

2. ANÀLISI DE MICROSATÈLLITS DE ADICIONALS MARCATS AMB P³²

Donat que després d'estudiar regions no cobertes inicialment encara es van trobar zones amb certa positivitat de *lod scores* es va procedir a estudiar microsatèl·lits addicionals (*Research Genetics*) marcats amb P³² per tal de comprovar si alguna d'aquestes zones seria una bona candidata. Bàsicament es va realitzar l'anàlisi de *fine mapping* als cromosomes 7 (Taules 31 i 32) i 17 (Taula 30). Concretament, al voltant de les regions on es trobaven marcadors que donaven certa positivitat (D7S640 al cromosoma 7, amb valor màxim de Z de 0.21 a $\theta = 0$ i D17S944 al cromosoma 17, amb valor màxim de Z de 0.92 a $\theta = 0$). Com a conseqüència de l'estudi d'aquests nous marcadors es va trobar finalment una regió lligada a la malaltia amb marcadors significativament positius al cromosoma 7, a la regió 7q31-q32. A la Taula 32 podem veure tots els marcadors lligats, amb uns valors màxims de Z de 8.48 al marcador D7S1822 a $\theta = 0.01$ i de 7.85 al marcador D7S2519 a $\theta = 0$. Considerant tots els marcadors positius podríem delimitar la regió candidata entre els marcadors D7S487 i D7S640, abastant una distància aproximada d'unes 10 megabases (entre les posicions 125715 i 135684 del mapa físic *Map View* de l' *NCBI*). Com veurem en l'anàlisi dels haplotips sobre el pedigrí, i tenint en compte les recombinacions trobades, podem reduir dita regió a unes 3,7 megabases. S'ha inclòs en la taula la posició del gen de la Filamina C (posició 131100 del mapa físic), que es situaria en mig de la regió lligada i que, per tant, suposaria un bon gen candidat, donada la seva expressió en múscul esquelètic i la seva funció com a proteïna d'unió a l'actina. En aquesta part de l'anàlisi es van incloure fins a 55 pacients en l'anàlisi d'alguns marcadors. A més dels 15 pacients esmentats en l'apartat 1 es van incloure els següents (veure, a més, la figura 5):

<u>Nº mostra-Posició al pedigrí:</u>	28	III-1 (afecte)
	17	III-2 (afecta)
	46	III-3 (sana)
	34	III-8 (afecte)
	47	III-12 (afecta)
	40	III-14 (afecta)
	42	III-15 (sana)
	41	III-16 (sa)
	43	III-17 (sa)
	44	III-18 (afecte)
	39	III-19 (afecte)
	29	IV-1 (afecta)
	18	IV-4 (afecta)
	45	IV-8 (sa)
	33	IV-12 (afecte)
	11	IV-20 (afecte)
	12	IV-21 (afecte)
	4	IV-23 (afecte)
	35	IV-25 (sa)
	38	IV-30 (afecte)
	37	IV-31 (afecte)
	5	IV-32 (sana)
	6	IV-33 (sana)
	7	IV-34 (sa)
	20	V-6 (afecta)
	21	V-7 (sa)
	22	V-8 (sana)
	23	V-10 (sana)
	26	V-13 (sana)
	27	V-14 (sana)
	3	V-15 (sana)
	36	V-20 (sa)
	48	Conj. de III-11 (sa)
	80	Conj. de IV-18 (sana)
	81	Conj. de IV-21 (sana)
	83	Conj. de IV-22 (sana)
	84	Conj. de IV-20 (sana)
	85	Conj. de III-2 (sa)
	86	Conj. de III-1 (sana)
	87	Conj. de IV-1 (sa)

2.1 Taula n° 30 : Resultats Cromosoma 17

Es mostren els resultats dels marcadors ja assajats amb fluorescència juntament amb 4 nous marcadors radiactius però tots ells referits a l'anàlisi en 32 membres del pedigrí (els individus amb n° de mostra de l'1 al 32). Els nous marcadors assajats són D17S1824, D17S927, D17S1851 i D17S250. Cal remarcar que el resultat va ser negatiu pel marcador D17S944, el qual donava, amb 15 individus analitzats, un valor de *lod score* de 0.92 a freqüència de recombinació 0.0, per la qual cosa no es van assajar nous marcadors propers a aquest.

