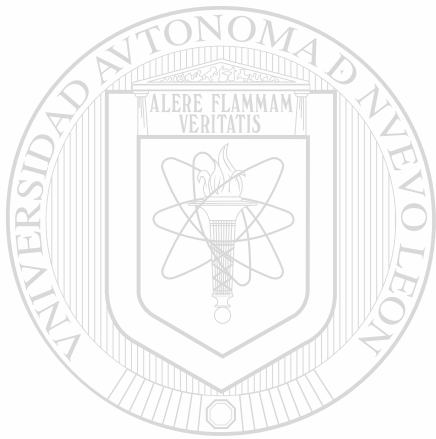
ANALISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACION
DE LA CARDIOMIOPATIA DILATADA LIGADA
AL CROMOSOMA X

POR

MC. ROCIO ORTIZ LOPEZ

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

Agosto, 1999



U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

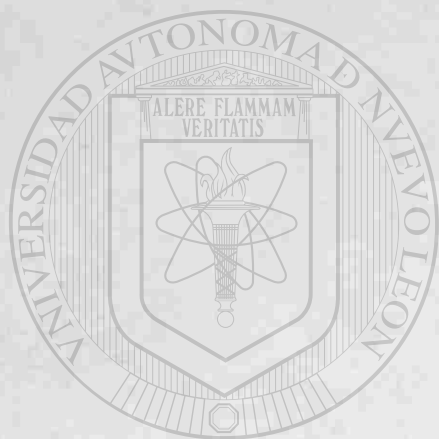
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
RC685
.M9
O7
c.1



1080095048



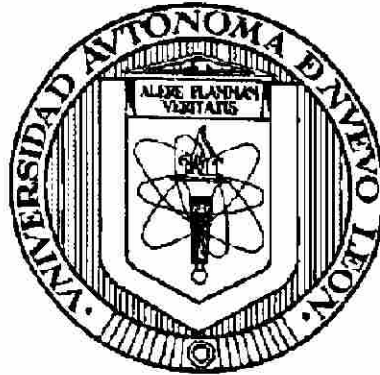
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

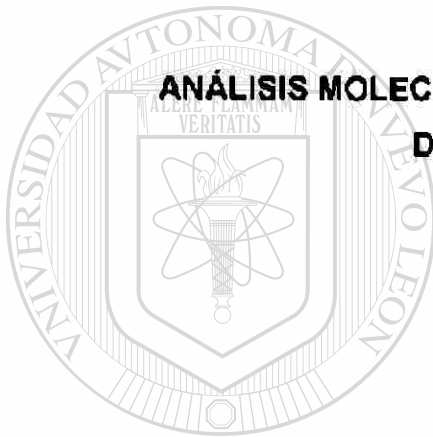


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



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



UANL
POR

MC. ROCIO ORTÍZ LÓPEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

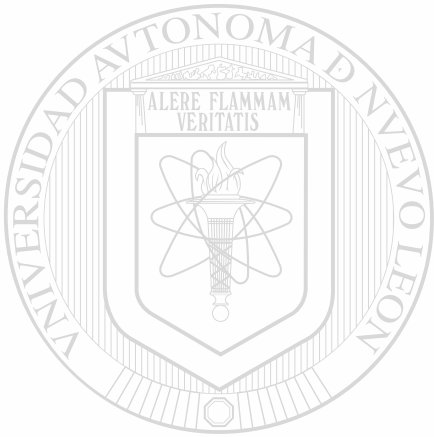


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Monterrey, N.L. Agosto, 1999

RC685
-M9
03
C1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

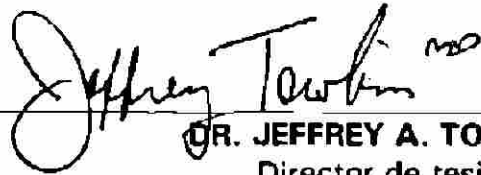
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

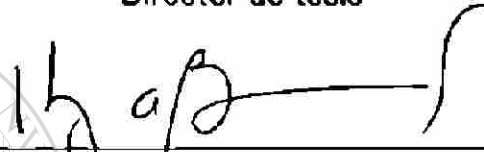


**ANALISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACION DE LA
CARDIOMIOPATIA DILATADA LIGADA AL CROMOSOMA X**

Aprobación de la Tesis:



DR. JEFFREY A. TOWBIN
Director de tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de tesis



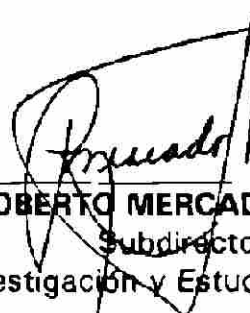
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

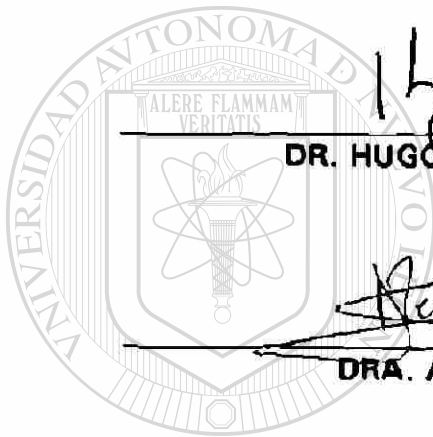


DR. OSCAR DE LA GARZA CASTRO



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector

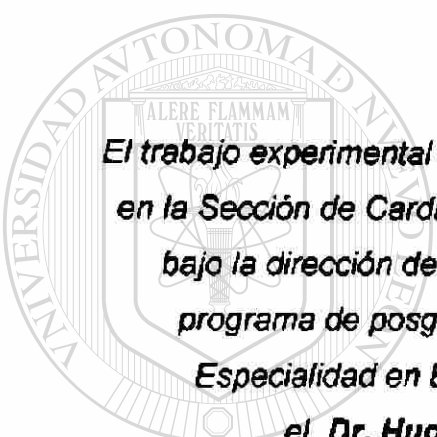
de Investigación y Estudios de Posgrado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Texas Children's Hospital

Pediatric Cardiology
MC2:2280
6621 Fannin
Houston, Texas 77030

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



BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

The Lillie Frank Abercrombie
Section of Cardiology
Department of Pediatrics

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

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

February 8, 1999

To Whom It May Concern:

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

Sincerely yours,

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

JAT:rma

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

SISTEMA GENERAL DE BIBLIOTECAS

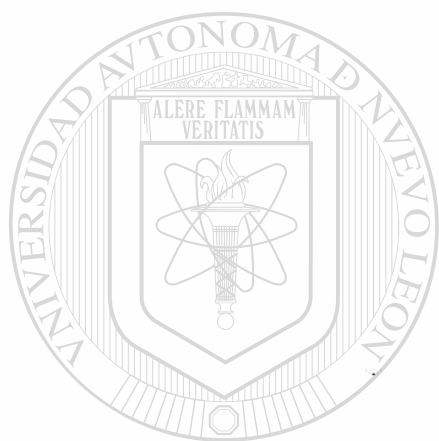


DEDICATORIA:

A mi amor

A mis reyes

A mi familia



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS:

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

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

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

A mi comisión de tesis.

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

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

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

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

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

INDICE

CONTENIDO:

PAGINA:

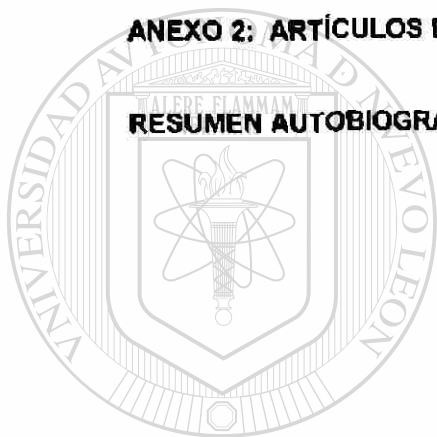
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xli
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
1.1 DISTROFINA	5
1.2 DMD Y DMB	14
1.3 CDLX	17
CAPITULO II	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
2.1 HIPÓTESIS	22
2.2 OBJETIVO	22
2.2.1. Objetivo General	22
2.2.2. Objetivos específicos	22
CAPITULO III	
ESTRATEGIA GENERAL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

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

CAPITULO V RESECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

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

NOMENCLATURA

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

RESUMEN

Rocío Ortiz López
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Agosto de 1999

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

Número de páginas: 90

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

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

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

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

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

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

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

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

FIRMA DEL ASESOR:



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

Las cardiomiopatías primarias fueron clasificadas de acuerdo a un esquema propuesto por Goodwin y cols. (8) quienes distinguen tres grupos de enfermedad cardíaca primaria, según el defecto anatómico y fisiológico predominante (Figura 1).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

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

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

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

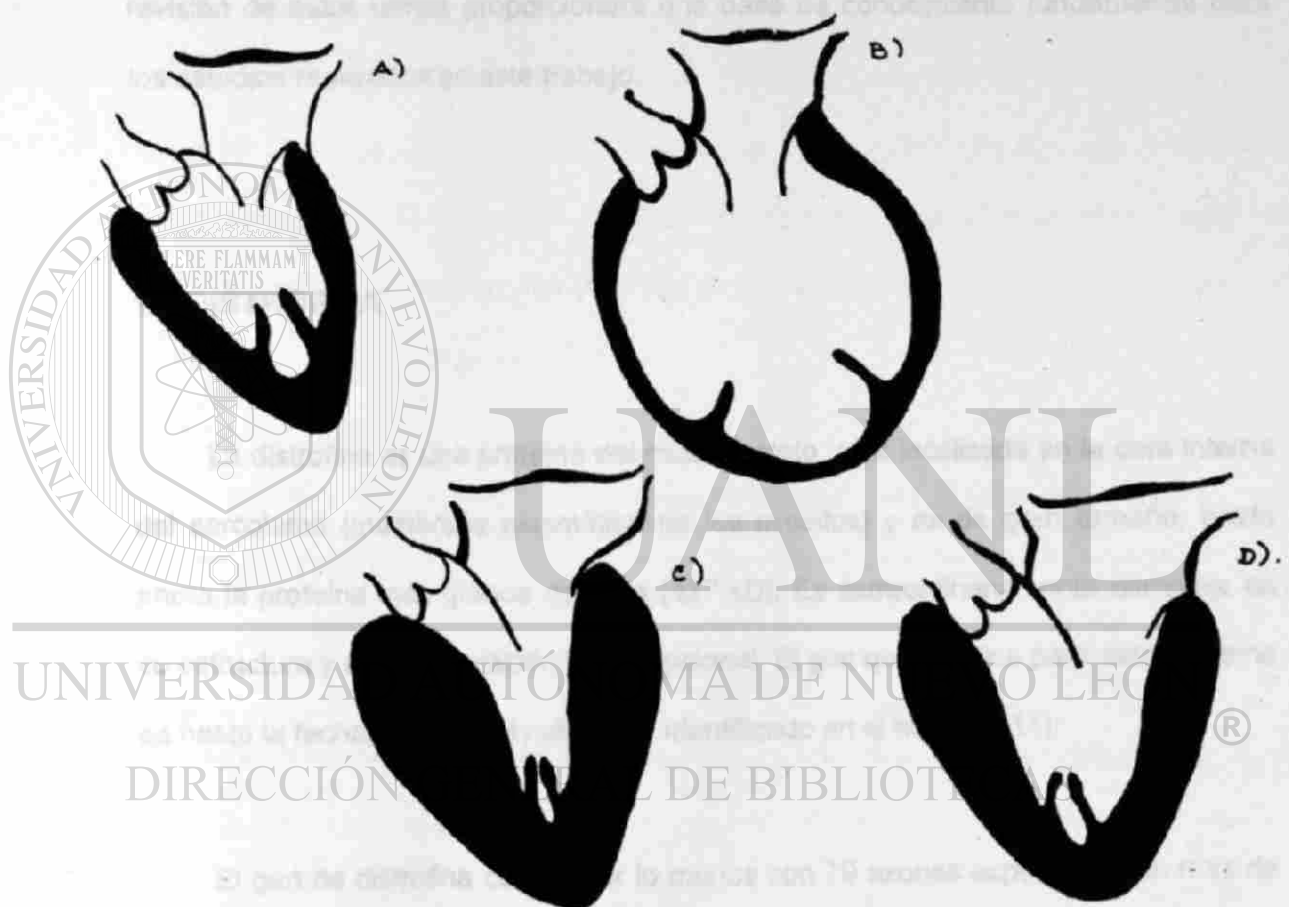


FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA CONSTITUCIÓN DEL MÚSCULO CARDIACO DEPENDIENDO DEL TIPO DE LA CARDIOMIOPATÍA ESTABLECIDA. A) Representa la anatomía del músculo normal. **B)** Músculo característico de la Cardiomiopatía Dilatada, en la que se observa aumento del diámetro ventricular y el músculo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

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



1.1. DISTROFINA

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

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

Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y Distrofia Muscular de Becker (DMB) (13). Las características de estos cuadros clínicos se describirán más adelante.

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

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

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

*=Origen adulto, [†]=Origen fetal, [‡]=Origen fetal y adulto

Tomado de J.Chelly y cols. 1988.

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

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

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

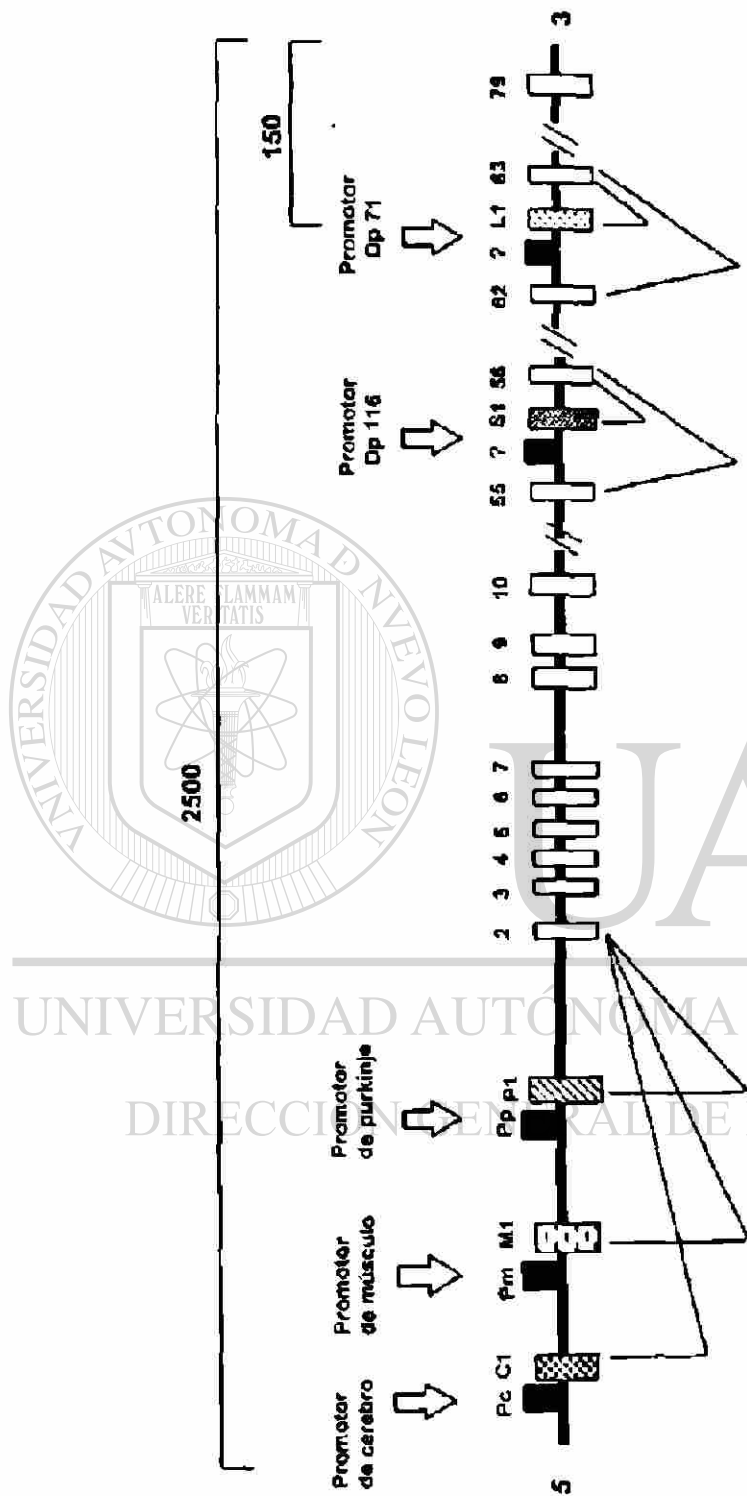


FIGURA 2. LOCALIZACIÓN DE LOS PROMOTORES DEL GEN DE LA DISTROFINA. Las cajas negras representan a los 5 promotores identificados a lo largo del gen. Los tres primeros promotores localizados en la región 5' corresponden a los promotores de cerebro (Pc), de músculo (Pm) y de células de Purkinje (Pp) y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

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

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

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

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

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

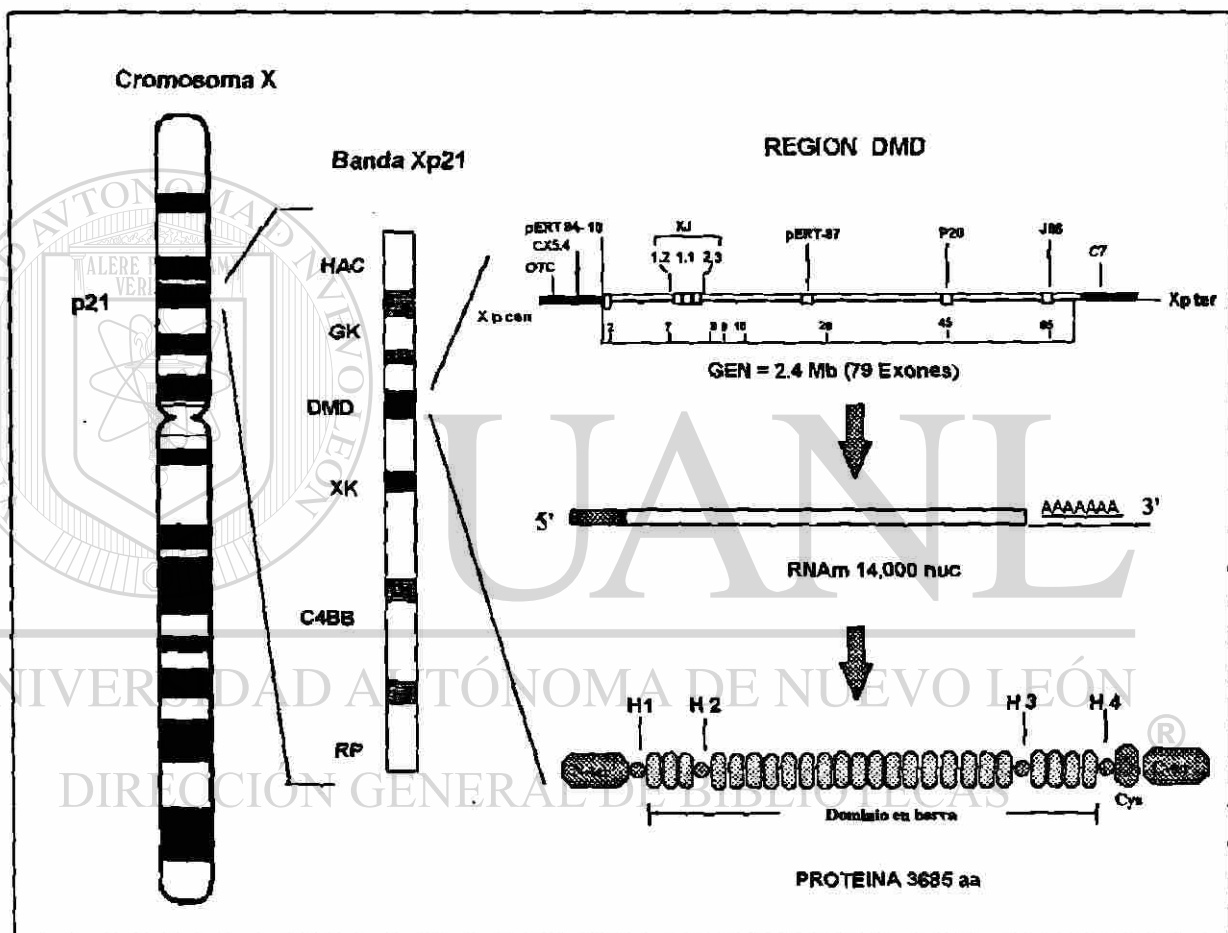


FIGURA 3. LOCALIZACIÓN DEL LOCUS DEL GEN DE LA DISTROFINA.

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

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

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

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

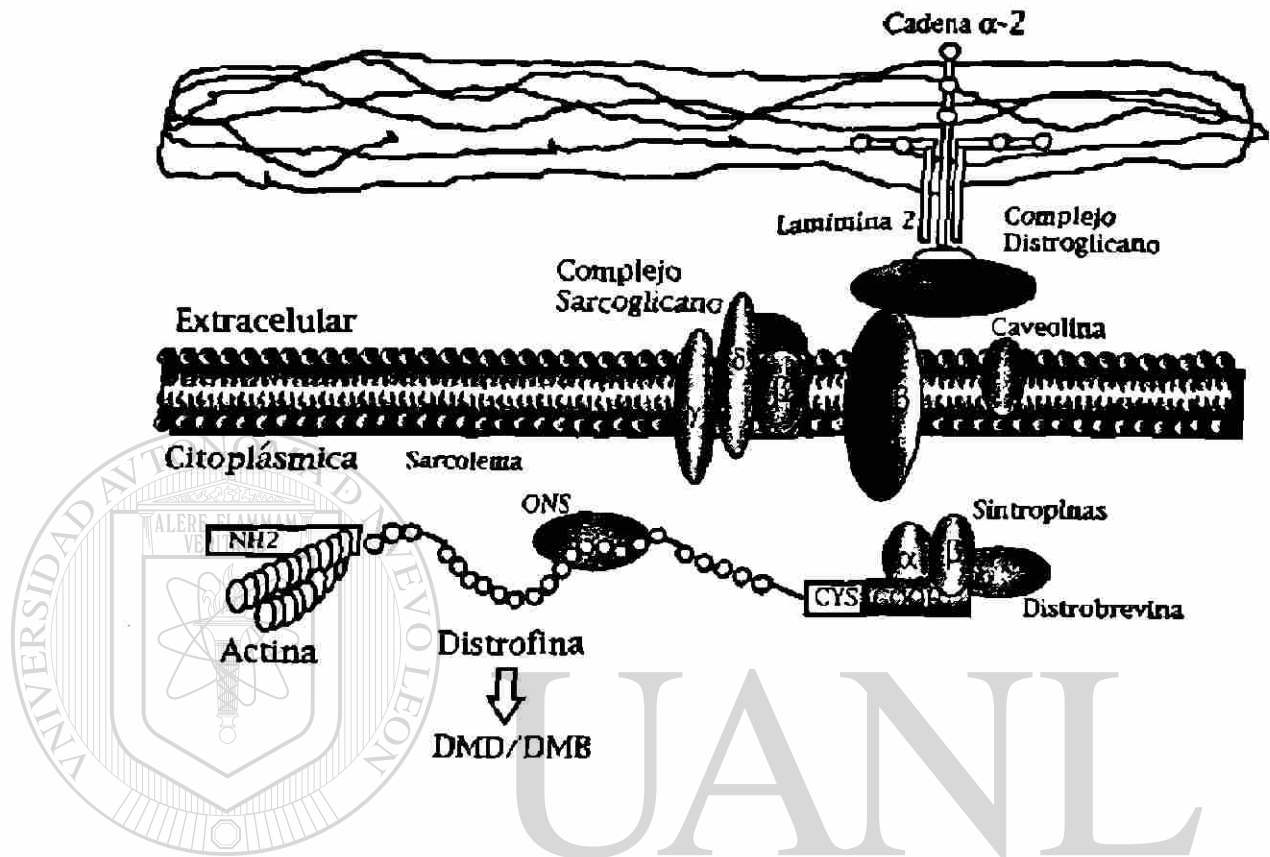


FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A DISTROFINA (DAG). El complejo forma una unión transmembranal entre la matriz extracelular (cadena α -2 y Laminina) y el citoesqueleto intracelular (filamentos de Actina) lo cual se predice, que estabiliza la membrana plasmática de la célula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

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

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

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

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

1.2. DMD Y DMB

La DM es considerada como una de las enfermedades genéticas más desastrosas en la especie humana (32 y 33). Es de las afecciones neuromusculares más comunes en la infancia, con una incidencia de 1 en 4000 niños nacidos. Consiste en un desgaste progresivo del tejido muscular (con pérdida progresiva de la fuerza muscular), esquelético y liso, involucrando además al tejido nervioso en cierto grado. La DMD es el tipo clínico más grave, generalmente se diagnostica entre los 3 a 6 años de edad debido a una debilidad o retraso al caminar.

