

DISCUSSIÓ

En aquesta tesi s'ha estudiat, des d'un punt de vista genètic, una nova forma de distròfia muscular de maluc autosòmica dominant (LGMD) caracteritzada bàsicament per una debilitat de la musculatura proximal en una gran família d'origen espanyol. Un cop pre-establerts els trets clínics característics de la malaltia i el tipus d'herència i definit el pedigrí de la família, s'ha procedit a la confirmació de que realment ens trobàvem davant una nova entitat, utilitzant les tècniques d'anàlisi de lligament, tot excloent les formes autosòmiques dominants prèviament definides. Seguidament s'ha cercat el *locus* de la malaltia, això és, el cromosoma i la regió cromosòmica específica on es trobaria el gen implicat i responsable de la malaltia. Després d'acotar al màxim aquesta regió (7q31-q32), en un interval genètic duns 3,79 cM (que correspon a una distància física d'unes 3,7 Mb) s'han revisat regularment les bases de dades i mapes genètics disponibles i s'ha fet una recerca de gens candidats ubicats en aquest interval, bé per la seva funció i/o expressió específica a múscul. Escollint com a millor candidat la Filamina C, una proteïna que lliga actina, es va estudiar la seva seqüència i els seus nivells d'expressió, no trobant-se cap anormalitat i per tant, descartant-se com a gen implicat en la malaltia. Amb posterioritat s'ha iniciat l'estudi d'altres possibles gens candidats en la regió, treball que continua actualment.

1. PEDIGRÍ OBJECTE D'ESTUDI

La família estudiada comprenia 105 individus de 5 generacions (veure Figura 5 de l'apartat de Resultats), dels quals 61 havien estat examinats clínicament i 55 van formar part de l'anàlisi genètica, 27 d'ells afectes. L'herència és de caràcter autosòmic dominant amb una penetrància del 90 % i amb una freqüència estimada del gen responsable de la malaltia de 1/100.000. Es va observar una debilitat muscular característica que implicava predominantment els músculs proximals de la pelvis i les espatlles. L'edat d'inici de la malaltia va oscil·lar entre el primer any de vida i els 58 anys. Es van poder establir 2 grups en funció de l'edat d'inici de la malaltia:

- una forma juvenil, amb inici de la malaltia abans dels 15 anys d'edat
- una forma adulta, amb inici de la malaltia al voltant de la tercera o quarta dècada de vida.

Es va observar un fenomen d'anticipació significatiu no relacionat amb el gènere, apareixent la malaltia a edats més primerenques en les darreres generacions (Gàmez 2001).

2. EXCLUSIÓ DE LES 5 FORMES LGMD AUTOSÒMIQUES DOMINANTS PRÈVIAMENT DESCRITES

Abans d'abordar la recerca del *locus* específic de la malaltia es va procedir a excloure els 5 *locus* implicats en les 5 formes LGMD autosòmiques dominants descrites en la literatura fins el moment (LGMD 1A, 1B, 1C, 1D i 1E). La forma 1A (Speer 1992 i 1998a, Yamaoka 1994, Bartoloni 1998) s'ubica a la regió 5q31. La forma 1B (Speer 1995, Van der Kooi 1996 i 1997) s'ubica a la regió 1q11-21. La forma 1C (Minetti 1998, McNally 1998b) s'ubica a la regió 3p25. La forma 1D (Messina 1997) s'ubica a la regió 6q23. La forma 1E (Speer 1999) s'ubica al braç llarg del cromosoma 7 (7q). Tot comprovant els marcadors polimòrfics assajats en el mapatge de cadascuna d'aquestes formes i els intervals abastats per ells, vam escollir una sèrie de marcadors a cada regió que fossin suficients per fer una anàlisi de lligament a 3 punts (2 marcadors i la malaltia) i que ens permetessin excloure dites formes com a responsables de la malaltia que afectava la família. L'anàlisi es va efectuar sobre 15 membres del pedigrí (veure Figura 1 de Resultats). Així, per analitzar la regió 5q31 es van estudiar els marcadors D5S410, D5S436, D5S2115 i D5S471, abastant uns 30 cM. Per la regió 1q11-21 es van estudiar els marcadors D1S218, D1S196, D1S2878, D1S484, D1S2635 (afegit en un segon càlcul), D1S498, D1S252 i D1S2726, abastant uns 45 cM. Per la regió 3p25 es van estudiar els marcadors D3S1277, D3S1266, D3S2338, D3S1263 i D3S1304, abastant uns 44 cM. Per la regió 6q23 es van estudiar els marcadors D6S308, D6S292, D6S262 i D6S287, abastant uns 25cM. Per la regió 7q es van estudiar els marcadors D7S2465, D7S798, D7S636 i D7S661, abastant uns 24 cM.

Un cop calculats, els valors obtinguts dels *lod scores* tenint en compte 2 marcadors i la malaltia són prou negatius (al voltant de -2 o menys) com per excloure les 5 regions candidates (Taules 1 a 5 de Resultats). En 4 dels casos (cromosomes 3, 5, 6 i 7) els marcadors van ser comuns als assajats posteriorment en el *wide genome mapping*, mentre que en el cas del cromosoma 1, va ser necessari afegir un marcador més entre D1S484 i D1S498, el D7S2635, donat que el càlcul inicial no va proporcionar una negativitat suficient entre aquests 2 marcadors. Finalment, incloent aquest marcador adicional es va poder excloure la regió 1q11-1q21.