Marcador	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D17S849	-9.11	-4.58	-2.05	-1.05	-0.26	0.01	0.06
D17S831	-8.28	-1.22	0.09	0.53	0.66	0.46	0.19
D17S938	-6.83	-1.54	-0.24	0.19	0.38	0.29	0.12
D17S1852	-9.18	-1.03	0.12	0.41	0.42	0.25	0.10
D17S799	-7.27	-1.44	-0.11	0.36	0.56	0.44	0.23
D17S921	-5.37	-1.87	-0.58	-0.12	0.15	0.14	0.07
D17S1857	-4.45	-1.25	-0.54	-0.27	-0.10	-0.05	-0.03
D17S1824	-13.80	-4.04	-0.87	0.21	0.83	0.76	0.43
D17S798	-3.23	-1.01	0.78	1.30	1.36	0.98	0.45
D17S927	-6.28	-0.06	1.13	1.41	1.24	0.74	0.22
D17S1851	-9.47	-1.62	-0.45	-0.12	-0.03	-0.06	-0.05
D17S250	-3.83	0.69	1.11	1.08	0.76	0.40	0.13
D17S1868	-9.50	-1.23	0.71	1.31	1.44	1.06	0.45
D17S787	-3.98	-2.39	-0.91	-0.29	0.15	0.22	0.13
D17S944	-5.86	-0.86	-0.28	-0.14	-0.16	-0.23	-0.17
D17S949	-9.76	-5.08	-2.33	-1.26	-0.42	-0.11	-0.00
D17S785	-4.69	-1.40	-0.67	-0.38	-0.14	-0.06	-0.02
D17S784	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D17S928	-4.73	-1.68	-0.63	-0.12	0.22	0.21	0.08

2.2 Resultats Cromosoma 7

2.2.1 Taules *Lod Scores* i mapa de la regió candidata

A) Taula 31: Marcadors addicionals

Marcador	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	
D7S2501	4.36	4.34	4.22	3.94	3.15	2.13	0.97	
D7S1529	-1.75	5.01	5.88	5.75	4.71	3.20	1.41	
ATA103DO2	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	(*)
D7S2531	-0.95	4.98	5.36	5.17	4.23	2.91	1.36	
D7S2560	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	(*)

B) Taula 32: Regió candidata final

Ordre	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	P.M.F.
D7S515	-3.73	-0.57	0.03	0.21	0.24	0.16	0.07	102855
D7S486	-3.44	0.80	1.22	1.19	0.83	0.42	0.12	118127
D7S487	4.77	4.71	4.42	3.99	2.97	1.83	0.68	125715
D7S2527	-2.19	2.61	3.56	3.58	2.93	1.93	0.79	127066
D72203	1.80	1.80	1.79	1.72	1.42	0.97	0.47	127621
D7S686	4.28	4.20	3.95	3.67	2.95	1.99	0.89	128085
D7S1822	2.17	8.48	8.44	7.78	6.05	4.03	1.84	128644
D7S680	5.49	5.42	5.11	4.68	3.67	2.49	1.17	129035
D7S514	4.64	4.58	4.33	3.95	3.02	1.93	0.80	129385
D7S635	5.10	5.05	4.80	4.40	3.44	2.31	1.04	129630
D7S504	3.45	3.39	3.16	2.83	2.10	1.29	0.49	129972
D7S1875	4.48	4.41	4.09	3.67	2.72	1.66	0.64	130107
FLN C								131300
D7S530	4.15	4.14	3.98	3.64	2.78	1.79	0.75	132005
D7S2544	7.56	7.43	6.89	6.17	4.62	2.92	1.12	132710
D7S2519	7.85	7.73	7.24	6.57	5.04	3.30	1.41	132766
D7S3054	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	-infini	(*) 133596
D7S512	-0.28	0.03	0.47	0.64	0.61	0.38	0.10	134856
D7S640	3.37	3.36	3.26	3.05	2.44	1.64	0.72	135684
D7S684	-10.25	-2.29	-0.95	-0.43	-0.06	0.03	0.03	141712
D7S661	-9.77	-2.62	-1.34	-0.86	-0.43	-0.21	-0.08	147699

(*) Resultat no mendelitzant. Algun dels al·lels detectats no s'ajusta a les possibles segregacions, possiblement per errors de la PCR.