El individuo afectado presenta una marcha característica, con balanceo bilateral del tronco, el abdomen hacia delante, lordosis lumbar excesiva y los hombros hacia atrás en relación a la pelvis, conocida como marcha andina o de pato (13, 32, 33 y 34).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. CDLX

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO II

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

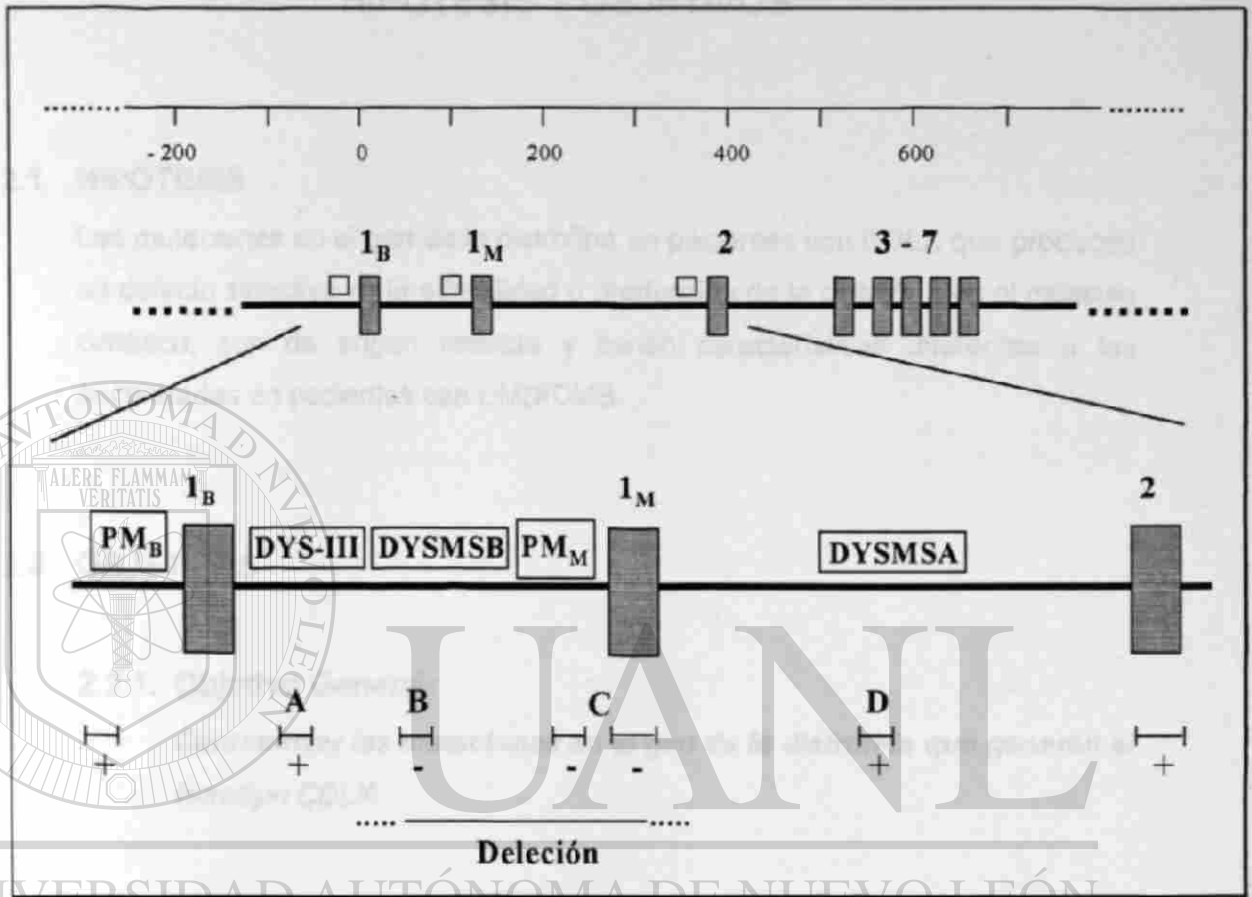


FIGURA 5. ESQUEMA DE LA REGIÓN 5' DEL GEN DE LA DISTROFINA, QUE MUESTRA LA DELECCIÓN DESCRITA POR MUNTONI Y COLS. (20) EN UN PACIENTE CON CDLX.

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

CAPITULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS.

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

2.2. OBJETIVOS

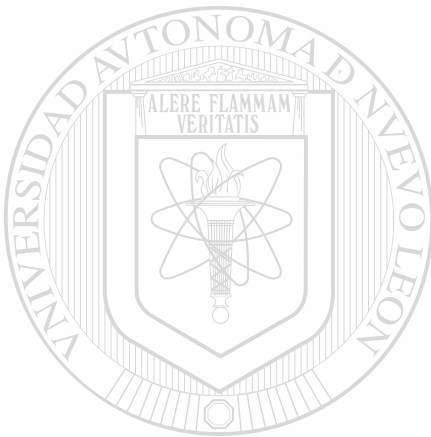
2.2.1. Objetivo General:

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

2.2.2. Objetivos específicos:

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO III

ESTRATEGIA GENERAL

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

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

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

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

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

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

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

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

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

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

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

N/D = No determinado

4.5. LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES. Se utilizó el método

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.9. METODOS:

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

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

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

TABLA 3. SONDAS EMPLEADAS EN LAS HIBRIDACIONES EN FILTRO.

A. SONDAS DE DNAg:

Locus	Sonda	Localización	Enzimas:	Alelos (kpb):
DXS206	XJ1.1	Xp21.2	<i>Taq I</i>	3.1/3.8
DXS206	XJ1.2	Xp21.2	<i>Bcl I</i>	1.7/2.0
DXS164	pERT 84-10	Xp21.1	<i>Taq I</i>	2.8/4.5
DXS164	pERT 87-30	Xp21.2	<i>Bgl II</i>	8.0/30

B. SONDAS DE DNAc:

DNAc	Sonda	Localización	Enzimas:
1-2a	9-7	Xp21.3-21	<i>Hind III, Bgl II, Taq I</i>
2-b3	30-2	Xp21.4	<i>Hind III, Bam HI</i>
4-5a	30-1	Xp21	<i>Hind III</i>

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

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

Tabla 4. Condiciones estándares de la PCR.

A. Componentes de la PCR

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

B. Condiciones de amplificación:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

S = Sentido, A = antisentido

4.9.2.4. Análisis individual de los exones (2 al 10) e intrones (8 y 9). Con

base en la secuencia reportada por Koening y cols.(20 y 22), se diseñaron varios juegos de oligonucleótidos que flanqueaban cada uno de los exones del 2 al 10 del

gen de la distrofina e incluían los sitios aceptores y donadores de empalme. La secuencia de los oligonucleótidos se describe en la tabla 5. Las condiciones de la

PCR son las mismas descritas en la Tabla 3, con excepción de las temperaturas de alineamiento que fueron de 55°C para todo este grupo de oligonucleótidos. Para

amplificar los intrones 8 y 9 se utilizó la combinación de los oligonucleótidos 8S/9A y la 9S/10A, respectivamente.

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

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

4.9.3. ANALISIS DEL DNAC:

4.9.3.1. Síntesis de DNAC: La primera cadena de DNAC se sintetizó a partir de 4 µg de RNA total (preparado como se describió anteriormente). De esta forma, 4 µl de RNA (1 µg/µl) se incubaron en presencia de 20 U de un inhibidor de RNAsas (RNAsin), durante 5 min a 95° C y se transfirieron a hielo inmediatamente. A esta mezcla se le añadió: 1 µl de RNAsin (20 U/µl), 5 µM de oligonucleótido reverso (antisentido), 50 µM de cada uno de los dNTPs, 4 µl de amortiguador de la reacción 5X (5X = 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 250 mM Tris HCl pH 8.3, 375 mM KCl), 200 U de la enzima Transcriptasa Reversa del virus de la leucemia de Moloney y agua DEPC para ajustar a un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37° C durante 1 h. y se congeló a -20° C hasta su uso.

4.9.3.2. RT-PCR. Para el análisis del DNAC de distrofina se utilizaron varios juegos de oligonucleótidos que cubrían los primeros 14 exones del gen y la parte 3' de cada promotor hasta el exón 2. Estos oligonucleótidos fueron derivados de la secuencia reportada por Koenig y cols. (18) y se describen en la Tabla 6. Se utilizaron 2.5 µl de la reacción de DNAC para realizar las PCRs las cuales consistían de un volumen final de 25 µl que contenía: 1.5 mM MgCl₂, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM sulfato de amonio, 0.1 % de Tween 20, 200 µM de cada dNTP, 200 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq DNA polimerasas. Las condiciones de extensión fueron: 94° C por 3 min y 30 ciclos de 92° C por 1 min, 58° C por 1 min y 72° C por 2 min y una extensión final de 5 min a 72° C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

-450	Pm				-400
AAAAAATAA	CTTTGGTAGA	GAGTGGATAGA	TAACAAATGC	ATGGATTAT	TCTGGGCATT
-390					-340
CCTTTTTATT	TGGTAGAGTG	AAATTTTTGG	TGTTGTTGAG	AGGATAAAAA	AGGCATTTAA
-330					-280
AAGTCAATTT	TGAATCCGGA	TTTTCTGCTC	TGTTAATAAA	TTCACATGAA	AGTTACAGAA
-270					-220
AGTATTGTTA	TGCTTTTGTA	CTGAATAGTT	TTTGTTTAA	GAAGGCITTA	AAAGCAAGTA
-210					-160
CTATGTCCAC	TGTGCTATTC	TGGTTTGGAT	ATTAATCAGA	ACCACAGTTG	AGCATTGTTT
-150					-100
GAATTGACAG	AGCTTGCCAT	GCTGGAAGCA	CAACCTTATA	TGTAGTGACC	ATGGACAGTC
-90					-40
CTATTATGGG	AAACCAACTT	GAGAGAGAAG	GCGGGTCACT	TGCTTGTGCG	CAGGTCCTGG
-30			+1		+21
AAITTTGAAAT	ATCCGGGGGC	CTCTACAGAA	TCTTGGCATC	AGTTACTGTG	TTGACTCACT
+31	+1-1S				+81
CAGTGTGGG	ATCACTGACT	TTCCCGCTAC	AGGACTCAGA	TCTGGGAGGC	AATTACCTTC
+91					+141
GGAGAAAAC	GAATAGGAAA	AACTGAAGTG	TTACTTTTTT	TAAAGCTGCT	GAAGTTTGT
+151					+201
GGTTTCTCAT	TGTTTTAAG	CCTACTGGAG	CAATAAAGTT	TGAAGAAGTT	TTACCAGGTT
TTTTTATCG	CTGCCTTGAT	ATACACTTTT	CAAATGCTT	TGGTGGGAAG	AAGTAGAGGA

11-2A

CTGTT gtaagtacaaagtaactaaaaatataatctgtggcataacgtttagtttgacaagctcactaat
 taggtagattgatttaaattatcacagtagttgcaagaagcataaatgttatatactgcatatataatgattt
 attcaggaatataatcttctgggaaaactttcaacagaaatggagtgtaaagttttctttgcatagaacta
 11-1A
 aacacacatgatttcttgattaacaaccactgcag

Figura 5. Secuencia de la región promotora de músculo y el exón 1. Los nucleótidos correspondientes a la región promotora y al exón 1 están en letras mayúsculas y la secuencia correspondiente al primer intrón está representada con letras minúsculas. La secuencia correspondiente al exón 1 inicia en el sitio marcado como (+1) que corresponde también al sitio de inicio de la transcripción. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar esta región está representados por letras negrillas y el nombre de cada oligonucleótido se indica en la parte superior de éste.

4.9.4. DETECCIÓN DE MUTACIONES

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

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

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

Para el análisis de SSCP, el producto de PCR necesita estar marcado radioactivamente. Para esto, a la mezcla de reacción se le añadió uno de los nucleótidos marcados con ^{32}P . Cada reacción de PCR consistió de: 100 ng. de DNAg en un volumen final de 10 μl de reacción, la cual contenía: Amortiguador de la reacción 1X, 1.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTPs, 5 μM de cada oligonucleótido, 0.1 μCi [α - ^{32}P]dCTP, y 1.25 U de Taq DNA polimerasa. Los ciclos de amplificación consistieron de un ciclo inicial de 2 min a 94° C, 30 ciclos que consistían cada uno de: 30 sec. a 92° C, 30 sec. a 60° C y 30 sec. a 72° C, seguidos de un ciclo final de extensión de 2 min a 72° C.

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

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

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

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

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

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

4.9.5. ANALISIS DE PROTEINAS

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

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

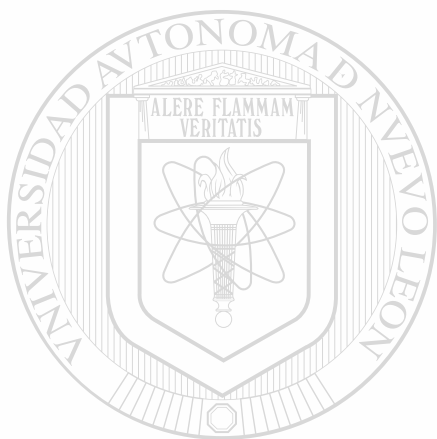
Aproximadamente 25 a 30 μ l del sobrenadante se utilizó para cargar geles de SDS- acrilamida al 8%. Todos los geles se corrieron entre 50 a 80 V hasta que el colorante del frente de corrimiento alcanzó el fondo. Las proteínas se transfirieron a membranas de Nylon a 500 mA durante 18 h. a 15° C, utilizando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

Se utilizaron tres anticuerpos para la caracterización, un anticuerpo dirigido contra la región N-terminal, uno contra la parte central y un tercero dirigido contra la parte C-terminal de la proteína distrofina. Un cuarto anticuerpo anti-actina se utilizó como control interno del sistema para homogeneizar las cantidades de proteína en el gel. Todos los anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:1000 en solución TBST y leche descremada al 5%, durante 1 h. a temperatura ambiental. El primer anticuerpo se incubó durante 3 h a temperatura ambiental. Para eliminar el exceso de anticuerpo,

las membranas se lavaron con PBS IX tres veces durante 15 min. Después del último lavado, las membranas se incubaron 1 h. a temperatura ambiental con el anticuerpo secundario, que es una IgG de conejo anti IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina. El revelado se hizo con 10 ml de la mezcla de substratos cromogénicos: 66 μ l de nitro-azul de tetrasolio (NBT) al 50% y 33 μ l de 5' bromo-4' cloro-indoilfosfato (BCIP) al 50%, diluidos en TBST en presencia de 50 mM MgCl₂.

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO V

RESULTADOS

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

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

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

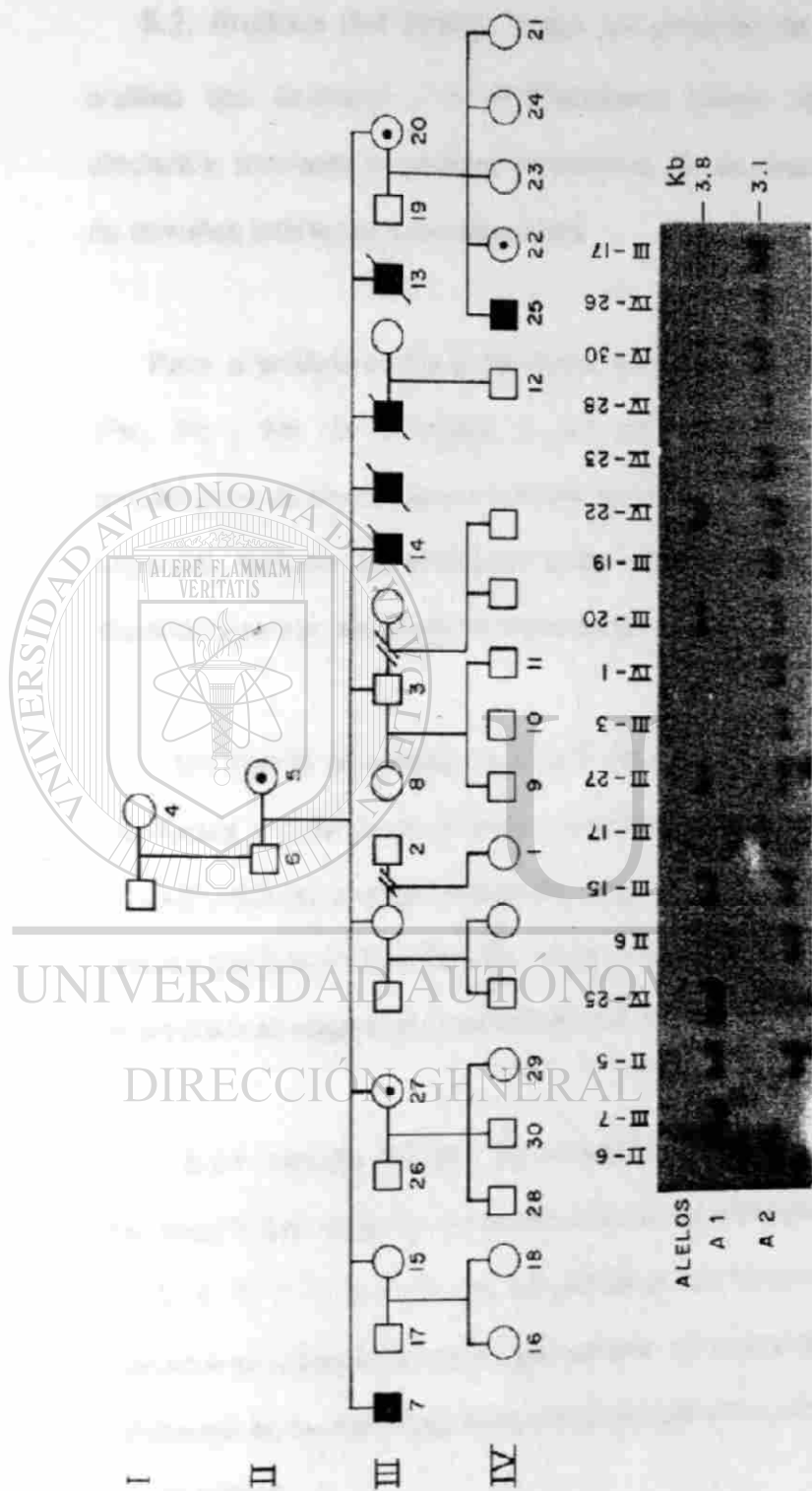


Figura 7. Autorradiografía de la familia CDLX-2. Resultado del análisis tipo Southern con la sonda XJ1.1. Se observa que el alelo mayor de 3.8 Kb segrega con la enfermedad.

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

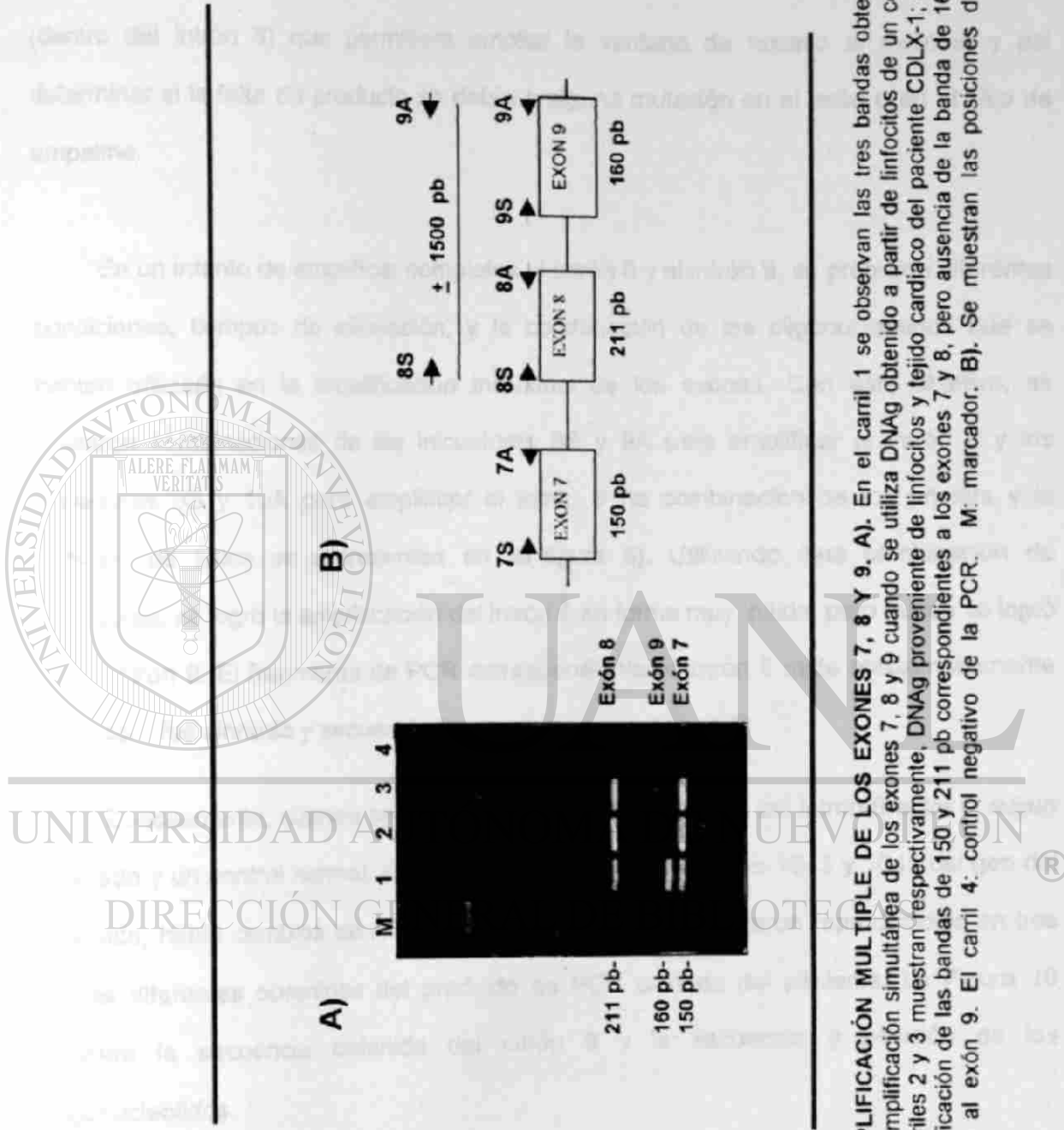


Figura 8. AMPLIFICACIÓN MULTIPLE DE LOS EXONES 7, 8 Y 9. A). En el carril 1 se observan las tres bandas obtenidas después de la amplificación simultánea de los exones 7, 8 y 9 cuando se utiliza DNAg obtenido a partir de linfocitos de un control normal. Los carriles 2 y 3 muestran respectivamente, DNAg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