P.M.F.: Posició, en Megabases (Mb), del marcador en el mapa físic del cromosoma 7 (*build 26 Map View* NCBI-Novembre 2001). A la figura 6 es mostra el mapa físic de la regió 7q31-q32 entre les posicions de 125 i 135 megabases, part que estaria implicada en la malaltia en base a la positivitat dels valors de *lod scores* obtinguts, indicant-se en la primera columna diferents marcadors i seqüències descrites, a continuació els clons i *contigs* solapats que defineixen l'ordre de la seqüència cromosòmica i més a la dreta els gens coneguts i descrits en la regió, destacant el gen de la Filamina C, proteïna que lliga actina, en posició 131300.

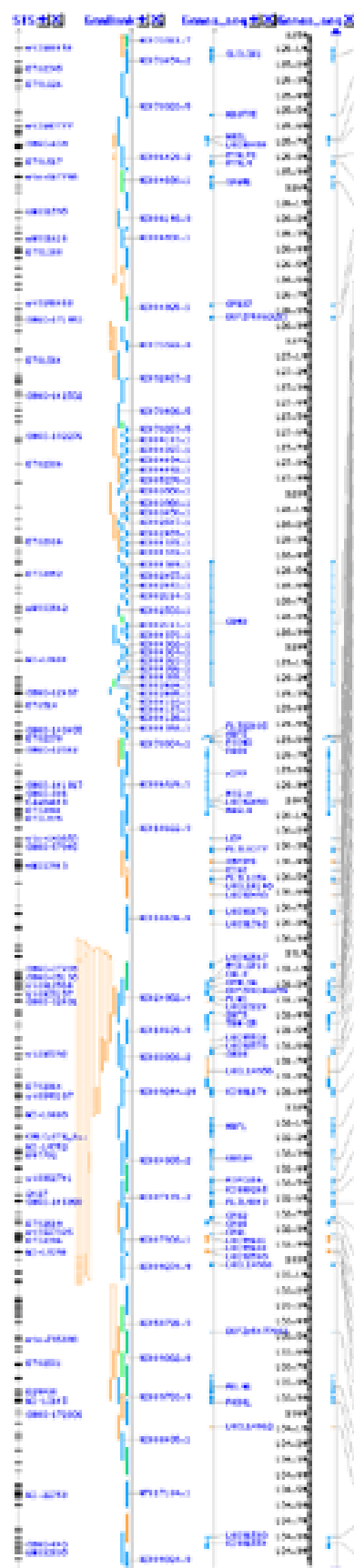


Figura 6: Versió *Build 26* del cromosoma 7 del *Map View* de l'*NCBI* (Novembre 2001).

2.2.2 Gel marcador D7S635

A la figura 7 es mostra, com a exemple, la imatge del gel corresponent al marcador D7S635, inclòs en la regió candidata final. S'indiquen els números d'ordre dels individus estudiats del pedigrí. La resta dels marcadors assajats presentaven imatges similars.

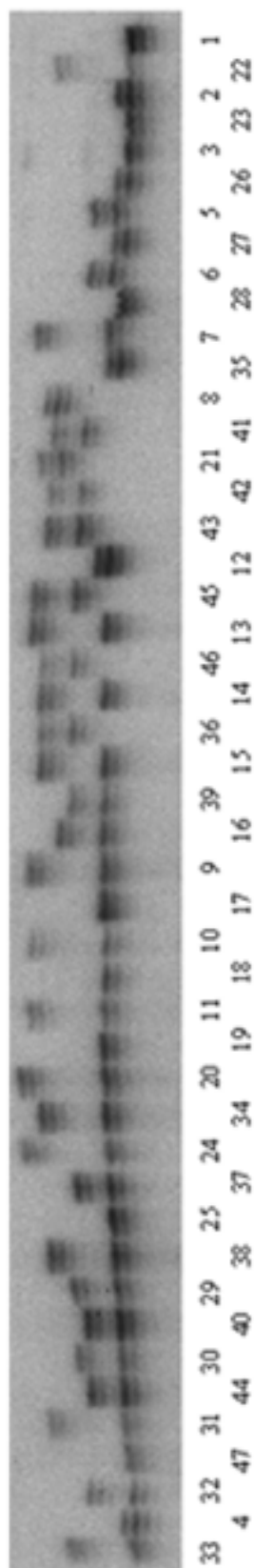


Figura 7: Imatge corresponent al resultat del microsatèl·lit D7S635 utilitzant marcatge radiactiu.