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

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

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

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

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

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

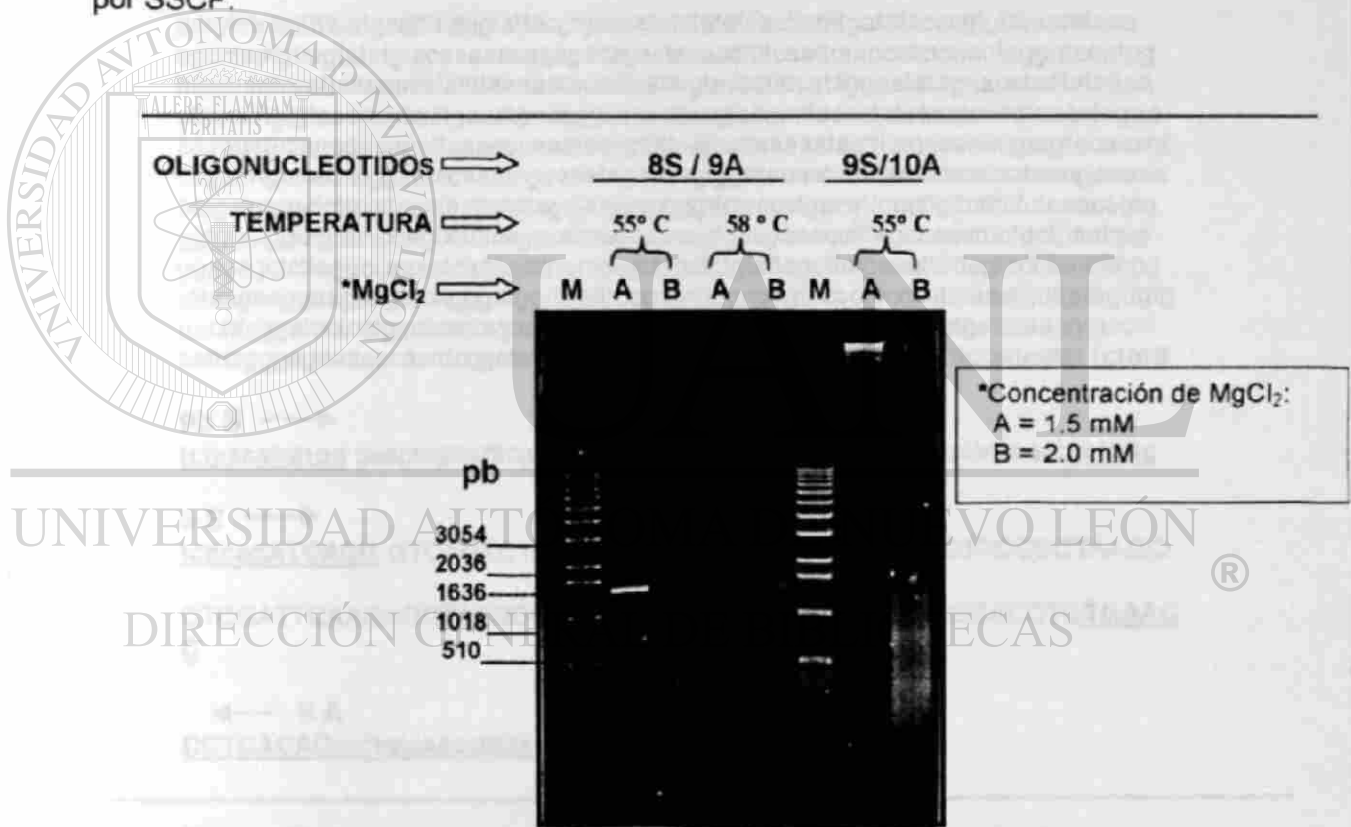


FIGURA 9. AMPLIFICACION DE LOS INTRONES 8 Y 9: Se muestran las condiciones de MgCl₂ y temperatura y la combinación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación. La PCR correspondiente al intrón 8 (8S/9A) muestra una banda nítida y más intensa, de aproximadamente 1,500 pb, cuando se utiliza MgCl₂ a 1.5 mM y una temperatura de alineamiento de 55° C. El fragmento correspondiente al intrón 9 nunca pudo ser amplificado, aún utilizando otras condiciones de temperatura ó MgCl₂

8 S →
gacattcgtgtaattgATGTT GATACCACCTATCCAGATAAGAAGTCCATTTTAATG

TACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCA

CCAGGAAGTGAAATGTTGCCAAGGCCACAAGTGACTIONAAGAAGAACATTTT

← **8 A**
CAGTTACATCAAATGCACTATTCTCAACAGgtaaaagtgtgtaaaaggaca gctactattcaa
gatgtttctgtttatgatgcatthtttaggtattacgtgcacatatatataaaccttatatgatatacacgtgtataatataca
agcctaagtatgtatatagtacaaaaacagagacagactaacctttcaatttaacccttncnantttggntcnaig
ttcaannttccattcaaacatattttaaaaatactattcatatgtaccatcataggaatatagaacataatatafaa
attccattgtgtaacacacaatgaaatgaaaggcaaaccttacgtacatattaaaccttaaaaacttcatcaactagaa
caaagagctagagaaagattaaaggcaaacacagttttaaatacattaaaaatactttatgacaatgatgtacaaagt
cagatttgnatttcaggataacaattngaaaatagaaaagtggttaaaatattcaantnaacaataangaaaa
catgatgaaattctcgttacataaattgatagaatttaggggtctcccattgacattggcttcttctcaacagtg
gggtgttggatgttttccatgctttctcaggcacaacaacagtgaaagaaccttttagcaacattctgctgaatgtg
ggagagctcttaggocaaactctcactngctgagctagctctgattagcttataaaattintagctttacctggg
attaagaaggaagttngctatgggatgctgttttccggntggngagtaccatccatataaaatngtggagttgtg
ttacttgggatcccatggtctaaatagnatgctcatalcttcccagatcatttactcccacatgataaagtgccnf
cattctgggagaaaaccaattcggatattatatagttttagtattaacatgatctcaccatttccattaaigt tctgttt

9b S →
tctaccatgttgg gaagtagtcctttcgggttacttatggttttccccctctctatccactcccccaaaccttctc

9 S →
tgcgagATCACG GTCAGTCTAGCACAGGGATATGAGAGACTTCTTCCCCTAAGC

CTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGAAC
C

← **9 A**
CCTCACAGgtctgtcaacatttac

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

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

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

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

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

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

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

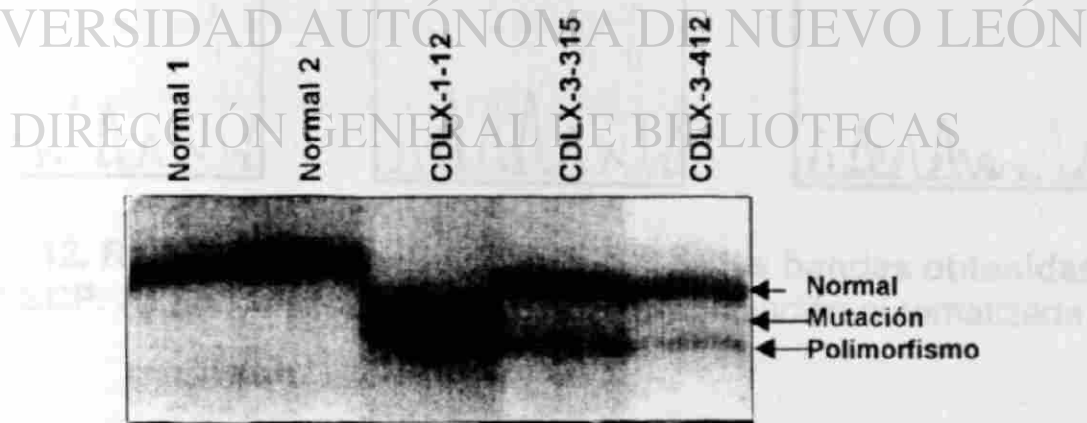


Figura 11. Análisis por SSCP. Se muestra patrón de bandas generado por las siguientes muestras analizadas: dos DNAs controles (normales) que presentan patrón de bandas semejante, el afectado de la familia CDLX-1 y el patrón polimórfico que se detectó en la familia CDLX-3. Cada una de estas bandas fue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

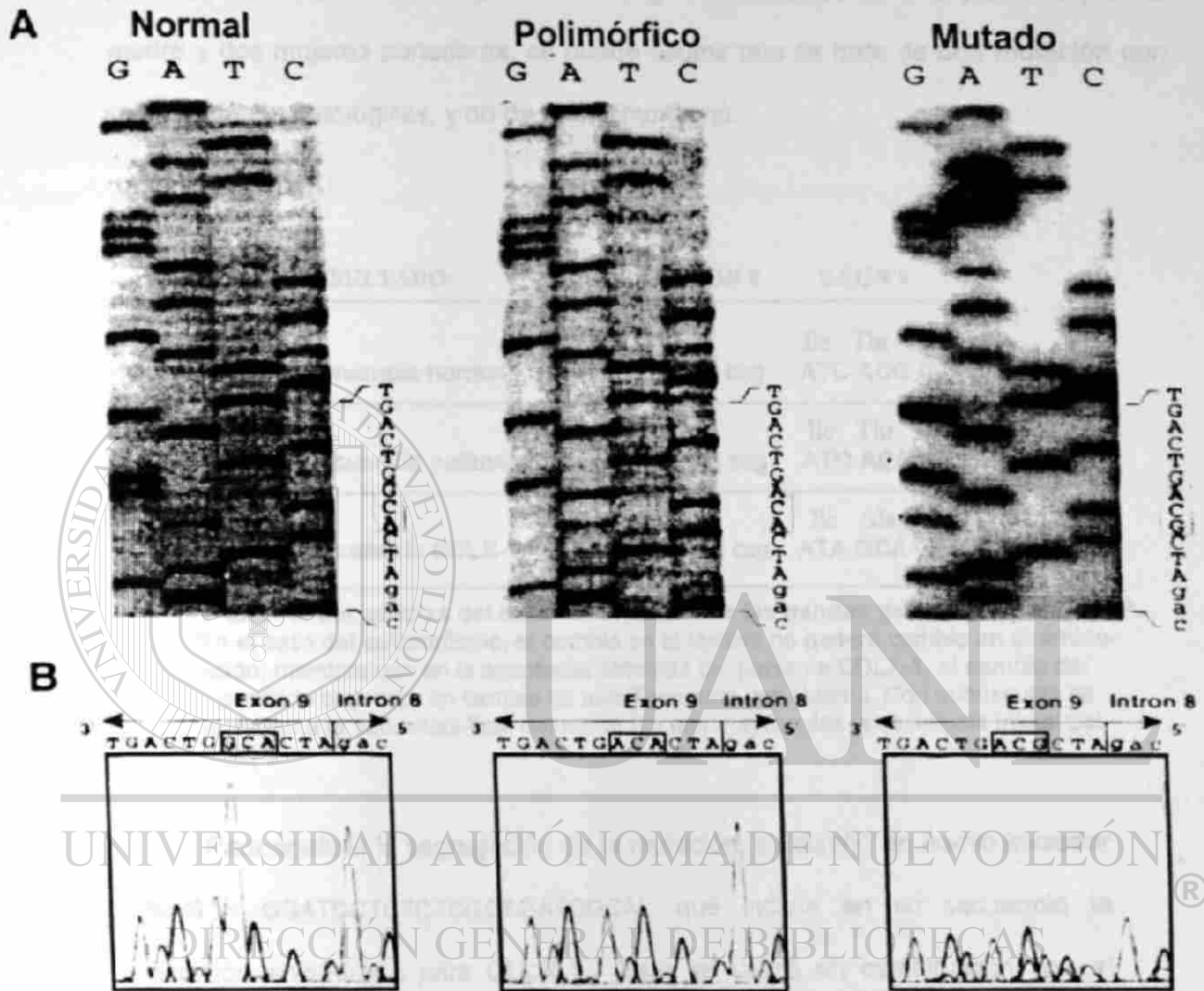


Figura 12. Resultados de la secuenciación de las bandas obtenidas por SSCP. A) Secuenciación manual B) Secuenciación automatizada.

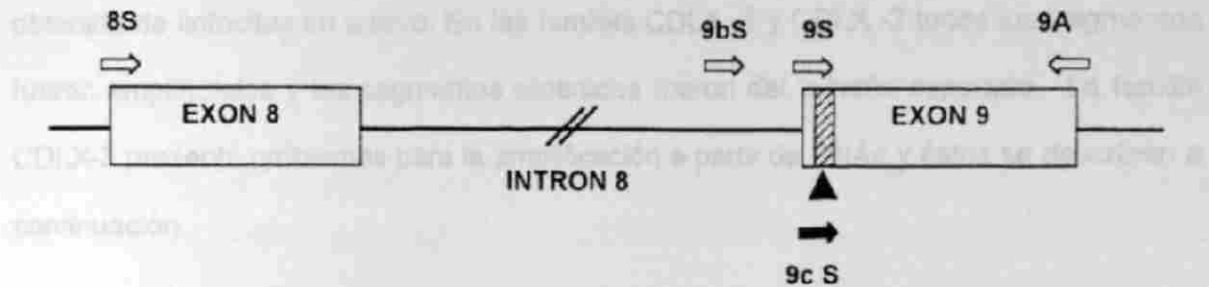
El cambio en la primera base (A1043G) encontrada en el paciente de la familia CDLX-1, origina un cambio de treonina por alanina (aminoácido 279, región H1 de la proteína) (Tabla 8). Debido a que este hallazgo solo se presentó en el paciente y en la madre y dos mujeres portadoras, se puede asumir que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

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

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

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

A).



B).

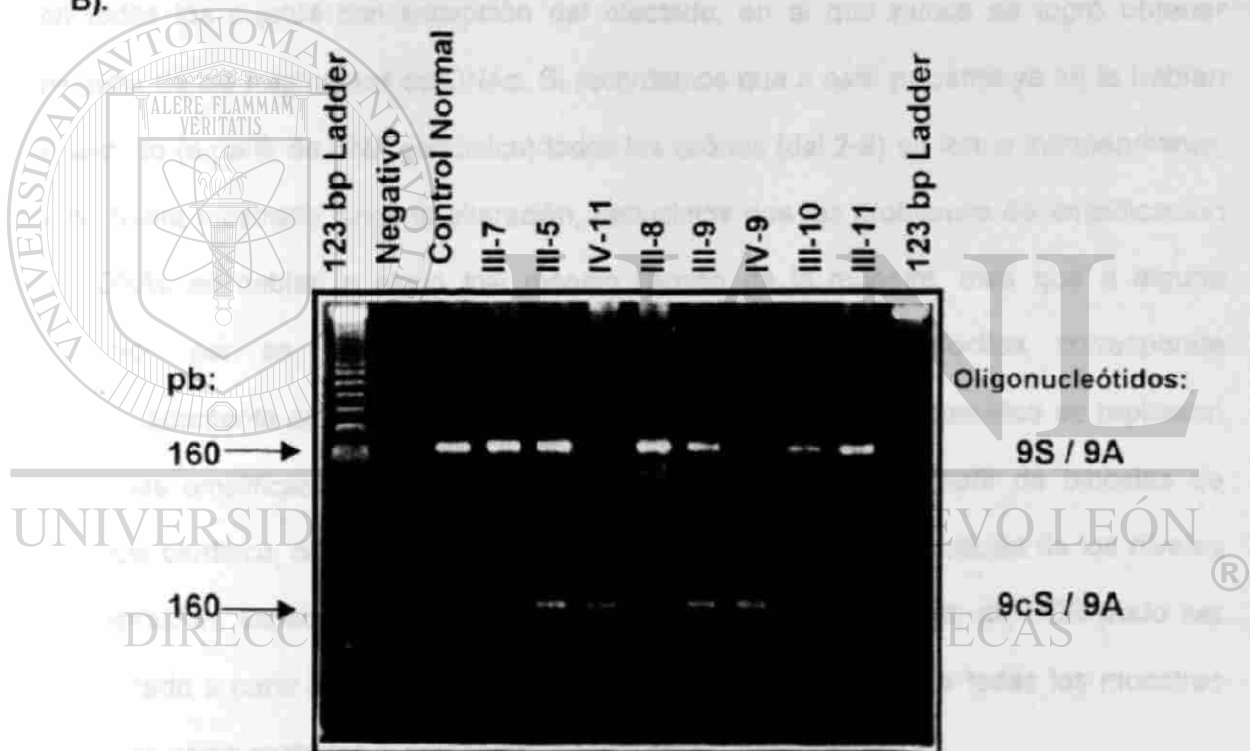


Figura 13 Análisis del exón 9 en CDLX-1. A). Se muestra la posición de los oligonucleótidos utilizados en la caracterización del Exón 9. El ▲ representa el lugar de la mutación en la familia CDLX1. La ➔ representa el oligonucleótido (9cS) que incluye la mutación. B). Muestra el análisis de 8 miembros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

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

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

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

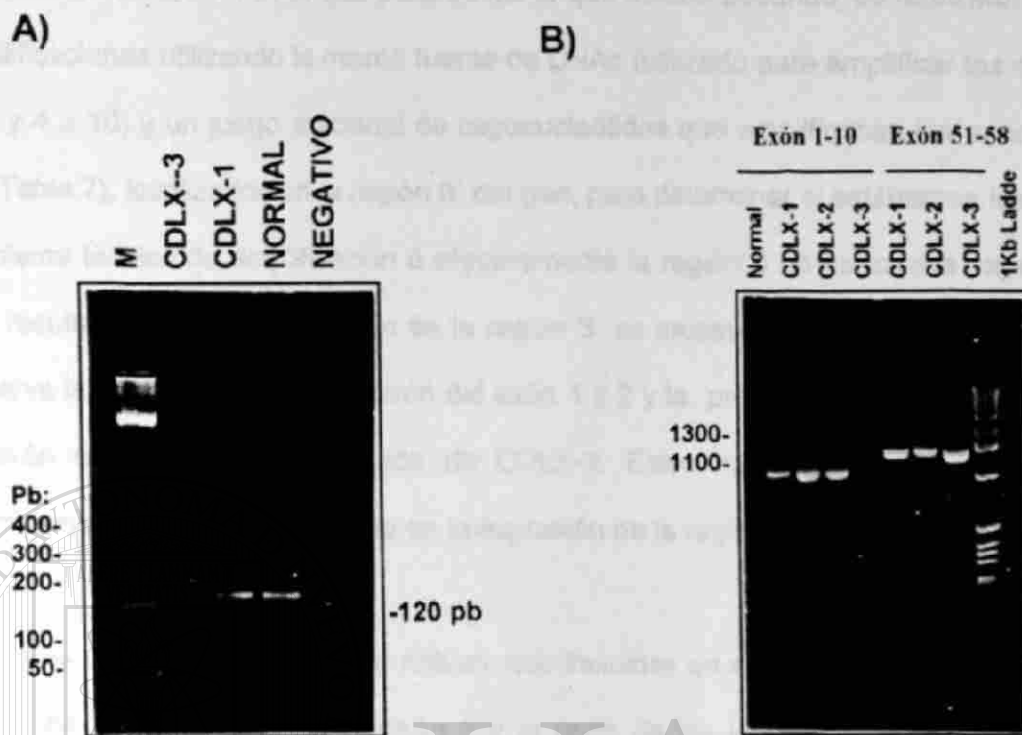


Figura 14: Análisis del DNAc: A) Amplificación del exón 1 al 2 a partir de DNAc proveniente de tejido cardiaco. CDLX-3 no muestra producto amplificado. B) Amplificación de los exones 1 a 10 y exones 51 a 58. Se observa la ausencia de amplificación en CDLX-3 para los exones 1 a 10.

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

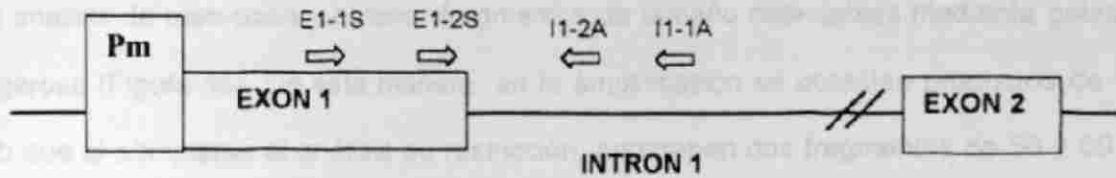
De manera que si toda la región promotora hasta el exón 1 (Pm-exón1) y los exones 2 al 10 (incluyendo los sitios de empalme) habían sido analizados sin encontrarse mutaciones, no había ninguna explicación para la ausencia de amplificación en el

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

Las únicas regiones que no habían sido incluidas en el análisis del DNAg fueron la región de empalme del Exón1-Intrón 1 y el resto de los intrones 2 al 10. Y como las amplificaciones del DNAc eran negativas aún utilizando la combinación de oligonucleótidos para Exón 1- Exón 2, entonces la primera región candidata de alguna mutación, responsable de la ausencia de amplificación en el DNAc estaba dentro del intrón I. De manera que a partir de la secuencia reportada por Klamut y cols. (13) de la región promotora de músculo y parte del intrón 1, se diseñaron dos nuevos iniciadores (I1-1A y I1-2A) anidados dentro del intrón I y se realizaron las amplificaciones respectivas (Figura 8). La PCR de esta región fue exitosa y los resultados de estas nuevas amplificaciones utilizando la combinación de oligonucleótidos: I1-1S/I1-1A y I1-1S/I1-2A se muestran en la figura 15.

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

A).



B).



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

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

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

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

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

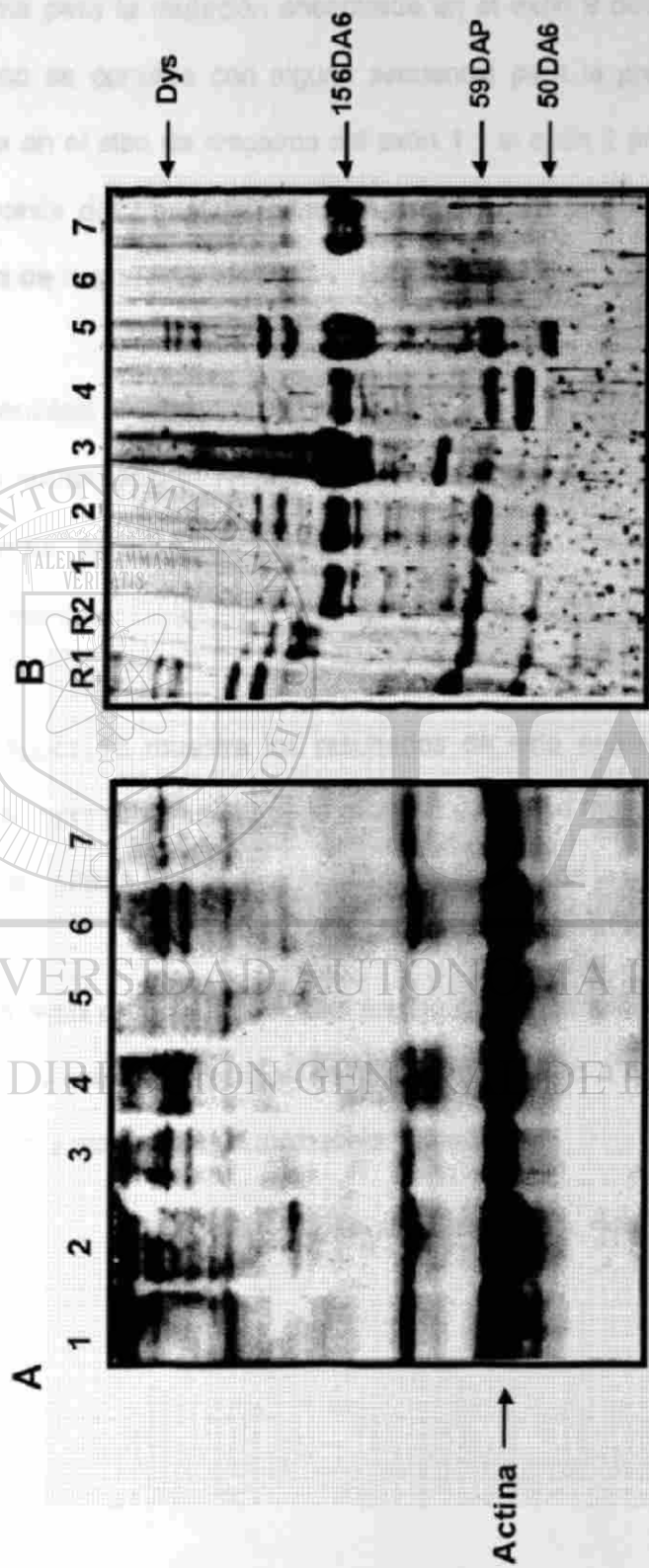


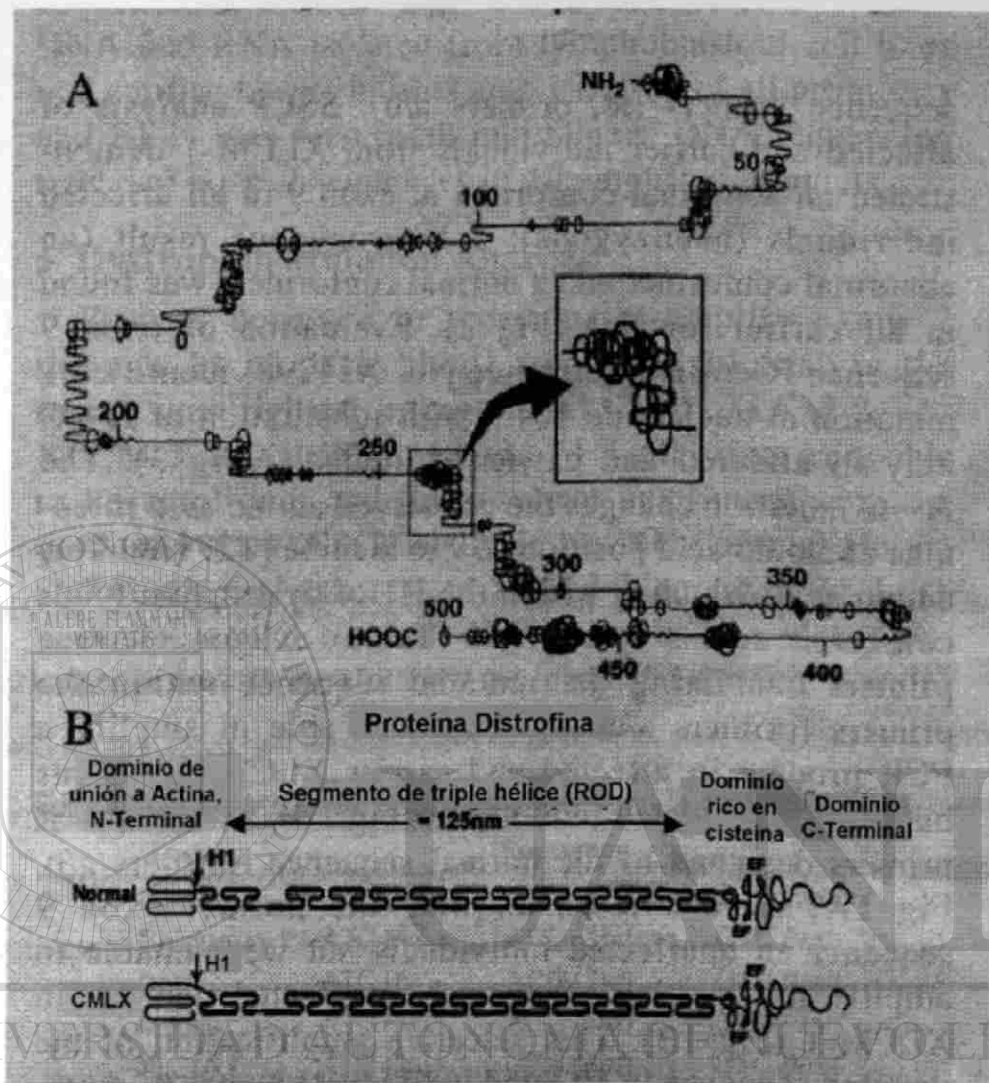
Figura 17. Análisis por Western-blot de muestras del afectado de la familia CDLX-3 (IV-412). Todas las muestras analizadas en estos geles se procesaron al mismo tiempo. A) Representa la homogenización de las muestras utilizando un anticuerpo anti-actina. B) Incluye las mismas muestras de A pero utilizando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

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

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

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

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



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

en la posición 1043, localizada en el lado de la región H1 de la distrofina. El

mutación A → G genera un cambio de estructura (Figura 18). Este cambio en la

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

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

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

Mutaciones encontradas en el gen de la distrofina:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VII

CONCLUSIÓN

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

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

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

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

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

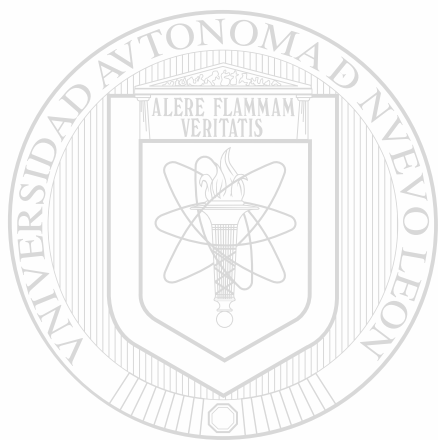
27. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Stauhter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin associated glycoproteins linking dystrophin to extracellular matrix. *Nature* 1992, 355:696-702
28. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophy and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 1989, 338:259-262.
29. Klietsch R, Ervasti JM, Arnold W, Campbell KP, Jorgensen AO. Dystrophin glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res*. 1993,72:349-360.
30. Vitiello L, Mostacciolo ML, Oliveira S, Schiavon F, Nicoletti L, Angelini C, Danielli GA. Screening for mutations in the muscle promoter region and for exonic deletions in a series of 115 DMD and BMD patients. *J Med Genet*. 1992;29:127-130.
31. Roberts RG, Darby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet*. 1991;49:298-310.
32. Gardner D, Medwin. Clinical features and classification of muscular dystrophies. *Brit Med Bull* 1980. 36:109-115
33. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987. 51:919-928
34. Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988. 53: 219-288
35. Beggs, AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Dugita H, Kunkel LM. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker Muscular Dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Gen* 1991. 49:54-67
36. Monaco AP, Malhotra SB, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW and Ray P. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and becker muscular dystrophy. *Science* 1988. 242(4879):755-9
37. Melacini P, Fanin M, Danielli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, Freda MP, Miorelli M, Mostacciolo ML, Fasoli G, Angelini C, Dalla Volta S. Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation* 1996. 94(12):3168-75
38. Berko BA, Swift M. X-Linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1987,316:1186-1191
39. Towbin JA, Hejmancik JF, Brink P, Beib B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*. 1993;87:1854-1865.

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

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

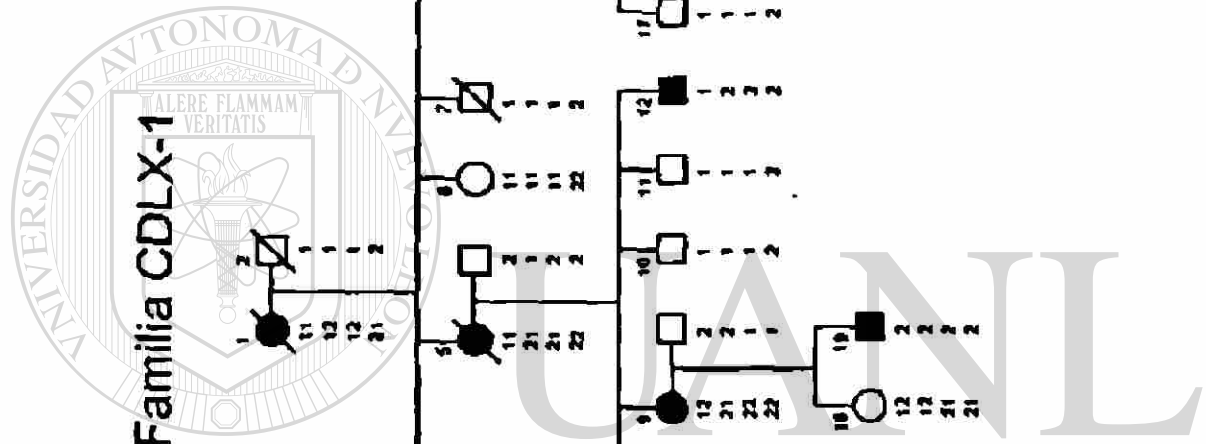
ANEXO 1

ARBOLES GENEALOGICOS



UANL

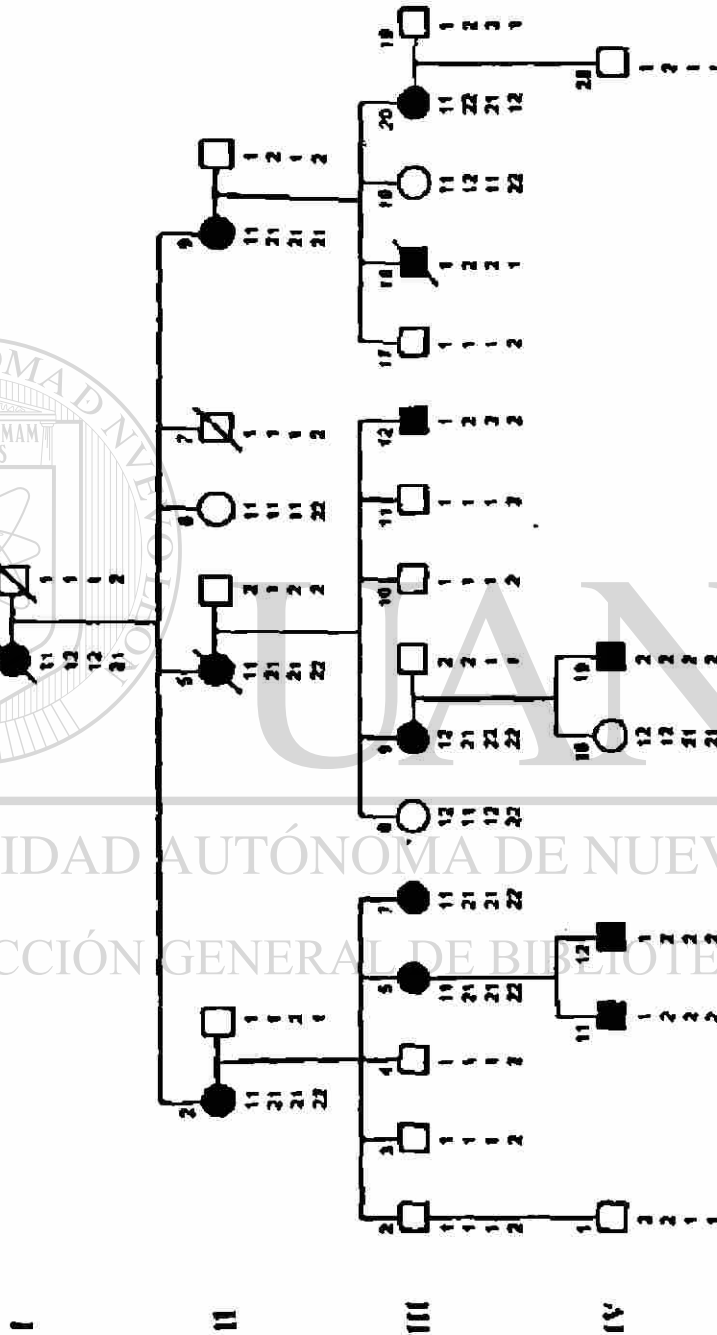
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

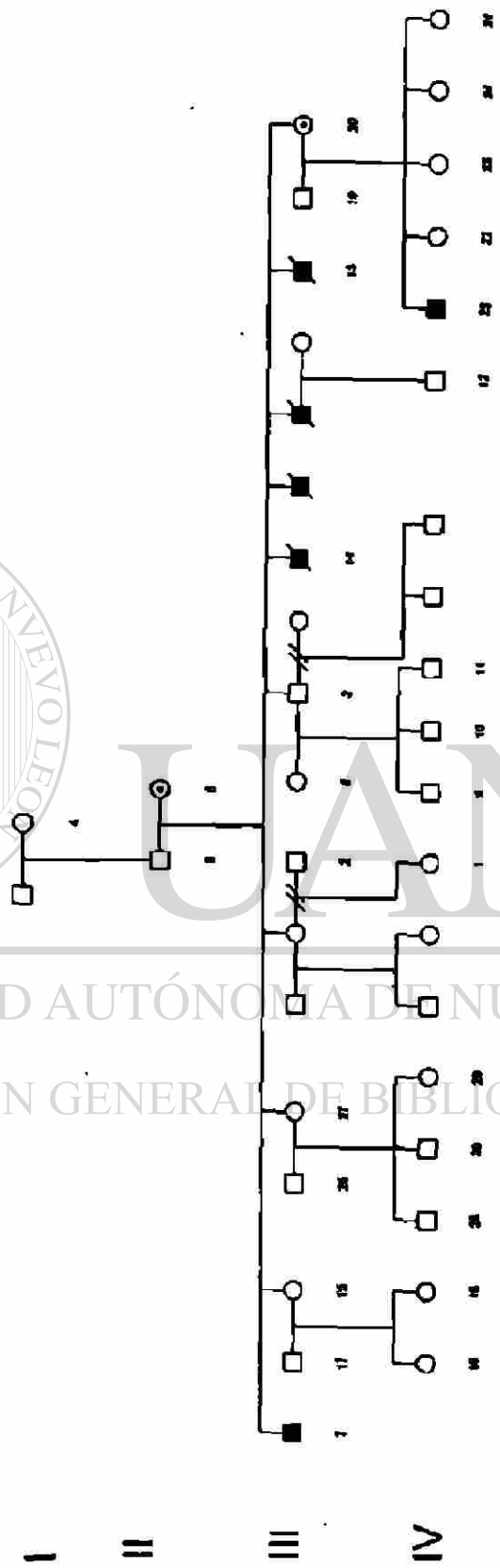
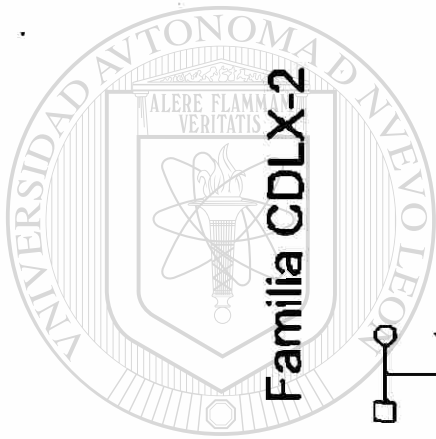


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

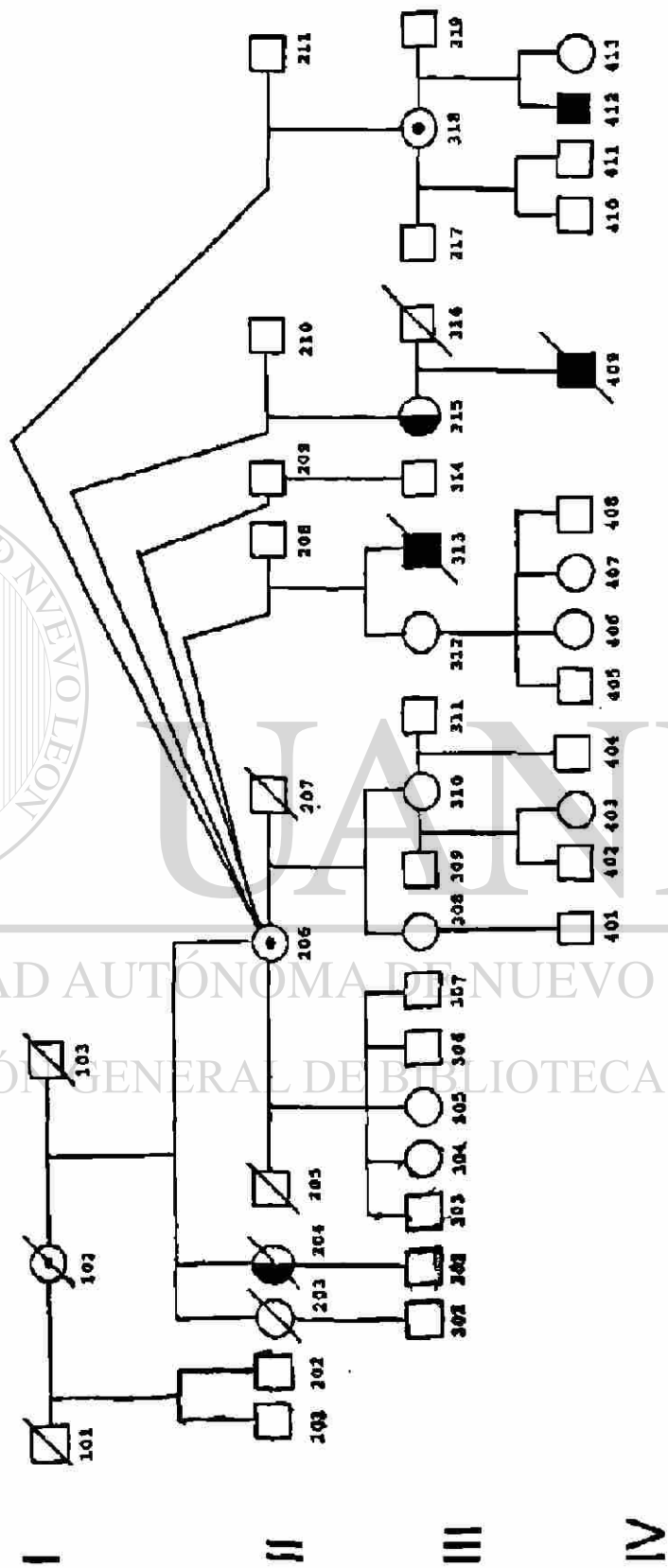
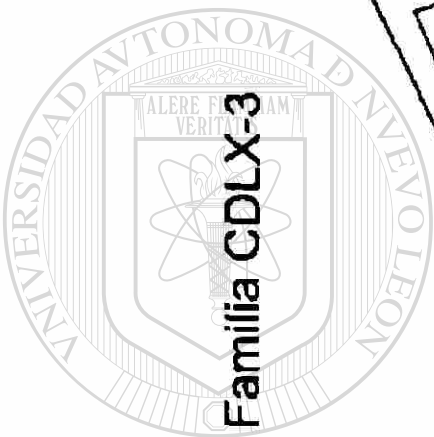
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Familia CDLX-1





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ANEXO 2



PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



The New England Journal of Medicine

Advertising
Rates

Established in 1812 as The NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE AND SURGERY

VOLUME 330

FEBRUARY 3, 1994

NUMBER 5

Original Articles

- Effects of Diets High in Sucrose or Aspartame on the Behavior and Cognitive Performance of Children 301
M.L. WOLRAICH AND OTHERS
- Relation of the Course of HIV Infection in Children to the Severity of the Disease in Their Mothers at Delivery 308
S. BLANCHÉ AND OTHERS
- Islet Amyloid Polypeptide in Patients with Pancreatic Cancer and Diabetes 313
J. PERMERT AND OTHERS
- Lack of Effect of 2-Chlorodeoxyadenosine Therapy in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Refractory to Fludarabine Therapy 319
S. O'BRIEN AND OTHERS

Images in Clinical Medicine

- Spontaneous Human Erythrocyte Rosettes 323
G. LAMBERTENGI-DELLIERI

Special Article

- Adolescents and Children Injured or Killed in Drive-by Shootings in Los Angeles 324
H.R. HUTTON, D. ANGLIN, AND M.J. PRATTA, JR.

Review Articles

- Mechanisms of Disease: The Molecular Basis of Leukemia 328
M.J. CLINE
- Current Concepts: Care of Patients with Ascites 337
B.A. RUNYON

Clinical Problem-Solving

- Saved by a Test Result 343
E. BEN-CHEFUT AND G. RAMAV

Case Records of the Massachusetts General Hospital

- A 34-Year-Old Woman with Mild Exertional Dyspnea and Interstitial Pulmonary Lesions 347
B.W. LEVINE AND V. NICKLETT

Editorial

- Sugar and the Hyperactive Child 355
M. KIMSOURNE

Sounding Board

- U.S. Drug Laws — An Introduction 356
- The War on Drugs — A Peace Proposal 357
L. GRINSPOON AND J.B. BARALAN
- Our Current Approach to Drug Abuse — Progress, Problems, Proposals 361
H.D. KLEBER

Correspondence

- Guns and Homicide in the Home 365
- X-Linked Dilated Cardiomyopathy 368
- Cat Scratch Disease 370
- Q Fever during Pregnancy — A Risk for Women, Fetuses, and Obstetricians 371
- Renal Transplantation in a Noncompliant Patient 371
- Detention of HIV-Positive Haitians and Cubans 372

- Book Reviews — Guns and Violence 373

- Notices 375

- Correction
X-Linked Dilated Cardiomyopathy 370

- Information for Authors 376

Owned, Published, and ©Copyrighted, 1994, by the Massachusetts Medical Society

THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (ISSN 0278-4793) is published weekly from editorial offices at 10 Shattuck Street, Boston, MA 02115-6094. Subscription price: \$99.00 per year. Second-class postage paid at Boston and at additional mailing offices. POSTMASTER: Send address changes to P.O. Box 803, Waltham, MA 02234-0803.

NO POSTAGE
NECESSARY
IF MAILED
IN THE
UNITED STATES

2 #BXNBYJG***** 5-DJ6J1 77096
 C #C480160/SN 063094 020394 AF 95
 C TJM C MCOUJHN MD
 C 5502 CHEENA DR
 C HOUSTON TX 77096-5089
 C
 C

N
E
W
S
P
A
P
E
R

107-18

of cardiac symptoms. Furthermore, the hypothesis put forth by Muntoni et al. that "the brain promoter is driving relatively high levels of transcription in skeletal muscle but not in the heart" is not supported by our report,⁴ which was cited in their article. We demonstrated that the brain promoter is capable of driving dystrophin transcription in the human heart, perhaps more so than in skeletal muscle, a finding that contradicts their statement. The lack of molecular data from cardiac tissue (i.e., endomyocardial-biopsy specimens from an affected family member) makes it very difficult to speculate how the muscle-promoter deletion in the family Muntoni et al. studied might selectively affect dystrophin function in the heart, or even whether it has such an effect. Further investigation is required to uncover the molecular mechanisms that distinguish cardiac-muscle from skeletal-muscle dysfunction in these families.

ROGER D. BIES, M.D.
University of Colorado
Health Sciences Center

Denver, CO 80262

1. Muntoni F, Cau M, Ganau A, et al. Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1993;329:921-5.
2. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, et al. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993;87:1854-65.
3. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991;49:54-67.
4. Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1725-31.

To the Editor: I was disturbed by the incorrect usage of genetic terms in the text and Table 1 of the article by Muntoni et al. The affected males (Subjects II-1, II-2, II-5, and II-6) are labeled "homozygous" for the deletion despite the fact that they are obviously hemizygous.* On the other hand, the carrier females (Subjects I-1, I-5, II-3, and II-4) are labeled "homozygous," although they are clearly heterozygous for the defect. The noncarrier females (Subjects I-4 and II-7) are described as "hemizygous" when they are in fact homozygous for the normal allele.

Another term used in a questionable manner is "obligate carriers," which is used for all four carrier females in the pedigree. This term can correctly be used to apply only to subjects whose carrier status is obvious on the basis of pedigree data; in this family, only Subject I-1 should be called an obligate carrier. The other three (Subjects I-5, II-3, and II-4) are not obligate carriers, since their carrier status was based on the molecular studies performed and not on pedigree information.

Since reports of genetic studies are increasingly read by nongeneticists, it is important to use correct terminology in order to avoid confusion.

MARTIN ROUBICEK, M.D.
Universidad Nacional
de Mar del Plata

7600 Mar del Plata, Argentina

*King RC, Stansfield WD. A dictionary of genetics. 4th ed. New York: Oxford University Press, 1990:142.

To the Editor: Muntoni et al. recently described a family in which a deletion in the muscle-promoter and exon 1 regions of dystrophin was thought to be the cause of X-linked dilated cardiomyopathy. The authors evaluated the muscle

promoter and exon 1 by polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of DNA extracted from blood and supported the results with immunohistochemical studies of skeletal muscle. No cardiac studies were performed. Unfortunately, the authors failed to refer to our report¹ in which two families with X-linked dilated cardiomyopathy were clinically evaluated, linkage to the 5' portion of dystrophin was demonstrated, and Western blot analysis with N-terminal dystrophin antiserum showed low levels of cardiac dystrophin protein and normal levels of skeletal-muscle protein. In addition, multiplex PCR including the muscle-promoter region revealed no deletions.