2.2.3 Anàlisi d'haplotips i delimitació de la regió candidata

A les figures 8 a 10 es mostren les 3 parts del pedigrí amb els haplotips corresponents als 20 marcadors de la regió 7q31-q32 del cromosoma 7 que inclouen la regió lligada a la malaltia i marcadors addicionals negatius, tots ells ordenats segons el mapa físic i que consten en la Taula 32. Es mostren recombinacions als individus n°s 1 (IV-5), 4 (IV-23), 21 (V-7) i 36 (IV-20). Es pot observar un haplotip comú en tots els individus afectes entre el marcador D7S487 i D7S640 (números en color verd) amb variacions segons les recombinacions, corresponent els números en color vermell a la regió candidata final i el blau a regions on no és possible saber el punt exacte de la recombinació. La pacient n° 30 (IV-3), que consta al pedigrí gran (Figura 5) com a afecta i al reduït (Figura 1) com a sana, no presenta els al·lels comuns als individus afectes i d'acord amb examens clínics posteriors s'ha considerat finalment com a sana. La pacient n° 23 (V-10), considerada sana, presenta l'haplotip comú dels 16 marcadors dels afectes, podent-se considerar afecta, no manifestant el fenotip probablement per la seva joventut (11 anys). Segons la recombinació de l'individu n° 1, aquest portaria el cromosoma sa des del marcador D7S487 centromèric fins com a mínim el marcador telomèric D7S514 o fins al marcador més telomèric D7S2544. La presència d'un haplotip homozigot entre els marcadors D7S635 i D7S2544 en la mare afecta de la dona 1 impedeix conèixer de quin dels 2 cromosomes parentals procedeixen els haplotips d'aquests marcadors en la filla. Segons la recombinació de l'individu n° 4, aquest portaria el cromosoma afecte entre el marcador telomèric D7S640 i el centromèric D7S2544 o fins al més centromèric D7S680, no podent-se confirmar amb exactitud, donat que els haplotips entre els marcadors D7S680 i D7S530 són comuns entre el cromosoma portador de la malaltia i el cromosoma sa dels germans n° 2 (IV-22) i n° 35 (IV-25). La recombinació de l'individu sa n° 21, incloent-hi l'haplotip del cromosoma afecte entre els marcadors D7S487 i D7S2203 exclouria aquesta franja de la malaltia. De forma similar, la recombinació en l'individu 36 (inicialment considerat sa), que inclou l'haplotip del cromosoma afecte entre al menys el marcador centromèric D7S2544 i el telomèric D7S640 exclouria aquesta franja de la malaltia, sempre i quan sigui realment un individu sa. Si fos un individu afecte, per contra, reduiria la malaltia a aquesta franja. Donada la curta edat del pacient 36 (8 anys) podria encara desenvolupar la malaltia i passar a ser un individu afecte. A l'hora de calcular els *lod scores* s'ha considerat l'estat dels individus n°s 23, 30 i 36 com a desconeguts.