We have now studied three families with X-linked dilated cardiomyopathy, and in all subjects the muscle-promoter and exon 1 regions are intact. Using the same primers as Muntoni et al., including DYSMSB (which was deleted in the family described¹), we could not find any deletions in the probands of our families (Fig. 1). Furthermore, extensive sequencing of this region revealed no abnormalities. Also unsupported is their hypothesis that selective deletion of the muscle promoter leads to cardiomyopathy without skeletal disease and that the brain promoter is selectively "driving . . . high levels of transcription in skeletal muscle but not in the heart." A similar deletion, but without selective cardiac disease (in fact, with no cardiac disease), has been described.^{2,3} In addition, Bies et al.⁴ demonstrated that the

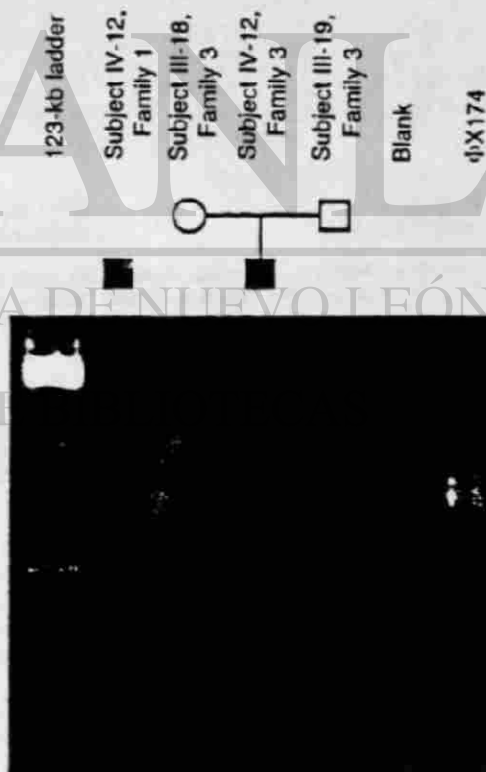


Figure 1. PCR Analysis of the Dystrophin Muscle-Promoter Microsatellite Locus DYSMSB in the Proband from Two Families with X-Linked Dilated Cardiomyopathy (Subjects IV-12 and IV-12 in Families 1 and 3), a Probable Carrier Female (Subject III-18 in Family 3), and a Normal Male (Subject III-19 in Family 3).

Note that in all subjects, the expected amplification product is seen (i.e., no deletions occurred). The amplification products were resolved on 1 percent agarose gel. The 123-kb ladder and ϕ X174 are size markers.

brain promoter is capable of driving dystrophin transcription in the human heart at a level even greater than that seen in skeletal muscle, directly contradicting, rather than supporting, the results of Muntoni et al.

We believe that the report of Muntoni et al. describes a defect inconsistent with a cardiospecific abnormality and that this defect has been prematurely accepted as the cause of X-linked dilated cardiomyopathy. Further careful clinical and molecular study of cardiac tissue from patients with X-linked dilated cardiomyopathy is needed to clarify the molecular mechanisms that distinguish cardiospecific dysfunction from the typical skeletal-muscle disease expected with dystrophin defects.

JEFFREY A. TOWBIN, M.D.
ROCIO ORTIZ-LOPEZ, M.S.
Baylor College of Medicine

Houston, TX 77030

1. Towbin JA, Heitmanck JF, Brink P, et al. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993;87:1854-61.
2. Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM. Dystrophin is transcribed in brain from a distal upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1276-80.
3. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991;49:54-67.
4. Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and mouse dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1725-31.

Dr. Muntoni replies:

To the Editor. I am grateful to Dr. Roubicek for his comment on the use of the term "obligate carrier." With respect to his comment on Table 1, an error was introduced during the preparation and editing of column 11. A revised version is shown.

The letters of both Dr. Bies and Dr. Towbin and Mr. Ortiz-Lopez raise the issue of the genotypic or phenotypic specificity in our family (the report by Towbin et al. appeared only after the final version of our manuscript was accepted). As we have already stated, the two previously described patients with a muscle-promoter deletion but no cardiac symptoms are young (10 and 12 years old) and may

well be clinically asymptomatic.^{1,2} Alternatively, the deletion found in our family might encompass regulatory sequences not affected in those boys.

We initially hypothesized that the brain promoter was driving dystrophin transcription in the skeletal muscle of our patients. We have now found, after detailed quantitation of the reverse-transcribed messenger RNA, that this is the case (unpublished data). Because of the unavailability of cardiac tissue, we have not studied transcription in the heart of the proband.

The work of Bies et al. showed that the brain promoter is not capable of driving dystrophin transcription in human Purkinje fibers or in the heart of the mouse.³ The importance of the faint signal obtained from the heart in humans is difficult to interpret because no quantitation of transcription was attempted⁴ and the contributing role of contaminating smooth muscle was not established.

Regardless of the mechanism responsible for the dissociation between the skeletal-muscle and cardiac-muscle involvement in our patients, their phenotype is undoubtedly due to a dystrophin mutation, and this is what we emphasized. We proposed that biochemical and genetic screening for a dystrophinopathy should be performed in all families with X-linked dilated cardiomyopathy. The observations of Dr. Towbin and Mr. Ortiz-Lopez and those of Dr. Bies confirm that this recommendation is valid.

It is likely that more than one mutation will be found in this group of patients, as is the case for both Duchenne's and Becker's muscular dystrophies. However, most reports of the families with this disease (including one Italian family [Angelini C: personal communication] and seven Japanese families [Takeda S: personal communication]) in which a proper biochemical evaluation was performed revealed skeletal-muscle dystrophin of normal molecular weight although in lower than normal levels, strongly reinforcing the view that mutations in regulatory regions of the gene are likely to be implicated in this phenotype.

London, W12 0NN,
United Kingdom

FRANCESCO MUNTONI, M.D.
Royal Postgraduate
Medical School

1. Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM. Dystrophin is transcribed in brain from a distal upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1276-80.

2. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991;49:54-67.

3. Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and mouse dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1725-31.

4. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Heterogeneous transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2617-21.

Table 1. Selected Laboratory Findings in Various Family Members.*

SUBJECT NO.	SEX	AGE Y	SERUM CK U/liter	SERUM CK-MB U/liter	ECG/CARDIOGRAPHY			NYHA CLASS	ECG RESULTS†	ZYGOSITY FOR THE DELETION
					ECG		EKG			
					P	QD				
I-1	F	31	106	4	31	48	Normal	—	Normal	+/-
I-4	F	44	98	4	43	46	Normal	—	Normal	-/-
I-5	F	39	71	5	28	50	Mild hypokinesia	I	Normal	+/-
I-8	M	27	112	3	41	45	Normal	—	Normal	-/-
II-1	M	36	1368	40	20	66	Severe hypokinesia	II	Abnormal	+
II-2	M	30	1826	60	15	60	Severe hypokinesia	II	Abnormal	+
II-3	F	28	171	7	33	48	Normal	—	Normal	+/-
II-4	F	26	158	6	35	40	Normal	—	Normal	+/-
II-5	M	27	3312	37	18	59	Severe hypokinesia	II	Abnormal	+
II-6	M	23	3562	60	14	88	Severe hypokinesia	IV	Abnormal	-
II-7	F	18	90	3	43	44	Normal	—	Normal	+/-

*CK denotes creatine kinase (normal level, <250 U per liter); CK-MB creatine kinase, MB isoform; FS fractional shortening; EDD left ventricular end-diastolic diameter; and NYHA New York Heart Association.

†ECG denotes electrocardiographic. A finding of deep Q waves from lead V₁ to lead V₄ was considered abnormal.

‡Prepropositus.

CAT SCRATCH DISEASE

To the Editor. We wish to point out a potentially confusing result in the work of Zangwill and colleagues (July 1 issue).¹ In the Abstract and Results section they state that the positive predictive value of the indirect fluorescent-antibody test for *Rochalimaea henselae* was 91 percent. We suggest that it is not

Genetic aspects of dilated cardiomyopathy

Rocio Ortiz-Lopez^a, Karla R. Schultz^b, Jeffrey A. Towbin^{c,*}

^aPre-doctoral Student, Department of Pediatrics (Cardiology), Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA

^bPre-doctoral Student, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA

^cAssociate Professor of Pediatrics (Cardiology) and Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, One Baylor Plaza, Room 333E, Houston, TX 77030, USA

Abstract

Dilated cardiomyopathy, which is characterized by ventricular dilatation and reduced systolic function, is the most common form of primary myocardial disease and the leading indication for cardiac transplantation. Although the majority of cases are described as idiopathic, a significant number are identified as being acquired due to an inflammatory response, and 20-30% are familial. Molecular biologic methods have been increasingly used during the past decade to attempt to better characterize the underlying etiology and pathogenetic mechanisms leading to both acquired and genetic forms of dilated cardiomyopathy. The aim of this chapter is to describe recent developments in the understanding of the inherited forms of this disease. This chapter will first describe the clinical aspects of dilated cardiomyopathy before outlining the progress currently being made in the genetic forms of dilated cardiomyopathy.

Keywords: Dilated cardiomyopathy; Familial dilated cardiomyopathy; Molecular cardiology; Gene mapping; Inherited cardiomyopathy

1. Introduction

The purpose of this review is to describe the current clinical and molecular genetic understanding of dilated cardiomyopathy. Rapid progress is expected in the next 1-2 years and therefore, this review should provide background for future discoveries.

2. Clinical aspects of dilated cardiomyopathy

Dilated cardiomyopathy (DCM), a significant cause of morbidity and mortality, is characterized by impaired ventricular systolic function and abnormal diastolic function, usually associated with left ventricular or biventricular dilatation [1-3]. Children commonly present with signs and symptoms of congestive heart failure, including dyspnea, exercise intolerance, decreased appetite, and in some children, vomiting.

Ventricular tachycardia, syncope, and sudden cardiac death are relatively frequent occurrences as well. The 5-year survival of patients with dilated cardiomyopathy is poor, commonly believed to be < 50% [1-3]. Physical examination findings usually include a displaced apical impulse consistent with cardiomegaly, a gallop rhythm, and evidence of mitral regurgitation. Occasionally, the heart sounds are muffled due to pericardial effusion. The lungs of older children and adolescents commonly have rales, although this finding is rare in neonates and infants unless pneumonitis or pneumonia co-exists. Hepatomegaly is usually identified at all ages. Peripheral edema is variable, but when seen, usually is notable in adolescents.

The diagnosis of DCM is usually confirmed on chest radiograph, which demonstrates cardiomegaly and increased pulmonary vascular markings, and by echocardiography [1-3]. Two-dimensional echocardiography clearly demonstrates reduced ventricular systolic function and ventricular dilatation (Fig. 1). In many patients, left atrial dilatation is notable. Pericar-

*Corresponding author. Tel.: +1 713 7987342; fax: +1 713 7988085.



Fig. 1. Two-dimensional echocardiogram of a child with dilated cardiomyopathy. Note the large, dilated left ventricle with bulging of the interventricular septum into the right ventricular chamber. In real-time, the left ventricular function is severely depressed.

dial effusions may also be identified. Doppler and color Doppler interrogation demonstrates atrioventricular regurgitation when it is present and may allow for prediction of right ventricular pressure using tricuspid regurgitation and the Bernoulli equation.

A small minority of patients present with predominant right heart failure, ventricular tachycardia, and sudden cardiac death. This disease, most commonly termed arrhythmogenic right ventricular dysplasia (ARVD) [4], is usually associated with good exercise tolerance. On electrocardiogram, inverted T-waves in the right precordial leads, late potentials, ventricular tachycardia with left bundle branch block, and ventricular fibrillation may be seen. Endomyocardial biopsy or autopsy examination generally reveals cardiomegaly, thinning and fatty infiltration of the right ventricle. The left ventricle is usually spared.

The prevalence of DCM has been estimated to be approximately 40 cases per 100000 population and most cases are believed to be sporadic [2,5,6]. There are numerous causes of DCM (Table 1), but in most cases the underlying etiology goes unrecognized and the cause is considered idiopathic [7].

3. Clinical genetic aspects of dilated cardiomyopathy

Familial dilated cardiomyopathy (FDCM) was initially considered to be a rare and distinct entity, causing an estimated 6-9% of cases of DCM based on retrospective studies [3,8,9]. However, Michels and colleagues [10] prospectively analyzed (physical examination and echocardiography) 315 relatives of 59 index patients with so-called idiopathic DCM, demonstrating that approximately 20% of the index patients

had familial disease, an estimate much higher than previously reported. Interestingly, only 5% of individuals in these families had suspected hereditary disease based on family history alone. In addition, several clinically healthy individuals (9%) were found to have ventricular dilatation without dysfunction. This relatively high incidence of FDCM has been confirmed by several investigators including Keeling et al. [11]. Indeed, these authors suggested an even higher incidence, at least 25-30%.

3.1. Autosomal dominant inheritance

The most common inherited form of FDCM is characterized by an autosomal dominant pattern of transmission with age-related penetrance [12,13]. Autosomal dominant inheritance is characterized by disease appearance in multiple generations, equal occurrence in both sexes, the presence of male-to-male transmission, and a 50% chance of expression in offspring of an affected parent (Fig. 2). It most commonly presents in the second or third decade of life; presentation in early childhood occurs less commonly and may be particularly severe. In the usual situation, patients with autosomal dominant DCM present with 'pure' DCM. However, a few families have been reported that present with conduction abnormalities initially, followed by DCM (typically one to two decades after the onset of conduction disturbance). The largest of these families, initially described by Graber et al. [14], was a six-generation family (at least 30 affected individuals). Sudden death occurred in 5% of individuals. A second family, described by Greenlee and colleagues [15], had remarkably similar symp-

Table 1
Causes of dilated cardiomyopathy

A. Familial dilated cardiomyopathy
Familial dilated cardiomyopathy, autosomal dominant (AD)
Familial dilated cardiomyopathy, autosomal recessive (AR)
Cardioskeletal myopathy, X-linked Barth syndrome (XR)
X-linked cardiomyopathy (XLCM)
Endocardial fibroelastosis (EFE) (XR)
B. Heredofamilial disorders
Muscular dystrophies/myopathies
• Duchenne/Becker muscular dystrophy (XR)
• Emery-Dreifuss muscular dystrophy (XR)
• Steinert myotonic dystrophy (AD)
• Erb lumb-girdle (Scapulohumeral) muscular dystrophy (AR)
Kugelberg-Welander spinal muscular atrophy
Nemaline myopathy (AD, AR)
Myotubular myopathy (AD, AR, XR)
Roussy-Levy polynuropathy (AD)
C. Mitochondrial
Kearns-Sayre syndrome
MELAS
NADH-Coenzyme Q reductase deficiency
MERRF
D. General system diseases
Connective tissue disorders
Systemic lupus erythematosus
Juvenile rheumatoid arthritis
Polyarteritis nodosa
Kawasaki disease
Progressive systemic sclerosis
Polymyositis
E. Sensitivity / Toxic Reactions
Sulphonamides
Penicillin
Anthracyclines
Chloramphenicol
Alcoholic cardiomyopathy
Arsenic
Cocaine
Lithium
Cobalt
Lead
F. Tachyarrhythmias
Supraventricular tachycardia
Atrial flutter
Atrial ectopic tachycardia
Ventricular tachycardia
G. Fatty acid oxidation
Carnitine deficiency (AR)
Long-chain-acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) deficiency (AR)
Medium-chain-acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency (AR)
H. Infectious Myocarditis
Viral
• Adenovirus
• Coxsackie B
• Coxsackie A
• Echo
• Mumps
• Rubella
• Parvovirus B19

Table 1 (Continued)

Bacterial
• Diphtheria
• Meningococcal
• Pneumococcal
• Gonococcal
Protozoal
• American trypanosomiasis (chagas)
• Toxoplasmosis
Rickettsial
• Rocky mountain spotting fever
Spirochetal
• Lyme disease
Fungal
• Candidiasis
• Aspergillosis
I. Metabolic
Endocrine
• Thyrotoxicosis
• Hypothyroidism
• Diabetic Cardiomyopathy
• Hypoglycemia
• Pheochromocytoma
• Neuroblastoma
• Catecholamine cardiomyopathy
Familial storage disease
• Glycogen storage disease (AR)
• GSDIV (Andersen's)
• GSDV (McArdle's)
Mucopolysaccharidoses
• Sanfilippo syndrome
• Marquio's syndrome
• Maroteaux-lamy syndrome
Sphingolipidoses
• Niemann-pick diseases
• Farber's disease
• Caucher's disease (AR)
• Tay-Sach's disease (AR)
• Sandhoff's disease (AR)
• GM1 Gangliosidosis (AR)
• Refsum's disease (AR)
Nutritional deficiency/metabolic
• Kwashiorkor (protein)
• Beri-beri (thiamine)
• Selenium deficiency (keshan)
• β -Ketolase deficiency
• Hyperuricemia
• Hypocalcemia
• Hypophosphatemia
• Hypokalemia
• Uremia
J. Other
Histiocytosis X
Hemolytic-Uremic syndrome
Reye's syndrome
Peripartum cardiomyopathy
Osteogenesis imperfecta (AD, AR)
Hereditary hemochromatosis (AR)

Legend: AD, autosomal dominant inheritance; AR, autosomal recessive inheritance; XR, X-linked recessive inheritance

ptoms and natural history. Another form of autosomal dominant DCM, arrhythmogenic right ventricular dysplasia (ARVD), typically demonstrates incomplete penetrance [4].

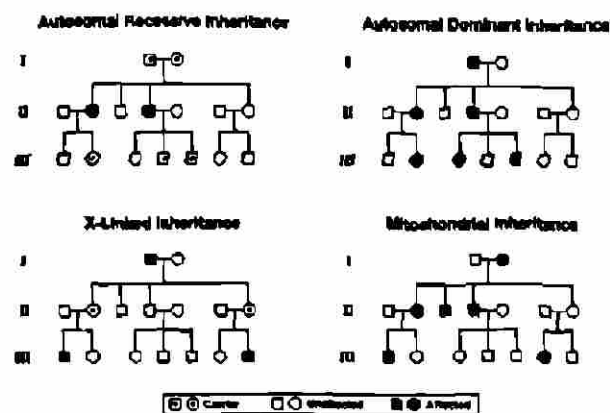


Fig. 2. Inheritance patterns as demonstrated by pedigrees with autosomal recessive, autosomal dominant, X-linked, and mitochondrial transmission of disease.

3.2. Autosomal recessive inheritance

Autosomal recessive forms of DCM have also been described [12,16]. In these families, one-fourth of offspring become affected, equal involvement of sexes is seen (Fig. 2), and presence of heterozygous carriers can be identified; most cases are seen in families where inbreeding has occurred (i.e. consanguinity) [13]. This type of inherited DCM is uncommon.

3.3. X-linked inheritance

X-linked forms of FDCM have also been recognized. Berko and Swift [17] reported a five-generation kindred with a sex-linked dilated cardiomyopathy (XLCM) in which no male-to-male transmission occurred, early-onset and rapid course in men was seen, and later and milder onset occurred in females, consistent with heterozygosity (Fig. 2). No skeletal muscle disease, normal mitochondria, and normal biochemistries except for an elevated muscle isoform of creatine kinase (CK-MM) was reported. The affected males presented in their teens or early 20s with clinical evidence of mitral regurgitation, heart failure, and echocardiographic evidence of DCM. Episodes of ventricular tachycardia were noted in several patients. The males progressed rapidly (within 1 or 2 years) to death or transplantation. Manifesting female carriers developed mild symptoms of heart failure and evidence of cardiomyopathy in the fourth or fifth decade and progressed slowly. Right ventricular endomyocardial biopsy in affected males revealed minimal interstitial fibrosis, while postmortem examination demonstrated marked ventricular dilatation, widespread patchy fibrosis worst in the posterior wall, and normal mitochondria on electron microscopy. Similar clinical and pathologic findings have been reported in other families.

A second X-linked form of DCM, called Barth syndrome or X-linked cardioskeletal myopathy [18], is characterized by dilated cardiomyopathy with endo-

cardial fibroelastosis (EFE), neutropenia, skeletal myopathy, abnormal mitochondria, growth retardation, and increased levels of urinary 3-methylglutaconic acid and 2-ethyl-hydracrylic acid [13]. Lactic acidemia not provoked by prolonged fasting and decreased plasma and muscle carnitine concentrations are also seen. The affected males are usually severely affected, present in early infancy in severe heart failure, and succumb in infancy or early childhood from cardiac decompensation or septicemia. Ultrastructural abnormalities in mitochondria from heart and skeletal muscle, as well as in neutrophil bone marrow cells are also typically seen. Mitochondrial respiratory chain abnormalities are also typically found. A number of families have been described.

3.4. Mitochondrial inheritance

Finally, mitochondrial inheritance has been identified in FDCM [13,16]. Transmission of the disease is from the mother to her offspring (i.e. maternal inheritance) and all offspring are at risk to develop the disease (Fig. 2). Clinical severity is based on heteroplasmy—that is, the percent of abnormal mitochondria mixed in with normal mitochondria. The higher the percentage of abnormal mitochondria, the more severe the disease. Many of these patients have associated problems including metabolic instability, mental retardation, and other end-organ abnormalities (i.e. skeletal disease, liver disease, etc.).

4. Molecular aspects of familial dilated cardiomyopathy

4.1. Autosomal dominant dilated cardiomyopathy

4.1.1. Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with conduction disturbance

The large six-generation family presenting with conduction defects and subsequent development of DCM reported by Graber et al. [14] in 1986, was recently studied by Kass et al. [19]. In this family, the affected patients presented in the second or third decade with transient arrhythmias which became sustained and commonplace by the third or fourth decade. The abnormal rhythms included second- or third-degree atrioventricular block, atrial fibrillation, or marked bradycardia with heart rates less than 50 beats/min. Pacemaker therapy was required in many of these patients. DCM usually developed in the fourth or fifth decade and was generally out of proportion of the severity of the rhythm disturbance. Sudden death occurred in the late stages of the disease in several family members. On autopsy, marked

Gene Mapping for Dilated Cardiomyopathy (DCM)

DCM with Conduction Defects (Autosomal Dominant)

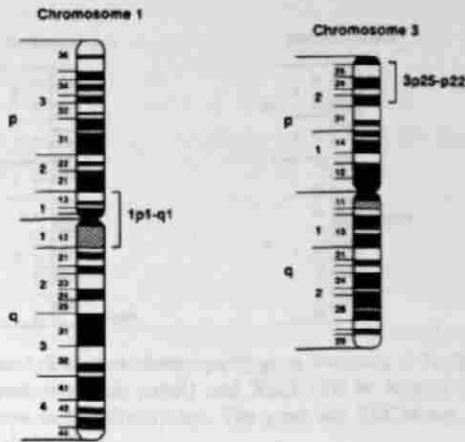


Fig. 3. Gene mapping for autosomal dominant dilated cardiomyopathy with conduction defects. Chromosome 1p1-1q1 linkage was identified by Kass et al. [19] and chromosome 3p25-3p22 linkage was recently defined by Olson and Keating [20] in an unrelated family. The genes have not yet been identified.

right and left ventricular dilatation, interstitial fibrosis, myocyte degeneration characterized by cytoplasmic vacuolization, and AV nodal cells replaced by fibrous tissue was notable. No coronary artery disease occurred. Kass et al. mapped the gene in this family to 1p1-1q1 (Fig. 3) but the gene and its characteristics have remained elusive [19]. Connexin 40, a gene encoding a protein that forms gap junctions, was mapped to 1cen-1q12 and this was speculated to be a candidate gene. However, this gene has not been found to contain disease-causing mutations. A similar family was also described by Greenlee et al. [15]. Genetic heterogeneity was recently found by Olson and Keating [20] when they mapped the locus for the family described by Greenlee et al. [15] to the 3p25-3p22 region (Fig. 3). The gene has not been identified.

4.1.2. 'Pure' autosomal dominant dilated cardiomyopathy

In 1995, the discovery of gene locations for FDCM in families with 'pure' DCM was reported. Krajcinovic et al. [21] provided evidence for linkage to 9q13-q22 (Fig. 4) in three families with this disorder (Fig. 4). Durand et al. [22] studied a large family with this disorder and found linkage to 1q32. Although no genes were identified by either research group, they speculated on the possible involvement of structural proteins. Schultz and colleagues [23] reported genetic heterogeneity, demonstrating exclusion of linkage to chromosome 1 and 9. None of the genes have thus far been identified.

4.1.3. Autosomal dominant arrhythmogenic right ventricular dysplasia

Familial clusters of ARVD have been reported, demonstrating autosomal dominant inheritance, in-

Gene Mapping for Dilated Cardiomyopathy (DCM)

Pure DCM (Autosomal Dominant)

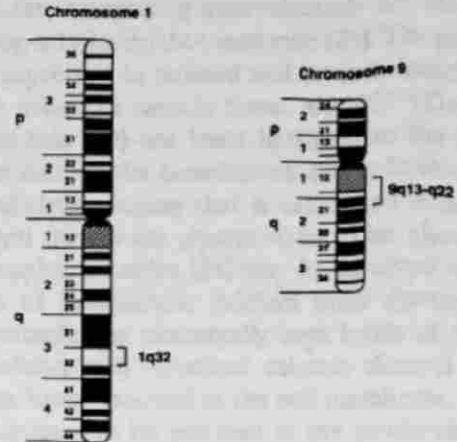


Fig. 4. Gene mapping for autosomal dominantly inherited 'pure' dilated cardiomyopathy. Chromosome 1q32 [22] and chromosome 9q13-9q22 [21] have thus far been identified as disease-causing loci. Neither gene has been discovered at present.

complete penetrance, and a wide spectrum of clinical heterogeneity. Rampazzo et al. [24] mapped the location of the gene responsible for this disease in two families to 14q23-14q24, and to 1q42-q43 in another family [25]. More recently, a third locus was identified by Severini et al. [26] to be on 14q12-q22 in three families. The genes for ARVD have not been identified.

4.2. X-Linked dilated cardiomyopathy (XLCM)

Towbin et al. [27] demonstrated linkage of XLCM to the dystrophin locus at Xp21 (Fig. 5) in the family described by Berko and Swift, [17] as well as in a second family. The tightest linkage occurred in the 5' portion of this gene locus, which is known to cause Duchenne (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD). No deletions were found. Evaluation of the protein defect in XLCM using antiserum against total cardiac protein showed absence (or low abundance) of the N-terminal dystrophin protein (Fig. 6); C-terminal antiserum demonstrated normal staining of cardiac dystrophin, while rod region antisera had abnormally reduced staining. Skeletal muscle total protein was normal using N-terminal, C-terminal, and rod region dystrophin antibody. The 156 kDa dystrophin-associated glycoprotein, a constituent of the dystrophin-associated glycoprotein complex, was decreased in abundance in cardiac tissue from all affected individuals as well [28]. Evaluation of the RNA transcript from heart was also consistent with low abundance message using the most 5' dystrophin cDNA probe; 3' cDNA probes produced a band with normal intensity. This has subsequently been con-

Gene Mapping for Dilated Cardiomyopathy (DCM)

DCM with Skeletal Findings (X-Linked)

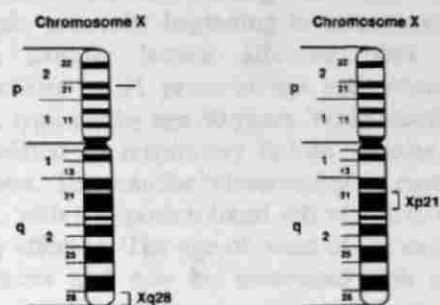


Fig. 5. X-linked dilated cardiomyopathy gene mapping to Xq28 [40] in Barth syndrome (left panel) and Xp21 [27] in XLCM (right panel) is shown in this illustration. The gene for XLCM has been shown to be dystrophin.

firmed. No intragenic deletions were found using multiplex PCR analysis of the 14 common regions of dystrophin in which deletions are seen. This approach eliminated 98% of the usual portions of the dystrophin in which deletions have been reported.

The dystrophin gene was first localized to the short arm of the X chromosome by inheritance patterns, linkage analysis, and cytogenetically detectable defects in the region of the X chromosome in DMD patients. The Xp21 band in the mid-portion of the short arm was pinpointed as the site of the DMD gene locus, cloned fragments of DNA from this region were used as probes in skeletal muscle to find the mRNA transcribed, and sequence data from the RNA transcript provided the information needed to determine the amino acid sequence of the protein dystrophin. Mutations in the dystrophin gene may cause either low level production of a non-functional protein or complete absence of dystrophin in the

heart and skeletal muscle of affected patients. The dystrophin gene is amongst the largest genes discovered thus far, comprising approximately 2.5 Mb and transcribing a 14 kb mRNA molecule [29]. The gene is normally expressed in striated and smooth muscle, as well as in brain. In muscle tissue, the 427 kDa dystrophin protein [30] has been localized to the cytoplasmic surface of the sarcolemma and is believed to be a cytoskeletal protein that is associated with several integral membrane glycoproteins. This glycoprotein/dystrophin complex [31] may be involved in the regulation of intracellular calcium since dystrophin-deficient muscle has abnormally high levels of intracellular calcium and increased calcium channel leak activity has been observed at the cell membrane. This complex appears to be involved in the production of the cardiomyopathic phenotype [32,33].

The dystrophin mRNA transcripts in muscle and brain tissue have sequence differences. The mRNA transcript is alternatively spliced to encode multiple isoforms of the dystrophin protein in a developmental- and tissue-specific manner. Several of these isoforms appear to be unique for the heart; this post-transcriptional modification may result in a functional diversity for the dystrophin protein. Recently, human cardiac purkinje fibers have been shown to express dystrophin isoforms [34] and it is speculated that this may be important in the development of cardiac arrhythmias in this disorder.

DMD, also known as pseudohypertrophic muscular dystrophy, is the most common and most devastating of the human muscular dystrophies. This disease affects approximately 1 in 3500 males born, 1/3 of which results from new mutations. Typically, no obvious clinical manifestations are exhibited until 18 months of age when proximal muscle weakness is first

A. DIRECCIÓN GENERAL B. DE BIBLIOTECAS

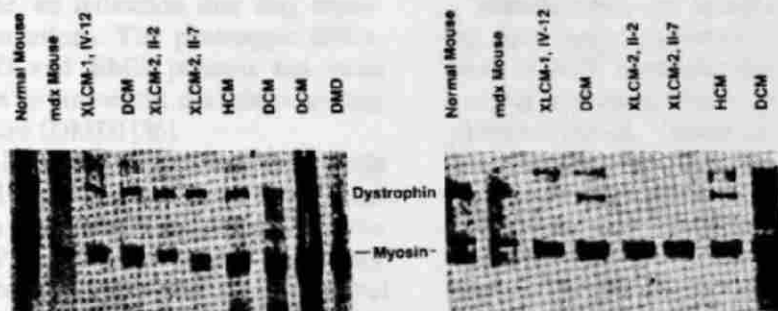


Fig. 6. Western blot analysis of cardiac dystrophin in XLCM. (A) N-terminal dystrophin antibody immunoblotted against cardiac protein from patients with XLCM, dilated cardiomyopathy (DCM), hypertrophic cardiomyopathy (HCM), Duchenne muscular dystrophy (DMD), muscular dystrophy mouse (*mdx* mouse), and normal mouse. The 427 kDa dystrophin protein band is normal in all lanes except the *mdx* mouse and DMD patient, in whom no band is seen. (B) N-terminal dystrophin antibody immunoblotting against cardiac protein obtained from the same patients shown in panel A demonstrates low abundance or non-staining of dystrophin in patients with XLCM, as well as the *mdx* mouse. This is consistent with a cardiac dystrophin mutation in the 5' portion of the gene which codes for the N-terminal portion of the protein.

observed [13]. The children usually display delayed onset of walking, frequently after 18 months of age. Progressive muscle wasting and loss of muscle strength, generally beginning between ages 3 and 6 years, usually leaves affected boys requiring wheelchairs by 11 years of age and results in early death, typically by age 30 years. While death is generally related to respiratory failure, cardiac failure is common. The cardiac abnormality is most typically DCM, with the posterobasal left ventricle most commonly affected. The age of onset of the cardiomyopathy varies and may be associated with cardiac arrhythmias. Female carriers occasionally manifest clinical disease, but typically this is milder and has later onset than affected males. Histologically, most skeletal muscle groups demonstrate widespread, but focal, degeneration and regeneration of individual muscle fibers. High concentrations of muscle-specific enzymes may be present in the serum of female carriers and affected males before the clinical onset of disease. This has been used clinically as an adjunct to diagnosis; the muscle isoform of creatine kinase (CK-MM) is most commonly measured and is elevated in a substantial percentage of patients. However, false negative results are common.

BMD is a less severe form of X-linked muscle wasting disorder which is similar to DMD. In general, BMD is more benign and less common than DMD, occurring approximately 10% as frequently as DMD. Clinically, BMD has later onset and slower progression of muscle weakness. Cardiac disease, in the form of DCM, may occur, but is also less frequent and typically less severe than that seen in DMD. However, there are occasional patients who demonstrate moderate to severe cardiomyopathy requiring cardiac transplantation. Genetically, the BMD-causing gene is also located at Xp21, and represents a different mutation of the same gene (dystrophin) causing DMD; i.e. it is allelic with DMD. As is the case with DMD, more than 30% of patients with BMD have no family history of the disease, an indication that they represent spontaneous mutations. The phenotypic difference between DMD and BMD patients has been speculated to be due to frameshift mutations leading to more severe disease (DMD) [35].

Muntoni et al. [36] described a mutation in a family with an X-linked dilated cardiomyopathy and mild skeletal disease. In this family, a deletion in the muscle promoter (P_m) and exon 1 (E1) was found. These authors subsequently outlined a potential mechanism for cardio-specific disease in XLCM [37]. They suggested that the brain promoter (P_B), which usually is not active in skeletal muscle, becomes quite active and hence protects the skeletal muscle from becoming clinically abnormal. Although the authors suggested this mutation to be the common disease-

causing mutation in patients with XLCM, it remained unclear why previously reported patients with this same mutation and evidence of mild muscular dystrophy, had no evidence of heart disease. Only mild skeletal muscle symptoms were reported in these patients. Yoshida et al. [38] has reported two patients with exon 1 deletions alone in whom dilated cardiomyopathy was seen, however. Towbin and Ortiz-Lopez [39] showed that the three families evaluated in their laboratory using the same primers as Muntoni et al. had normal muscle promoter and exon 1 sequences. Other mutations in the remaining families are expected to further define the mechanisms of cardio-specific dysfunction.

4.2.1. Barth syndrome

Molecular mapping of the locus for Barth syndrome has demonstrated linkage to Xq28 [40], the distal portion of the long arm of the X chromosome (Fig. 5). The causative gene has not been found thus far, although two disorders, Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) and X-linked myotubular myopathy, both have clinical overlap and map to this region. It is possible that Barth syndrome and EDMD are related, in a manner similar to that noted for XLCM and DMD/BMD.

EDMD is a rare disease characterized by contractures and severe cardiac manifestations including complete heart block requiring pacemaker implantation early in adolescence, and DCM. EDMD carriers are also at risk to show cardiac abnormalities and sudden death, but typically do not have significant skeletal disease. Since the gene responsible for EDMD is now known to be emerin [41], a serine-rich 254 amino acid protein with uncertain function, analysis of families with Barth syndrome for emerin mutations should soon be reported.

4.3. Mitochondrial dilated cardiomyopathy

Mitochondria are cytoplasmic organelles responsible for energy production in all cells. Energy in the form of ATP is generated by a series of complicated enzyme processes that together are called oxidative phosphorylation. Oxidative phosphorylation involves five enzyme complexes assembled from polypeptides coded by mitochondrial and nuclear DNA.

The human mitochondrial genome is a small (16 569 bp) circular DNA molecule that is maternally inherited. [42] Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes 13 of the 69 proteins required for oxidative metabolism, 22 transfer RNAs (tRNAs) and 2 ribosomal RNAs (rRNAs) required for their translation. Since mtDNA has much less redundancy than the nuclear genome (in which essentially identical information is received from both parents), and tRNAs and rRNAs are pre-

sent in multiple copies, the mitochondrial genome is an excellent target for mutations giving rise to human disease. In fact, the rate of mtDNA mutation is estimated to be 10-20 times higher than that of nuclear DNA [43]. Mitochondria enjoy a symbiotic relationship with the cell, but mtDNA replicates independently of the nuclear genome. These subcellular organelles are dependent on nucleocytoplasmic mechanisms for most structural components, but do contribute vital peptides that are central to cellular respiration. Mitochondria contain a permeable outer membrane and a highly restrictive inner membrane that guards the chemical micro-environment of the matrix compartment. Adaptive mechanisms exist for the passage of large and small molecules across the inner membrane. Translocases shuttle monocarboxylic acids, amino acids, acyl-carnitine conjugates, small ions, and other metabolites in and out of the mitochondrial matrix. Energy is required for importation of proteins into the mitochondria since the nuclear gene-synthesized mitochondrial proteins are precursor molecules that require presequence cleavage. The 13 mtDNA genes are located in the respiratory chain and include seven Complex I subunits (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5, and 6); 1 Complex III subunit (cytochrome b); 3 Complex IV subunits (COI, II, III); and 2 Complex V subunits (ATPase 6 and 8). Coordination must exist between nuclear and mitochondrial genomes to permit assembly of the complex holoenzymes. Each cell contains numerous mitochondria and each mitochondria contains multiple copies of mtDNA. This genetic material derives exclusively from the female gamete and any mutation must be passed from female parent to all progeny, male and female. Mitochondria are randomly distributed to daughter cells during cell division so that there is often a heterogeneous population of normal and mutant genomes within a given cell. Replicative segregation occurs when there are mtDNA molecules with different nucleotide sequences within a cell. The normal state for humans is homoplasmy (i.e. all mtDNA molecules have the same nucleotide sequence), but in disease states, at least two different mtDNA sequences are seen within the cells. During cell division, the different types of mtDNA are randomly distributed to daughter cells. This partitioning of mtDNA molecules is called replicative segregation. The replicative segregation of mutant mtDNA copies within the cell determines whether this biological disadvantage is expressed. In most mitochondrial disorders, patients carry a mix of mutant and normal mitochondria—a condition known as heteroplasmy, with the proportions varying from tissue-to-tissue and individual-to-individual within a pedigree, in a manner correlating with severity of phenotype. Clinical manifestations develop when the number of mutant

mtDNA molecules causes a decrease in the production of ATP to a level less than the threshold required by the tissue for normal function. Replicative segregation may produce dramatically different quantities of mtDNA mutation within different tissues so a single organ may be more affected than others.

Mitochondrial diseases often produce disturbances of brain and muscle function, presumably because these two organs are so metabolically active, and therefore the metabolic demand is high during growth and development. Cardiac disease is most commonly seen with respiratory chain defects [44]. Ragged red fibers are present in muscle biopsy specimens almost invariably when the molecular defect involves mtDNA. [45] These defects represent the genetics of ATP production. The diverse clinical syndromes associated with various respiratory chain complexes are thought to result from involvement of tissue-specific isoforms in some cases, involvement of tissue-nonspecific (generalized) subunits in other cases, and the residual enzyme activity in affected tissues. The cardiac diseases seen associated with mitochondrial defects include both hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and DCM. No theory has thus far been advanced to explain the cause of these phenotypically different cardiac abnormalities. It is possible, however, that the dilated form occurs after an initial hypertrophic response (i.e. in a 'burnt-out' dilated form of HCM).

Mitochondrial DNA mutations fall into three categories: deletions, duplications, and point mutations. All three types of mutations have significant cardiac manifestations [42-46].

5. Respiratory chain abnormalities

5.1. Complex I deficiency

Approximately 60 cases have been described, approximately 20 of these representing the myopathic syndrome, and 40 cases representing the encephalomyopathic syndrome. The latter includes: (1) a fatal infantile disorder with involvement of brain, muscle, and heart; (2) a milder version of above, with clinical manifestations later in childhood or early adulthood; and (3) MELAS syndrome with Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes thought secondary to NADH CoQ reductase abnormalities. Treatment of these disorders is limited. Riboflavin, succinate supplements (since the metabolite enters the respiratory chain at Complex II), ubiquinone and idebanone have been recommended for therapy in patients with MELAS. A mitochondrial mutation was initially described in a patient with MELAS and fatal infantile cardiomyopathy: this mutation was shown to be due to an A to G transition in mitochondrial DNA of the isoleucine

tRNA gene. Analysis of enzyme activities and subunits in the heart revealed combined defects of Complex I and Complex IV of the respiratory chain. Similar mutations have subsequently been described.

5.2. Complex III defects

This results in a myopathic or multi-systemic disorder. Cardiomyopathy has been found both alone or in conjunction with skeletal myopathy. Encephalomyopathy also presents with retinopathy, ataxia, spasticity, dementia, weakness, sensorineural hearing loss, and exercise intolerance.

5.3. Complex IV defects

This abnormality is similar clinically to Complex I defects. The mitochondrial genome encodes for three subunits of cytochrome C oxidase, which represents the terminal portion of the respiratory chain and catalyzes conversion of molecular oxygen to water. A benign reversible infantile myopathy which normalizes by early childhood may occur, or a fatal infantile myopathy manifested by profound weakness, hypotonia, respiratory insufficiency, and death. This may occur alone, or in association with severe renal tubular dysfunction or cardiomyopathy with red ragged fibers.

5.4. Kearns-Sayre syndrome (KSS)

This mitochondrial myopathy is characterized by ptosis, chronic progressive external ophthalmoplegia, abnormal retinal pigmentation, and cardiac conduction defects, as well as DCM. Approximately 20% of KSS patients have cardiac involvement and, of these, the majority usually have conduction defects causing progressive heart block. These patients generally have large heterogeneous deletions in the mtDNA. Other mutations have also been described.

5.5. MERRF syndrome

This syndrome is characterized by Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Muscle Fibers and is caused by a single nucleotide substitution in tRNA^{LYS} which apparently interferes with mitochondrial translation. Shoffner et al. [45] showed an A to G transition mutation as the cause of the disease associated with defects in Complexes I and IV. This abnormality causes decline in ATP-generating capacity, with onset of disease that includes cardiomyopathy. Other reports have outlined various disease-causing mutations.

5.6. Hypoxemia, mtDNA damage, and cardiac disease

Since cardiac tissue relies on mitochondrial oxida-

tive phosphorylation for energy production, it has been believed that deficiency of portions of this system or its end-product can cause cardiac abnormalities. Hypoxemia has been shown to increase oxygen radical production, which results in elevated mtDNA damage and altered oxidative phosphorylation gene expression. In addition, these enzymes have been shown to decline with age while mtDNA deletions increase with age, especially deletion at nucleotide 4977 bp. Corral-Debrinski et al. [47] hypothesized that ischemic hearts would be likely to have increased chances of mtDNA deletion due to this effect of hypoxemia and, using PCR amplification across the deletion breakpoint of the common mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion showed mtDNA damage was increased in chronically ischemic hearts, as well as in some hearts with other forms of chronic cardiac disease (i.e. DCM, HCM). It is possible that oxidative phosphorylation gene induction may be part of a general response to chronic cardiac failure. Other reports have supported this view. In addition, there is some support that endomyocardial biopsies should be performed in patients with HCM or DCM to increase the likelihood of detecting mitochondrial abnormalities.

6. Inborn errors of metabolism causing cardiomyopathy

Mitochondrial β -oxidation of fatty acids is the main source of energy for the heart [16]. Inborn errors of myocardial fatty acid oxidation have been increasingly recognized as important causes of inherited cardiomyopathy, skeletal myopathy, metabolic disturbances, and sudden cardiac death in childhood during the past decade [16]. Most cellular fatty acid oxidation occurs via the mitochondrial β -oxidation pathway and inborn defects of the enzymes or transport proteins of this pathway are common causes of inherited metabolic diseases (estimated incidence 1/10 000-1/15 000 live births). Defects involving oxidation of long chain fatty acids are more likely to cause cardiomyopathy than those involving metabolism of medium-chain or short-chain fatty acids. Cardiomyopathy may result from defects in carnitine transport into cells, carnitine-acylcarnitine shuttling, or fatty acid oxidation enzymes.

All known inborn errors of fatty acid oxidation are autosomal recessive disorders. The molecular basis of several of these are known; these are described below.

6.1. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency

This disorder, first described in 1982, appears to be the most common inborn error of fatty acid oxidation, estimated to occur in one per 6000-10 000 live Caucasian births. It is characterized by recurrent episodes

of illness, provoked by fasting > 12 h, with the first episode generally occurring between 6-24 months of life. The most common symptoms include vomiting and severe lethargy that can progress to coma, as well as the less striking symptoms of muscle weakness and exercise intolerance. Hypoglycemia is often present between episodes, when patients appear normal. Hepatomegaly and DCM are also seen. Liver biopsy can show marked fatty infiltrate ranging from predominantly microvesicular to a macrovesicular pattern. This autosomal recessive disorder has recently been localized to chromosome 1p31. Human and rat MCAD cDNAs have been cloned and sequenced, as has the entire human MCAD gene. The coding region is 1263 bp and encodes a precursor protein containing 421 amino acids. An A to G nucleotide replacement at position 985 of MCAD cDNA appears to be the most prevalent mutation responsible for MCAD deficiency; a 13 bp tandem repeat insertion at position 999 has also been reported, as have other rare mutations [48]. The common A to G 985 mutation appears to be due to a founder effect.

6.2. Long chain acyl CoA dehydrogenase (LCAD) deficiency / very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency

This disorder was first described in 1985 and clinically manifests with recurrent episodes of coma, vomiting, and hypoglycemia triggered by fasting. Some patients have much more severe illness with notable involvement of cardiac and skeletal muscle. Both DCM and HCM have been seen [16]. Like MCAD, LCAD patients have secondary carnitine/deficiency and their fasting urine organic acid profile is abnormal, with low ketones and increased levels of dicarboxylic acids. The LCAD gene was identified but unlike many of the patients with MCAD deficiency, no mutations or abnormal immunoreactive proteins were identified. In 1992, Iwai et al. [49] and Uchida et al. [50] showed that in addition to the well known β -oxidation enzymes in the mitochondrial matrix, there are two additional membrane-bound enzymes of β -oxidation. One of these has been called 'very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD), while the other is known as a 'trifunctional protein.' This new understanding of the mitochondrial β -oxidation pathway has led to a new understanding of the disorder thought to be due to LCAD deficiency, but now thought to be VLCAD deficiency.

6.3. Carnitine deficiency

L-carnitine is a small, water-soluble molecule containing seven carbon atoms, which is excreted in the urine in the free state or esterified to various acyl-

conjugates. Carnitine is important in the shuttling of long-chain fatty acids and activated acetate across the inner mitochondrial membrane. A specific translocase facilitates this exchange of long-chain acylcarnitine and acetylcarnitine. Carnitine also serves as the shuttle for the end-products of peroxisomal fatty acid oxidation and for α -keto-acids derived from branch chain amino acids. These metabolites are transferred into the mitochondrial matrix for terminal oxidation.

Primary carnitine deficiency syndrome is characterized by a profound decrease in carnitine in affected tissues and plasma. The mechanism underlying the primary disorder is defective transport of carnitine from the plasma into cells and defective transport across kidney tubules resulting in urinary loss of carnitine [51]. Secondary disorders are characterized by less striking decreases in total or free serum carnitine and an increase in esterified: free ratio. The secondary forms are more heterogeneous and include underlying genetically determined metabolic errors, diverse acquired disease, and iatrogenic factors such as drug administration.

The primary form (transport defect) of carnitine deficiency demonstrates multiple tissues affected, including muscle, liver, heart, and plasma. Patients present in infancy or early childhood with episodes of hypoglycemia, hyperammonemia, hepatomegaly, muscle weakness and congestive heart failure. Therapy includes oral carnitine, usually reversing the cardiomyopathy [52]. Once the gene locus and biochemical defect are further elucidated, gene therapy may become a useful endeavor for these patients.

7. Conclusion

In summary, the underlying causes of dilated cardiomyopathy are currently an area of investigation using molecular technology. In the years leading up to the 21st century, many of these causes are likely to be identified. This information is expected to improve the ability to diagnose patients pre-symptomatically, as well as enable development of more specific therapies.