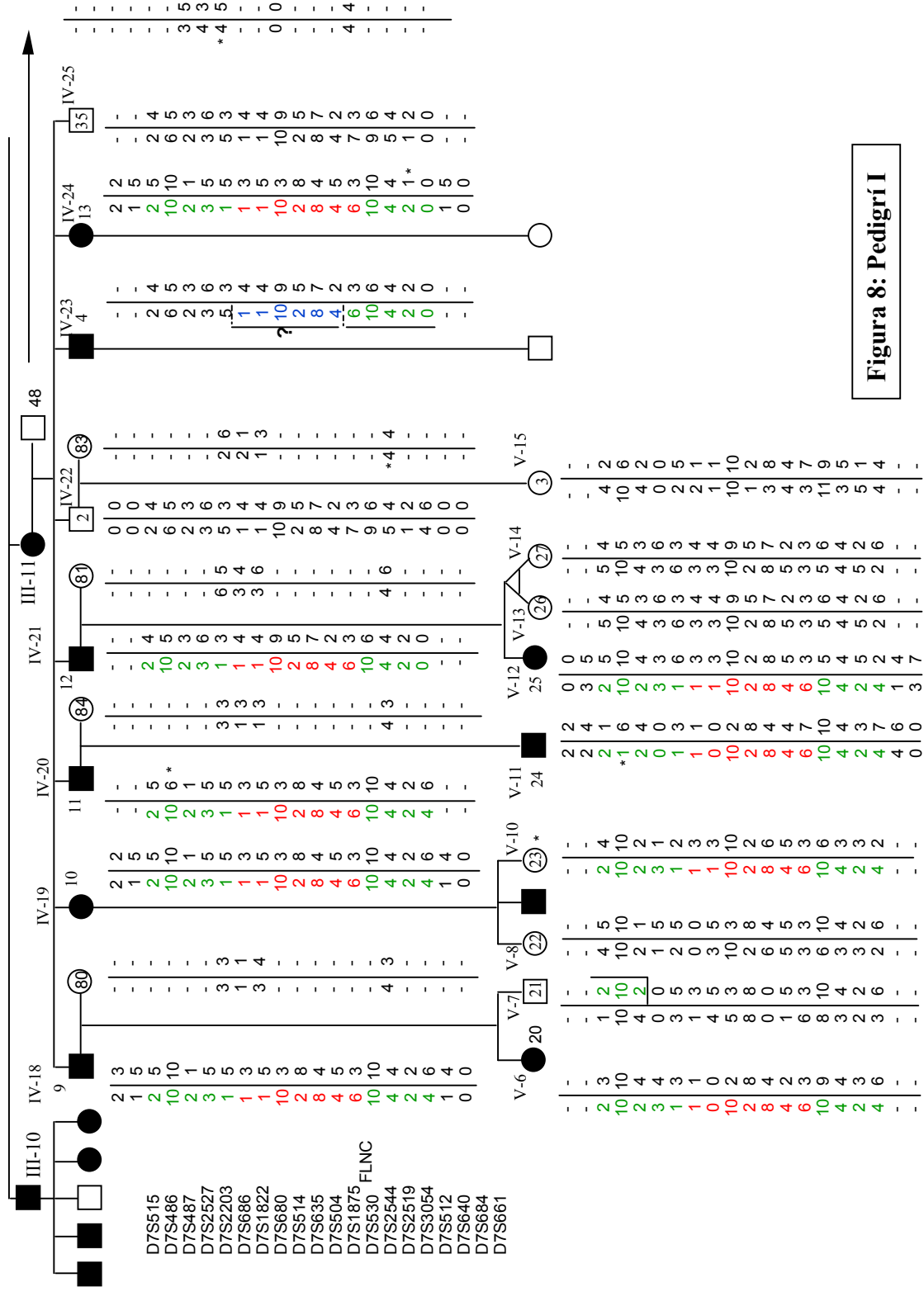
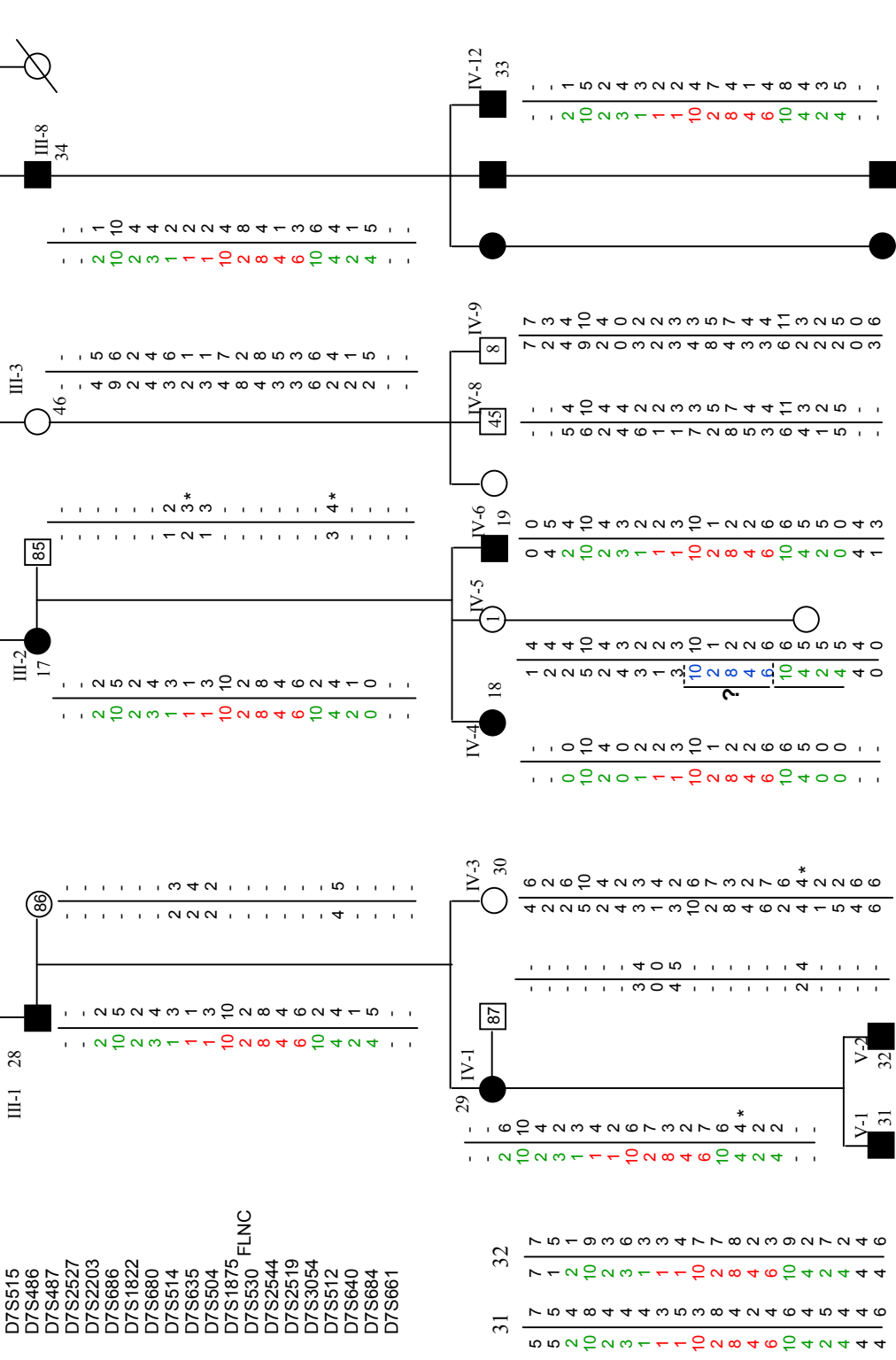