Acknowledgements

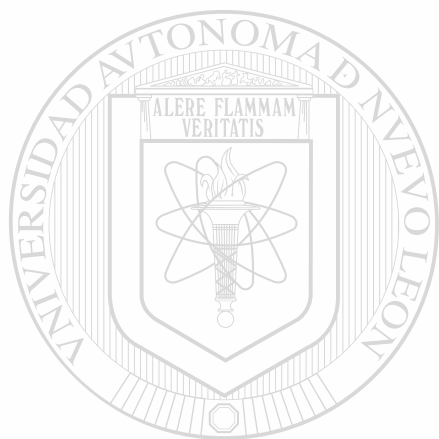
The authors wish to thank Valerie R. Price for her expert secretarial support. This work was supported in part by grants NIH NHLBI 1R01 HL53392-01-Pediatric Cardiomyopathy Registry (JAT) and Howard Hughes Pre-doctoral Fellowship (KRS)

References

- [1] Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994;331:1564-1575.

- [2] Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R et al. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (Summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop). *Am J Cardiol* 1992;69:1458-1466.
- [3] Mestroni L, Miani D, Di Lenarda A et al. Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1990;65:1449-1453.
- [4] McKenna WJ, Thiene G, Nava A et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994;71:215-218.
- [5] Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ III. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989;80:564-572.
- [6] Abelmann WH. Incidence of dilated cardiomyopathy. *Postgrad Med J* 1985;61:1123-1124.
- [7] Kasper EK, Agena WRP, Hutchins GM, Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:586-590.
- [8] Michels VV, Driscoll DJ, Miller FA Jr. Familial aggregation of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1985;55:1232-1233.
- [9] Valentine HA, Hunt SA, Fowler MB, Billingham ME, Schroeder JS. Frequency of familial nature of dilated cardiomyopathy and usefulness of cardiac transplantation in this subset. *Am J Cardiol* 1989;63:959-963.
- [10] Michels VV, Moll PP, Miller FA et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992;326:77-82.
- [11] Keeling PJ, Gang Y, Smith G et al. Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. *Br Heart J* 1995;73:417-421.
- [12] Emanuel R, Withers R, O'Brien K. Dominant and recessive modes of inheritance in idiopathic cardiomyopathy. *Lancet* 1971;2:1065-1067.
- [13] Towbin JA. Molecular genetic aspects of cardiomyopathy. *Biochem Med Metab Biol* 1993;49:285-320.
- [14] Graber HL, Unverferth DV, Baker PB, Ryan JM, Baba N, Woolley CF. Evolution of a hereditary cardiac conduction and muscle disorder: A study involving a family with six generations affected. *Circulation* 1986;74:21-35.
- [15] Greenlee PR, Anderson JL, Lutz JR, Lindsay AE, Hagan AD. Familial automaticity-conduction disorder with associated cardiomyopathy. *West J Med* 1986;144:33-41.
- [16] Kelly DP, Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 1994;330:930-932.
- [17] Berko BA, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1987;316:1186-1191.
- [18] Barth PG, Scholte HR, Berden JA et al. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leukocytes. *J Neurol Sci* 1983;62:327-355.
- [19] Kass S, MacRae C, Graber HL et al. A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to 1p1-1q1. *Nature Genet* 1994;7:546-551.
- [20] Olson TM, Keating MT. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J Clin Invest* 1996, in press.
- [21] Krajcinovic M, Pinamonti B, Sinagra G et al. Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. *Am J Hum Genet* 1995;57:846-852.
- [22] Durand J-B, Bachinski LJ, Bieling L et al. Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32. *Circulation* 1995;92:3387-3389.
- [23] Schultz KR, Gajarski RJ, Pignatelli R et al. Genetic heterogeneity in familial dilated cardiomyopathy. *Biochem Molec Med* 1995;56:87-93.
- [24] Rampazzo A, Nava A, Danielli GA et al. The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Hum Mol Genet* 1994;3:959-962.
- [25] Rampazzo A, Nava A, Erbe P et al. A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet* 1995;4:2151-2154.
- [26] Severini GM, Krajcinovic M, Pinamonti B et al. A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14. *Genomics* 1996;31:193-200.
- [27] Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb BD, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ERB, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993;87:1854-1865.
- [28] Towbin JA. Biochemical and molecular characterization of X-linked dilated cardiomyopathy. In: Clark EB, Markwald RR, Takao A, eds. *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. New York: Futura Publishing, 1995:121-132.
- [29] Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
- [30] Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-928.
- [31] Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66:1121-1131.
- [32] Iwata Y, Nakamura H, Fujiwara K, Shigekawa M. Altered membrane-dystrophin association in the cardiomyopathic hamster heart muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;190:589-595.
- [33] Roberts SL, Ervasti JM, Anderson RD et al. Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J Biol Chem* 1993;268:11496-11499.
- [34] Bies RD, Friedman D, Roberts R, Perryman MB, Caskey CT. Expression and localization of dystrophin in human cardiac Purkinje fibers. *Circulation* 1992;86:147-153.
- [35] Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M. Frameshift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 1988;242:755-759.
- [36] Muntoni F, Cau M, Gansu A et al. Brief report: Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1993;329:921-925.
- [37] Muntoni F, Wilson L, Marrow G et al. A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J Clin Invest* 1995;96:693-699.
- [38] Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A et al. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with Becker muscular dystrophy presenting with dilated cardiomyopathy. *Muscle Nerve* 1993;16:1161-1166.
- [39] Towbin JA, Ortiz-Lopez R. X-linked dilated cardiomyopathy is not due to a muscle promoter deletion in dystrophin in 3 families. *N Engl J Med* 1994;330:369-370.
- [40] Bolhuis PA, Hensels GW, Hulsebos TJM, Baas F, Barth PG. Mapping of the locus for X-linked cardioskeletal myopathy with neutropenia and abnormal mitochondria (Barth syndrome) to Xq28. *Am J Hum Genet* 1991;48:481-485.
- [41] Biome S, Maestrini E, Rivella S et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet* 1994;8:323-327.
- [42] Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992;61:1175-1212.
- [43] Wallace DC. Mitochondrial genetics: A new paradigm for aging and degenerative disease. *Science* 1992;256:628-632.

- [44] Zeviani M, Gellera C, Antozzi C et al. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA (RNA^{4448(UUR)}). *Lancet* 1991;338:143-147.
- [45] Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myotonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA (RNA⁴⁴⁴⁸) mutation. *Cell* 1990;61:931-937.
- [46] Suomalainen A, Paetau A, Leinonen H, Majander A, Peltonen L, Somer H. Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 1992;340:1319-1320.
- [47] Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction: implications for cardiac disease. *J Am Med Assoc* 1991;266:1812-1816.
- [48] Kelly DP, Hale DE, Rutledge SL et al. Molecular basis of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing sudden childhood death. *J Inher Metabol Dis* 1992;15:171-180.
- [49] Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T. Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992;267:1027-1033.
- [50] Uchida Y, Izai K, Orii T, Hashimoto T. Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem* 1992;267:1034-1041.
- [51] Stanley CA, DeLecuw S, Coates PM et al. Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake. *Ann Neurol* 1991;30:709-716.
- [52] Pierpont MEM. Carnitine and myocardial function. In: Carter AL, ed. *Current Concepts in Carnitine Research*. Boca Raton; CRC Press, 1992:197-212.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Evidence for a Dystrophin Missense Mutation as a Cause of X-Linked Dilated Cardiomyopathy

Rocio Ortiz-Lopez, MS; Hua Li, PhD; Jason Su, DO; Veronica Goytia, BS; Jeffrey A. Towbin, MD

Background X-linked dilated cardiomyopathy (XLCM) has previously been shown to be due to mutations in the dystrophin gene, which is located at Xp21. Mutations in the 5' portion of the gene, including the muscle promoter, exon 1, and the exon 1-intron 1 splice site, have been reported previously. The purpose of this study was to analyze the originally described family with XLCM (and others) for dystrophin mutations.

Methods and Results Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify genomic DNA, and reverse-transcriptase PCR amplified cDNA from RNA obtained from heart and lymphoblastoid cell lines. Primers to the muscle promoter, brain promoter, and Purkinje cell promoter were designed, in addition to the exon 1 to exon 14 regions of dystrophin. Single-strand conformation polymorphism analysis was used for mutation detection, and DNA

sequencing defined the mutation. Protein modeling was used for amino acid and secondary structure analysis. A missense mutation in exon 9 at nucleotide 1043 was identified that causes an alanine to be substituted for threonine, a highly conserved amino acid, at position 279 (T279A). This mutation results in a change in polarity in the evolutionarily conserved first hinge region (H1) of the protein and substitution of a β -sheet for α -helix in this portion of the protein, destabilizing the protein.

Conclusions A novel missense mutation in exon 9 of dystrophin causing an abnormality at H1 leads to the cardiospecific phenotype of XLCM. (*Circulation*. 1997;95:2434-2440.)

Key Words • cardiomyopathy • genetics • dystrophin • mutation

Dilated cardiomyopathy, the most common form of primary myocardial disease, is a major cause of morbidity and mortality and a leading indication for cardiac transplantation.¹⁻³ Approximately 20% to 30% of all cases of DCM are inherited,^{4,5} with autosomal dominant transmission being most common; autosomal recessive, X-linked, and mitochondrial inheritance patterns have also been described.^{6,7}

XLCM is a severe and rapidly progressive myocardial disease that affects young men in their teens or early twenties.⁸ Typically, affected males present with severe congestive heart failure that results in death or cardiac transplantation within 1 to 2 years of diagnosis. Clinically, XLCM appears to be identical to other causes of DCM except for its X-linked transmission^{6,8,9} and elevated serum CK-MM without evidence of clinical skeletal myopathy. Female carriers with XLCM may manifest symptoms later in life, usually in the fifth decade, but the disease is mild and progresses slowly.⁸

Molecular genetic linkage to the 5' end of the dystrophin gene at Xp21 was previously reported by Towbin et al.⁹ In addition, N-terminal dystrophin antibody against cardiac tissue protein extracts showed decreased abundance (or absence) of dystrophin, whereas C-terminal antibody immunoblots were normal.⁹ Dystrophin antibody against the rod domain also demonstrated low

abundance of protein.¹⁰ Immunoblots using N-terminal, C-terminal, and rod domain dystrophin antibodies against skeletal muscle protein demonstrated normal dystrophin, however.^{9,10}

See p 2344

The dystrophin gene, which causes DMD and the milder allelic form, BMD, is the largest gene identified in humans thus far, covering >2.5 Mb and having 79 exons.^{11,12} The corresponding 14-kb dystrophin mRNA is expressed predominantly in skeletal, cardiac, and smooth muscle, although lower levels also appear in brain. Transcription of dystrophin in different tissues is regulated from either the P_B,¹³⁻¹⁵ which is active predominantly in neuronal cells; the P_M,¹⁶ which is active in differentiated myogenic cells and glial cells; and the P_C,^{17,18} which is active in cerebellum. The resultant protein, dystrophin,^{12,19} is a 427-kD protein localized to the cytoplasmic face of the sarcolemma, colocalizing with β -spectrin and vinculin at the sarcolemma.²⁰ The C-terminal region of dystrophin is bound to the protoplasmic half of the plasmalemma. Thus, dystrophin forms an intricate part of the muscle cytoskeleton and may function to link the normal contractile apparatus to the sarcolemma. In skeletal and cardiac muscle, the C-terminal domain is bound to a large oligomeric glycoprotein complex of six novel proteins localized to the sarcolemma²¹⁻²⁴; the N-terminus attaches to actin.

In DMD, the levels of all members of the oligomeric glycoprotein complex are reduced.²⁵ In BMD, however, there is only a general mild reduction in these proteins.²⁶ It is believed that dystrophin localizes or stabilizes this oligomeric protein complex.²⁷ Without dystrophin, the complex is unable to organize properly, and consequently the linkage between the extracellular matrix and sarcolemma is disrupted.²⁸

Received June 3, 1996; revision received November 12, 1996; accepted December 13, 1996.

From the Departments of Pediatrics (R.O.-L., H.L., I.S., V.G., J.A.T.) and Molecular and Human Genetics (J.A.T.), Baylor College of Medicine, Houston, Tex.

Guest editor for this article was Christine Seidman, MD, Harvard Medical School, Boston, Mass.

Reprint requests to Jeffrey A. Towbin, MD, Pediatric Cardiology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Room 333E, Houston, TX 77030. E-mail: jtowbin@bcm.tmc.edu

© 1997 American Heart Association, Inc.

Selected Abbreviations and Acronyms

BMD	= Becker muscular dystrophy
C-terminal	= carboxy-terminal
CK-MM	= creatine kinase muscle isoforms
DCM	= dilated cardiomyopathy
DMD	= Duchenne muscular dystrophy
E1	= exon 1
H1	= first hinge region
I1	= intron 1
N-terminal	= amino-terminal
P _B	= brain promoter
PCR	= polymerase chain reaction
P _M	= muscle promoter
P _P	= Purkinje-cell promoter
RT	= reverse-transcriptase
SSCP	= single-strand conformation polymorphism
XLCM	= X-linked dilated cardiomyopathy

Muntani et al²⁹ reported a deletion within the P_M and E1 of dystrophin in a family with DCM, X-linked inheritance, and mild abnormalities of skeletal muscle histology and dystrophin immunohistochemical staining. They showed this mutation to be the cause of disease in this family and speculated that this deletion was the responsible mutation in all patients with XLCM. More recently, these authors^{30,31} also confirmed the dystrophin protein findings of Towbin et al.^{9,10} Holder et al³² described a mutation in the muscle promoter that potentially affects cardiac-specific regulatory sequences and therefore could selectively cause DCM without significant skeletal myopathy. This mutation is quite uncommon in BMD and DMD patients screened for dystrophin deletions,³³ however. Since previous reports of P_M-E1 mutations in other unrelated patients were usually associated only with mild skeletal muscle disease without cardiac disease,^{13,34} doubt arose that this mutation was the only mutation leading to XLCM. In fact, only the patient reported by Yoshida et al³⁵ with an E1 deletion and normal P_M had DCM. In addition, Towbin and Ortiz-Lopez³⁶ reported on three families with documented XLCM in whom P_M-E1 was normal. More recently, Milasin et al³⁷ reported a point mutation in the 5' splice site of dystrophin E1-I1 boundary causing XLCM clinically and abolishing expression of dystrophin in cardiac tissue. Therefore, XLCM appears to be due to various different mutations in the dystrophin gene. In this report, we describe a novel missense mutation in the 3' end of dystrophin in the originally described family with XLCM,⁹ and we also provide further data that suggest that there is allelic heterogeneity for XLCM, because two other families with XLCM studied here have none of the reported dystrophin mutations.

Methods

Families and Linkage Analysis

Clinical evaluation and linkage analysis of the three families (XLCM-1, XLCM-2, and XLCM-3) were previously described.^{9,9}

Control Individuals

One hundred unrelated and unaffected individuals (50 male, 50 female; 50 black and 50 white), as determined by history, physical

examination, and echocardiography, were analyzed. After informed consent was obtained, blood for lymphoblastoid cell line immortalization³⁸ was obtained.

Procedures

RT-PCR. RNA was prepared from lymphoblastoid cell lines³⁸ or cardiac tissue as previously described.³⁹ Briefly, 2 µg of total RNA was reverse transcribed in a 20-µL reaction with 5 µg of random hexamer primers (Gibco-BRL) and 100 U murine Moloney leukemia virus RT at 37°C in the buffer provided by the supplier (Gibco-BRL). Of the RT reaction, 2 µL was used for each PCR reaction in 25 µL of 1.5 mmol/L MgCl₂, 67 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mmol/L ammonium sulfate, 0.01% Tween-20, 200 µmol/L of each dNTP, 25 pmol of each primer, and 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega). PCR conditions included 94°C for 3 minutes, 30 cycles of 92°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and a final extension of 72°C for 5 minutes. The PCR products were visualized on 2% agarose gel. The primers used for the amplification of the first 14 exons of dystrophin cDNA were derived from the reported dystrophin sequence¹¹; primers used for RT-PCR were exon 1F, 5'-TGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATG-3'; exon 3R, 5'-TJGACCTGCCAGTGGAGGAT-3'; exon 4F, 5'-GCACTGCGGGTTTTGCAGAA-3'; exon 7R, 5'-GAATGCATCCAGTCGTTGTGT-3'; exon 6F, 5'-TGAATGCTCTCATCCAGTCATAG-3'; exon 10R, 5'-CTCTCCATCAATGAAGTCC-3'; exon 10F, 5'-CATTGCAAGCACAAAGGAGAG-3'; and exon 13R, 5'-CAGTTGCGTGATCTCCACTA GATTC-3'.

PCR amplification of genomic DNA. The primers used to amplify sequences of the P_B, P_M, P_P, and exon-intron junctions were designed with the previously reported sequences¹³⁻¹⁷ and conditions. The primers used for promoter amplification included the following: P_M, 5'-GAAGATCTAGACATGGATACATAACAAATGCATG-3'; E1_R, 5'-TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCAGATCTGAGTCC-3'; P_BF, 5'-GAA GATCTATATTTTACAACGCAGAAATGTGG-3'; P_BR, 5'-CTTCCATGCCAGCTGTTTTTCTGTCACCTC-3'; P_PF, 5'-CAGCTCCGCAGAAATTGAAATG-3'; and exon 2R, 5'-CTTAGAAAATTGTGCATTTACCCA-3'.

Multiplex PCR. Multiplex PCR was performed with the five primer pairs described by Beggs et al⁴⁰ and nine primer pairs designed by Chamberlain et al⁴¹; an additional set of primers designed to amplify exon 9 (F, 5'-GAATCTCTCGAGATCACG-3'; R, 5'-GTAATGTTGACAGACCTGTG-3') was also added to each. This multiplex PCR was performed under the following conditions: 94°C for 6 minutes, 94°C for 30 seconds, 54°C for 30 seconds, 65°C for 4 minutes (25 cycles), and 65°C for 7 minutes. Amplification products were visualized on a 3% agarose gel with ethidium bromide under ultraviolet light.

SSCP. Mutation analysis was performed by the method of Orta et al.⁴² PCR primers were designed to amplify a region including the 3' portion of intron 8 and the 3' end of exon 9. This region flanked the normal, polymorphic, or mutated sequence of exon 9 (Fig 1A, primers a through d). Radioactive PCR was performed with 100 ng genomic DNA in a 10-µL reaction containing 2.5 mmol/L MgCl₂, 10 pmol of each primer, 0.05 µCi [^γ-³²P]dCTP, 0.5 U *Taq* polymerase, and 30 rounds of amplification (92°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, and 72°C for 1 minute). After PCR amplification, the samples were denatured by addition of 5 µL formamide dye (95% formamide, 20 mmol/L EDTA, 0.05% bromophenol blue, and 0.05% xylene cyanol) at 85°C for 5 minutes. After 10 minutes of cooling on ice, 3 µL of sample was electrophoresed on a nondenaturing 10% polyacrylamide:bisacrylamide (50:1) gel at 8 W over 24 hours in a 4°C cold room. Bands were visualized by exposure of the dried gels to Kodak X-AR film.

Sequencing. Normal and aberrant SSCP conformers were cut directly from dried gels and eluted in 100 µL distilled water

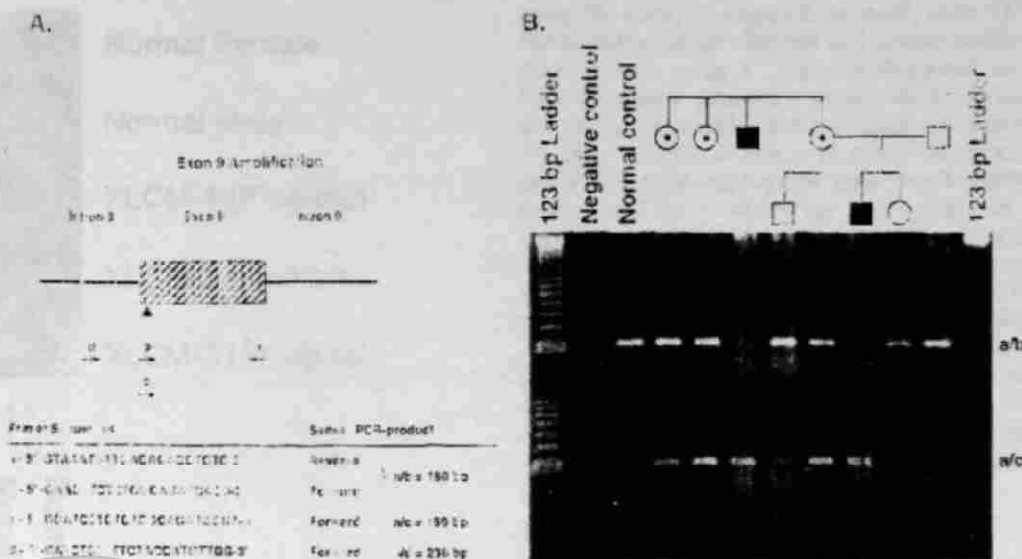


FIG 1. A, PCR analysis of dystrophin exon 9. Top, Position of primers (a through d) relative to intron 8 and exon 9 and position of mutation (denoted by \blacktriangle) found in affected and carrier members of XLCM-1. Bottom, Sequences of primers a through d and expected PCR products. Primers a/d were used to PCR-amplify normal exon 9 sequences; primers a/c were used to amplify mutated exon 9 sequences. Primers a/d were used for SSCP analysis. B, PCR analysis of eight members of XLCM-1 family. XLCM-1 family members analyzed (top) and resultant PCR products (bottom) are shown. With primers (a/b) designed to amplify normal dystrophin exon 9 sequence (top band) and primers (a/c) designed to amplify mutated sequence (lower band), PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel. Note that affected males amplify only mutated sequences; carrier females are heterozygous. All members of this family were evaluated with both primer pairs (data not shown), with expected results (based on clinical status) occurring in all cases. Genomic DNA was used as template for this experiment.

(65°C for 30 minutes), and the eluted DNA (10 μ L) was used as the template in a second PCR using the original primer pair. The PCR products were sequenced directly after fractionation in 2% low-melting agarose gel (FMC Corp) and purified by Qiaquick columns (Qiagen). Purified PCR products (200 ng) were used for each sequencing reaction with cycle sequencing.⁴³ Alternatively, purified PCR products were cloned into pBluescript 11 SK(+) (Stratagene) by the T-vector method as described previously.⁴⁴ Manual sequencing was performed according to conditions suggested by the supplier (United States Biochemical), and automated sequences were performed on an ABI Automated Sequencer (ABI model 373).

Protein modeling. Dystrophin sequences were analyzed for species conservation by use of GenBank. Analysis of amino acid sequences was performed by the MOSAIC computer program.^{45,46} Hydrophobicity and plot structure predictions were performed according to the Garnier-Osguthorpe-Robson prediction method.⁴⁷

Results

Phenotypic Analysis of XLCM Families

To identify the disease-causing mutations in XLCM, three previously described multigenerational families with familial DCM, X-linked inheritance, and no clinical evidence of skeletal disease were studied.⁸⁻¹⁰ These families were not related, and all were of North American descent. Two of the families were black (XLCM-1, XLCM-3) and one family was white (XLCM-2). All three families were previously found to have linkage to the 5' portion of the dystrophin gene at Xp21, with maximal logarithm-of-the-odds scores at intron 7 within DXS206.^{9,10}

PCR Amplification of Promoter-Specific Transcripts

With oligonucleotide primers designed to amplify sequences of the P_β,¹³ P_M,^{16,29} P_γ,¹⁷ and E1-11^{11,29,37} from DNA and RNA isolated from lymphoblastoid cell lines and cardiac tissue, normal amplification of all promoters and E1-11 was seen in all individuals. DNA sequencing revealed normal sequences of all amplified products.