Figura 8: Pedigrí I

Figura 10: Pedigrí III



Com ja hem dit, enmig de la regió candidata final trobem el gen de la Filamina C, el qual suposa un bon gen candidat com a implicat en la malaltia que afecta a la família estudiada, tenint en compte que és un gen que lliga actina, la qual cosa el relaciona directament amb la funció muscular. És per això que vam procedir a seqüenciar el gen, a estudiar regions susceptibles d'expansió i la seva expressió.

3. ANÀLISI MUTACIONAL DEL GEN DE LA FILAMINA C I ALTRES GENS CANDIDATS

Un cop amplificats els 48 exons i el promotor del gen de la Filamina C no es va trobar cap mutació patogènica en la seqüència nucleotídica. Es va trobar un polimorfisme (canvi d'una guanina per una adenina en la posició 18951 de la cadena nucleotídica dins l'exó 27, després d'amplificar el fragment 16 amb els encebadors 16F i 16R) que donaria lloc al canvi d'una arginina per una glutamina pero es va descartar com a mutació donada la seva presència en individus sans i també la seva presència en homozigosi en individus afectes, fet que no seria molt esperable en una entitat autosòmica dominant. A més, tot i no haver-se descrit en aquesta tesi, es va iniciar i s'està realitzant actualment el cribratge d'una sèrie de gens candidats addicionals descrits i altres deduïts per homologia amb gens coneguts presents en la regió lligada del cromosoma 7. Els gens objecte d'estudi es van escollir per haver-se descrit en ells ESTs a múscul, o en el cas de la Fascina 3, tot i que la seqüència hagi estat descrita a testicle, es va considerar un bon candidat donada la seva interacció amb l'actina. Cal remarcar que si bé en certs gens descrits en la regió no s'han pogut trobar ESTs de múscul, això no vol dir que no puguin existir, podent estar pendents de ser trobats o descrits:

<u>Gen</u>	<u>P.M.F. (Mb)</u>
-ARF5 (<i>ADP ribosylation factor</i>)	129590
-FSCN3 (<i>Testis Fascin-actin bundling protein paralog</i>)	129600
-Calumenina (<i>Calcium binding protein</i>)	131200
-LOC63220 (similar a la subunitat de 14 Kda de l'ATPsa vacuolar)	131300
-TRN-SR (Transportina-SR)	131400
-UBE2H (<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2H</i>)	132300
-HSPC216 (<i>Homo Sapiens Hypothetical protein</i>)	132500
-KIAA0265 (<i>Kelch-like protein</i>)	132550

P.M.F.: Posició del marcador en el mapa físic del cromosoma 7 (*build 26 Map View NCBI-Novembre 2001*).