5' Dystrophin Mutation Analysis

Primers designed to individually amplify exons 2 through 14 of dystrophin¹¹ were used to analyze the region with tightest linkage in XLCM-1, XLCM-2, and XLCM-3. In XLCM-2 and XLCM-3, all exons were able to be amplified, and the resultant amplicons were the predicted sizes. SSCP analysis was also normal (ie, no abnormal conformers) in XLCM-2 and XLCM-3, as were the sequences of all amplicons. In XLCM-1, however, exon 9 could not be amplified with normal

Exon 9 Sequence Conservation

Species	Sequence		
Human	ATC (Ile)	ACG (Thr)	GTC (Val)
Chicken	ATC (Ile)	ACG (Thr)	GTC (Val)
Dog	ATC (Ile)	ACG (Thr)	GTC (Val)
Mouse	ATC (Ile)	ACG (Thr)	GTC (Val)
XLCM-1	ATC (Ile)	GCA (Ala)	GTC (Val)

Dystrophin exon 9 sequence conservation between human and other species is shown. The sequence change in exon 9 of patients in XLCM-1 results in an amino acid substitution of alanine (Ala) for threonine (Thr). This substitution changes a polar, hydrophilic amino acid (threonine) to a nonpolar, hydrophobic amino acid (alanine). The flanking sequences are conserved for isoleucine (Ile) and valine (Val).

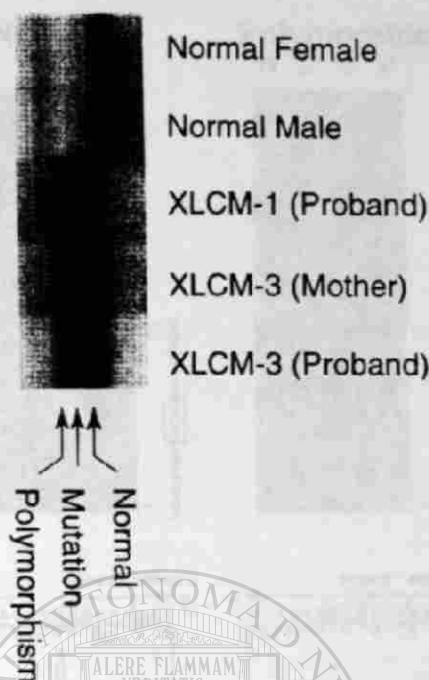


Fig 2. SSCP analysis of dystrophin exon 9 in genomic DNA from normal male and female individuals and individuals from XLCM-1 (proband) and XLCM-3 (mother and proband) with primers a through d. In XLCM-1 (lane 3), note aberrant conformer (ie, "mutation") that differs from normal and polymorphic bands seen in normal individuals (lanes 1 and 2) and XLCM-3 patients (lanes 4 and 5). All XLCM-1 affected and carrier individuals were found to have "mutation"; none of 100 normal control subjects or XLCM-2 or XLCM-3 patients had this abnormal conformer.

sequence primers (ie, primers a/b). SSCP analysis of affected and carrier individuals from XLCM-1 demonstrated an abnormal conformer at exon 9 in all affected individuals (hemizygous); a heterozygous result (an abnormal conformer and a normal conformer) was found in all carrier females (Fig 2). Evaluation of exon 9 sequence (GenBank reference No. X14298) identified a mutation at nucleotide 1043, with substitution of A→G only in affected and carrier individuals (Fig 3). The A→G mutation changes the conserved amino acid threonine at amino acid position 279 to alanine (T279A). This amino acid, which is within the H1 of dystrophin,^{48,49} is conserved across species⁵⁰⁻⁵⁴ (Table). Oligonucleotide primers containing the mutated sequence within the primers (primers a/c, Fig 1A) were able to amplify a PCR product in affected and carrier XLCM-1 patients but not in unaffected individuals (Fig 1B), whereas PCR primers designed to the normal sequence (primers a/b, Fig 1A) were able to amplify the normal exon 9 sequence in unaffected individuals but were unable to amplify this portion of exon 9 in affected patients in XLCM-1 (Fig 1B). This selective amplification of the mutated sequence in affected individuals by use of mutation-specific primers occurred because of the use of stringent PCR conditions and sequence-specific oligonucleotides. Multiplex PCR^{40,41} using 6 primer pairs (P_M, exon 9, exon 13, exon 43, exon 50, exon 52) and 10 primer pairs (exon 4, exon 8, exon 9, exon 12, exon 17,

exon 19, exon 44, exon 45, exon 48, exon 51) identified the mutation in all affected and carrier individuals from XLCM-1 at exon 9. Primers designed to flank the mutated region amplified appropriately in all individuals; sequence analysis in the affected patients in pedigree XLCM-1 identified this same mutation. Hence, the missense mutation segregates with disease status within family XLCM-1. No other individuals in XLCM-1, XLCM-2, or XLCM-3 had the A→G mutation at nucleotide 1043; none of 100 unrelated control individuals analyzed had the mutation as seen by PCR, SSCP, and mutation analysis. However, a G→A polymorphism in the third nucleotide of this codon was commonly detected at nucleotide 1045, consistent with codon redundancy (degenerate code). In fact, the G→A polymorphism at 1045 was seen in 8% of individuals in the three families as well as in 8% of the 100 unrelated normal control patients analyzed.

Dystrophin Protein Analysis

Analysis of amino acid sequences was performed by the MOSAIC computer program^{45,46}; prediction of α -helix and β -sheet was performed by a segment-oriented method designed to locate secondary structure elements. In addition, hydrophobicity and plot structure predictions were performed by use of the Garnier-Osguthorpe-Robson prediction.⁴⁷ The T279A amino acid substitution induces a change in the polarity in this critical region of the dystrophin protein because threonine is a neutral-polar amino acid and alanine is neutral-nonpolar. This, in turn, changes the secondary and tertiary structure of dystrophin by substituting a β -sheet for α -helix at the H1 between the N-terminal domain and rod domain of dystrophin^{49,55} (Fig 4).

Discussion

XLCM is the result of mutations within the dystrophin gene at the Xp21 locus. The missense mutation in dystrophin reported here in the originally described family with XLCM initially described by Berko and Swift⁸ is found within exon 9 (A→G at position 1043) and is within a critical structural region (H1) of this cytoskeletal protein.^{19,47-49,55,56} The resultant amino acid substitution (threonine→alanine) at amino acid 279 is within a highly conserved portion of the protein,⁵⁰⁻⁵⁴ causing a change in polarity in this part of the protein and leading to a change in the dystrophin secondary and tertiary structure. The end result is conversion of a segment of α -helix to a β -sheet in the H1 between the N-terminal domain and the rod domain of dystrophin⁴⁹; this abnormality could potentially destabilize the protein. This mutation was not found in the other two XLCM families (XLCM-2, XLCM-3) studied.

Dystrophin is predicted to fold into four domains,^{19,49,56} including the N-terminal domain, a long repeat domain (rod domain), a cysteine-rich domain, and a C-terminal domain. The N-terminal domain has significant similarity to the N-terminal domain of α -actinin and β -spectrin,^{57,58} possibly reflecting a common actin-binding function. The large midportion of the protein is formed by repeat elements predicted to adopt a triple-helical conformation,⁵⁹ and this region is quite similar to that seen in α -actinin and spectrin as well. In dystrophin, this repeat domain is composed of 24 repeat units (=109

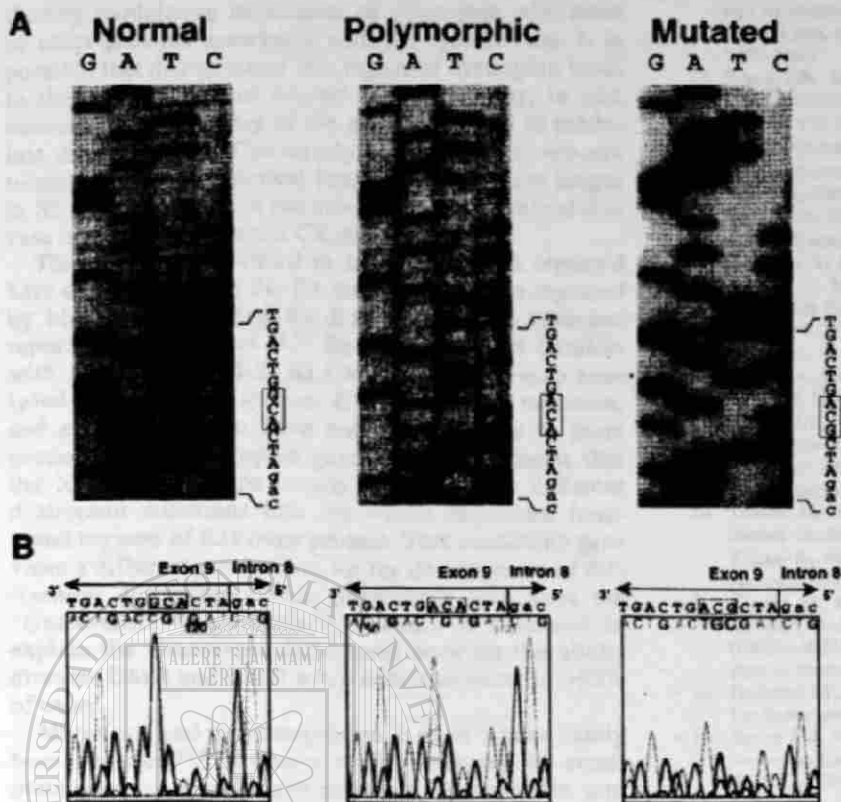


FIG 3. Manual (A) and automated (B) sequencing of normal, polymorphic, and mutated conformers obtained by SSCP. Mutated sequence A→G at nucleotide 1043, which occurred in proband and all affected and carrier individuals from XLCM-1, changes conserved amino acid threonine (at position 279) to alanine. Polymorphism seen in normal population and XLCM-2 and XLCM-3 patients is also shown.

amino acid repeats) and shows evolutionary conservation.⁶⁰ In addition, Koenig and Kunkel⁴⁹ showed that four hinge segments are interspersed along the dystrophin molecule, and these hinges appear to confer flexibility to the membrane-associated network of dystrophin, resulting in membrane resilience. The existence of these flexible hinges at precise positions within the elongated dystrophin molecule is thought to be important for the mechanical properties of the membrane cytoskeleton. It is possible that flexibility is needed during contraction-relaxation of the muscle fibers. These hinge regions are found at positions within the protein encoded by exon 9 and part of exon 8 (hinge 1, amino acid 253 to 327), exon 17 (hinge 2, amino acid 667 to 717), and exon 50 to 51 (hinge 3, amino acid 2424 to 2470); the hinge 4 sequence (amino acid 3041 to 3112) has not been definitively identified.⁴⁹ The mutation identified in family XLCM-1 is in exon 9, within the H1.

It appears that dystrophin performs a number of distinct cytoskeletal functions. Three related but conceptually distinct roles of dystrophin function have been suggested: (1) membrane stability (dystrophin may stabilize the membrane during repeated cycles of muscle contraction), (2) force transduction (dystrophin may link the contractile force produced in the intracellular domain to the extracellular environment), and (3) organization of membrane specializations. The biochemistry and function of the cardiac membrane and T tubules appear to be different from those of skeletal muscle. In the heart, this exon 9 mutation affecting the H1 portion of the protein is likely to result in loss of membrane integrity and eventual loss of function, probably due to the continual stress placed on the beating pump. In addition, this portion of the protein has been shown to have significant sequence similarity to

troponin I⁶¹ in the region that functionally enables binding with calcium binding proteins. It has also been speculated that dystrophin binds to calmodulin in this region,

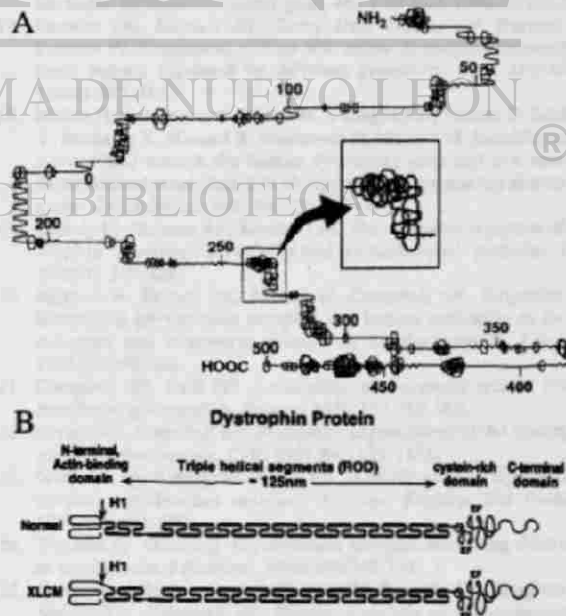


FIG 4. Plot structure prediction of mutant dystrophin protein compared with normal dystrophin. A, Normal dystrophin protein and mutant dystrophin (inset). Note structural change between amino acids 250 and 300 (arrow), thus causing a change in secondary structure. B, Idealized dystrophin protein structure. Change in structure due to T279A mutation at H1 is shown. This change is predicted to functionally destabilize the protein.

thereby modulating interaction of dystrophin with actin or other proteins associated with the cytoskeleton. It is possible that disruption of this region of dystrophin leads to the development of dilated cardiomyopathy, in part because of the inability of the mutated protein to modulate this interaction. Conversely, skeletal muscle appears to maintain normal clinical function significantly longer in XLCM patients, with the only evidence of skeletal disease being elevated serum CK-MM.

The mutation identified in family XLCM-1 reported here differs from the P_M-E1 deletion mutation reported by Muntoni et al²⁹ and the E1-II splice site mutation reported by Milasin et al.³⁷ Because two other families with XLCM (XLCM-2, XLCM-3) that were also analyzed for the P_M mutation, E1-II boundary mutation, and exon 9 mutation have normal sequences in these portions of the dystrophin gene, one can speculate that the XLCM phenotype results from multiple different dystrophin mutations that are within important functional regions of this huge protein. This possibility provides a different mechanism for the development of differential dystrophinopathic phenotypes than does the "frame-shift" hypothesis,^{62,63} which is believed to explain the phenotypic differences between the allelic diseases DMD and BMD when deletions occur in >95% of cases.

Mutations and polymorphisms in exon 9 have rarely been reported.⁶⁴⁻⁶⁶ Roberts et al⁶⁵ analyzed 70 small mutations and Prior et al⁶⁶ reviewed 29 mutations, and in no case was exon 9 mutated. Reiss and Rininsland⁶⁴ described a constitutive exon 9 cassette-splicing phenomenon found in peripheral blood lymphocyte studies. These authors found that in approximately half of the transcripts of the dystrophin gene isolated from lymphocytes, exon 9 was omitted. This exon skipping was found to occur to a variable extent in all tissues not specifically expressing dystrophin but was rarely seen in muscle, heart, or brain. When seen, omission of exon 9 did not disrupt the reading frame of the mRNA. They also suggested that when exon 9 mutations occur, BMD results (as long as the correct reading frame is maintained), consistent with the observations of Koening et al.⁶³

Once the mutations are identified in other families with XLCM (ie, XLCM-2 and XLCM-3), more insight will be gained as to the important cardiac functional regions of dystrophin. Animal models (such as transgenic mice) with these "cardiospecific mutations" could open doors to our knowledge of the function of the dystrophin protein as well as its relationship to other interrelated proteins.

Acknowledgments

This work was supported in part by the National Institutes of Health (K08-HL-02485-01 and R01-HL-53392-01) and was performed in the Phoebe Willingham Muzzy Pediatric Molecular Cardiology Laboratory. The authors wish to acknowledge the contribution of Valerie R. Price in the preparation of this manuscript.

References

1. Dec GW, Furter V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994;331:1564-1575.
2. Mancio TA, Baughman KL, Rodcheffer B, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harian WR. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop). *Am J Cardiol*. 1992;17:1438-1466.
3. Evans RW. Measuring the costs of heart transplantation. *Primary Cardiol*. 1994;20:48-54.
4. Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Cim JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodcheffer RJ, Chacabro JH, Tazelaar HD. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1992;326:77-82.
5. Keeling PJ, Gang Y, Smith G, Seo H, Bent SE, Munday V, Caloric AL, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. *Br Heart J*. 1995;73:417-421.
6. Towbin JA. Molecular genetic aspects of cardiomyopathy. *Biochem Med Metab Biol*. 1993;49:285-320.
7. Emanuel R, Withers R, O'Brien K. Dominant and recessive modes of inheritance in idiopathic cardiomyopathy. *Lancet*. 1971;2:1065-1067.
8. Berko BA, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1987;316:1186-1191.
9. Towbin JA, Hejmancik JF, Brink P, Belb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*. 1993;87:1854-1865.
10. Towbin JA. Biochemical and molecular characterization of X-linked dilated cardiomyopathy (XLCM). In: Clark EB, Markwald RR, Takao A, eds. *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. Armonk, NY: Futura Publishing Co Inc; 1993:121-132.
11. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509-517.
12. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51:919-928.
13. Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:1276-1280.
14. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*. 1989;338:509-511.
15. Nudel U, Zuk U, Eilat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*. 1989;337:76-78.
16. Klammt HI, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN. Molecular and functional analysis of the muscle specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Cell Biol*. 1990;10:193-205.
17. Gorecki DC, Monaco AP, Derry IMJ, Walker AP, Bernard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet*. 1992;1:505-510.
18. Nishio H, Takeshima Y, Narita N, Yanagawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minagi R, Nakamura H, Matsuo M. Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J Clin Invest*. 1994;94:1037-1042.
19. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53:219-228.
20. Klietsch R, Ervasti JM, Arnold W, Campbell KP, Jorgensen AO. Dystrophin-glycoprotein complex and lamina colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ Res*. 1993;72:349-360.
21. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophy and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 1989;338:259-262.
22. Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*. 1991;66:1121-1131.
23. Michalak M, Zubrzycka-Gaarn EE. Identification of dystrophin in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;169:565-570.
24. Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem*. 1990;108:748-752.
25. Ibraghimov-Beskounnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 1992;355:696-702.
26. Matsumura K, Nonaka I, Tome FM, Arahata K, Collin H, Leturcq F, Recan D, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin. *Am J Hum Genet*. 1993;53:409-416.

27. Ohlendieck K, Matsumura K, Ionescu VV, Towbin JA, Bosch EP, Weinstein SL, Sernett SW, Campbell KP. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of the dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology*. 1993;43:795-800.
28. Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:8307-8313.
29. Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu MG, Cianchetti C, Realdi G, Cao A, Melis MA. Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1993;329:921-925.
30. Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V. Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X-linked dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 1995;56:151-157.
31. Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V. A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J Clin Invest*. 1995;96:693-699.
32. Holder E, Maeda M, Bies RD. Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet*. 1996;97:232-239.
33. Vitello L, Mostacciolo ML, Oliviero S, Schiavon F, Nicoletti L, Angelini C, Danielli GA. Screening for mutations in the muscle promoter region and for exonic deletions in a series of 115 DMD and BMD patients. *J Med Genet*. 1992;29:127-130.
34. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet*. 1991;49:54-67.
35. Yoshida K, Ikeda S, Nakamura A, Kagoshima M, Takeda S, Shoji S, Yanagisawa N. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in patients with Becker muscular dystrophy presenting with dilated cardiomyopathy. *Muscles Nerve*. 1993;16:1161-1166.
36. Towbin JA, Ortiz-Lopez R. X-linked dilated cardiomyopathy is not due to a muscular promoter deletion in dystrophin in three families. *N Engl J Med*. 1994;330:369-370.
37. Milasin J, Muntoni F, Severini GM, Bartoloni L, Vatta M, Krajinovic M, Mateddu A, Angelini C, Camerini F, Falaschi A, Mesroni L, Giacca M, and HMD Study Group. A point mutation in the 5' splice site of the dystrophin gene first intron responsible for X-linked dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 1996;5:73-79.
38. Miller G, Lisco H, Stitt D. Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1971;137:1459-1465.
39. Roberts RG, Darby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet*. 1991;49:298-310.
40. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Deletion of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*. 1990;86:45-48.
41. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 1988;23:11141-11156.
42. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989;5:874-879.
43. Wang Q, Keating MT. Isolation of P1 inserts ends by direct sequencing. *Biotechniques*. 1994;17:282-284.
44. Marchuk D, Drumm H, Saulino A, Collins PS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res*. 1990;19:1154.
45. Solovyev VV, Salamov AA. Secondary structure prediction based on discriminant analysis. In: Kolchanov NA, Lim HA, eds. *Computer Analysis of Genetic Macromolecules*. World Scientific; 1994:352-364.
46. Solovyev VV, Salamov AA. Predicting α -helix and β -strand segments of globular proteins. *Comput Appl Biosci*. 1994;10:661-669.
47. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol*. 1978;120:97-120.
48. Roberts RG, Coffey A, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics*. 1993;16:536-538.
49. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*. 1990;265:4560-4566.
50. Lemaire C, Helig R, Mandel JL. Nucleotide sequence of chicken dystrophin cDNA. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:11815-11816.
51. Chang HW, Bock E, Bonilla E. Dystrophin in electric organ of *Torpedo californica* homologous to that in human muscle. *J Biol Chem*. 1989;263:20831-20834.
52. Byers TJ, Husain-Chishti A, Dubreuil RR, Branton D, Goldstein LSB. Sequence similarity of the amino-terminal domain of *Drosophila* beta spectrin to alpha actinin and dystrophin. *J Cell Biol*. 1989;109:1633-1641.
53. Bartlett RJ, Sharp NJH, Secore SL, Hung WY, Kornegay JN, Roses AD. The canine and human DYS genes are highly conserved. *J Neurol Sci*. 1990;98(suppl):165. Abstract.
54. Ryder-Cook AS, Sicinski P, Thomas K, Davies KE, Worton RG, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. Localization of the *mdx* mutation within the mouse dystrophin gene. *EMBO J*. 1988;7:3017-3021.
55. Kahana E, Marsh PJ, Henry AJ, Way M, Grazer WB. Conformation and phasing of dystrophin structural repeats. *J Mol Biol*. 1994;235:1271-1277.
56. Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*. 1993;3:283-291.
57. Hammonds RG Jr. Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell*. 1987;51:1. Letter.
58. Davidson MD, Baron MD, Critchley DR, Wootton JC. Structural analysis of homologous repeated domains in alpha-actinin and spectrin. *Int J Biol Macromol*. 1989;11:81-90.
59. Speicher DW, Marchesi VT. Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. *Nature*. 1984;311:177-180.
60. Sherratt TG, Vulliamy T, Strong PN. Evolutionary conservation of the dystrophin central rod domain. *Biochem J*. 1992;287:755-759.
61. Gurusinghe AD, Wilce MCJ, Austin L, Hearp MTW. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: sequence homology observations. *Neurochem Res*. 1991;16:681-686.
62. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science*. 1988;242:755-759.
63. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Recan D, Chelly J, Kaplan JC, Coveze AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen JD, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Van Ommen GJB, Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989;45:498-506.
64. Reiss J, Rininsland F. An explanation for the constitutive exon 9 cassette splicing of the DMD gene. *Hum Mol Genet*. 1994;3:295-298.
65. Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M. Searching for the I in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat*. 1994;4:1-11.
66. Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet*. 1995;57:22-33.
67. Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Muller CR, Muller B. On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet*. 1994;31:183-186.
68. Kilimann MW, Pizzuti A, Grompe M, Caskey CT. Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Hum Genet*. 1992;89:253-258.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Rocio Ortiz López

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

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

Campo de Estudio: Ciencias Básicas

BIOGRAFÍA:

Datos Personales: Nacida en Jalapa, Veracruz el 21 de Marzo de 1963, hija de
Andrés Ortiz (f) y Dora López de Ortiz.

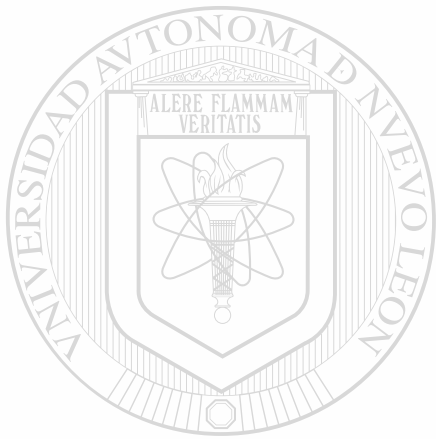
Educación:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Veracruzana,
en Jalapa, Veracruz.

Grado obtenido: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 1988.

Facultad de Medicina de la UANL. Monterrey, N.L

Grado obtenido: Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular
en ingeniería genética en 1992.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