3. DESCRIPCIÓ DE LA REGIÓ CANDIDATA FINAL AL CROMOSOMA 7

Un cop ben establert que la distròfia muscular davant la que ens trobàvem era una nova entitat no descrita abans i no mapada en cap de les regions conegudes, ens vam disposar a estudiar tota una bateria de marcadors microsatèl·lits polimòrfics disponibles comercialment, analitzats automàticament i interpretats tant per l'ajuda de suport informàtic com per lectura manual, per tal de trobar el *locus* de la malaltia, prenent com a base 15 individus del pedigrí inicial (els mateixos que es van incloure en l'estudi de les 5 formes conegudes). Després de l'anàlisi inicial de 27 panells de marcadors que incloïen 400 marcadors dispersos pels 22 cromosomes autosòmics asseparats per una distància mitjana de 10 cM i de calcular els *lod scores* per cadascun d'ells no es va trobar cap valor significativament positiu (3 o més). A les taules 6 a 27 de l'apartat de resultats es mostren els resultats de l'anàlisi de lligament paramètric a 2 punts amb els valors de *lod score* (Z) a freqüències de recombinació (θ) de 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 i 0.4. Un cop excloses la majoria de les regions cromosòmiques es van seleccionar una sèrie de regions on els marcadors assajats no eren informatius (per la presència d'al·lels comuns, no essent l'heterezigositat gaire elevada i per tant, poc útil el marcador), altres on les distàncies entre marcadors eren massa grans per excloure el lligament i altres on es van obtenir valors de *lod scores* positius que, tot i no ser significatius de lligament sí podien ser indicatius de proximitat a una regió lligada a la malaltia. En totes aquestes regions seleccionades es van assajar marcadors addicionals fluorescents. A les taules 28 i 29 de l'apartat de Resultats es mostren els valors de *lod score* d'aquests marcadors addicionals. Després de disposar de totes aquestes dades encara disposàvem de 2 regions cromosòmiques amb valors de *lod scores* positius susceptibles de ser estudiades amb més precisió utilitzant marcadors addicionals contigus als que van donar aquests valors positius. Aquestes regions es trobaven als cromosomes 7 (al voltant del marcador D7S640) i 17 (al voltant del marcador D17S944). Així, per tal d'esbrinar quina seria la regió candidata final i excloure definitivament altra es va procedir a analitzar nous marcadors addicionals ara amb marcatge radiactiu (P^{32}) i incloent en l'anàlisi el màxim nombre possible d'individus (entre 32 i 55 individus, inclosos 8 cònjuges sans en darrer terme), per tal de poder obtenir valors de *lod score* més elevats (veure Taules 30 a 32 de l'apartat de Resultats). A més de seleccionar els marcadors addicionals per la seva localització teòrica al voltant dels marcadors ja analitzats amb valors de *lod score* positiu, el criteri a seguir per escollir-los va ser que

tinguessin un màxim valor d'heterozigositat possible per tal de poder tenir resultats informatius i no al·lels comuns. A més, es van escollir tot tractant d'establir un consens de localització el més exacte possible tot examinant els mapes de l'*NCBI* (dins de *Map View*) i de *Marshfield*. Donat que dels 21 marcadors inicials assajats al cromosoma 7 vam obtenir un valor positiu amb el marcador D7S640 (veure Taula 12 de l'apartat de Resultats), amb posició 135684 Mb al mapa físic, es va assajar de nou aquest marcador amb el màxim nombre d'individus possible, essent important remarcar que gràcies a l'incorporació de nous individus en l'anàlisi el valor de *lod score* s'incrementa de 0.21 (Taula 12 de l'apartat de Resultats) a 3.37 (Taula 32, de resultats finals) a fracció de recombinació 0.0. Igualment, el marcador D7S530, que en l'anàlisi inicial donava un màxim valor de *lod score* de - 0.17 a fracció de recombinació 0.0, al ser assajat amb el gruix de tots els individus va donar un valor màxim de 4.15 a fracció de recombinació 0.0. A la taula 31 figuren alguns marcadors addicionals no inclosos finalment a la regió candidata final, bé per no ser informatius o per la seva localització inexacta. També es van assajar amb el màxim nombre possible d'individus 14 nous marcadors polimòrfics propers a D7S640 que figuren en la Taula 32 amb els resultats obtinguts i la seva posició en el mapa físic. Pel contrari, tal com s'indica a la Taula 30 de l'apartat de Resultats, després d'assajar els marcadors inicials fluorescents i 4 marcadors addicionals amb radiactivitat però incloent 32 individus del pedigrí, el valor positiu del marcador D17S944 es va negativitzar (de valor de *lod score* 0.92 a valor -5.86 a fracció de recombinació 0.0). Per tant, tenint en compte això i que la regió veritablement candidata semblava trobar-se al cromosoma 7, vam descartar analitzar nous marcadors al cromosoma 17.

Taula 1: 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	-infi(*)	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 del marcador en el mapa físic del cromosoma 7 (*build 26 Map View* NCBI-Novembre 2001).

Observant els resultats veiem que amb els nous marcadors obtenim valors de *lod score* significativament positius entre els marcadors D7S487 i D7S640, amb un valor màxim de 7.85 pel marcador D7S2519 a freqüència de recombinació 0.0. Aquesta franja ens suposa una regió d'unes 10 megabases, entre les posicions 125715 i 135684 del mapa físic, en el braç llarg del cromosoma 7 (7q31-q32). Com veurem, aquesta regió es pot reduir considerablement tot estudiant les recombinacions. Els 4 marcadors dels extrems (D7S515 i D7S486 centromèrics i D7S684 i D7S661 telomèrics) amb valor de *lod score* negatiu, són els més propers a la franja de 10 megabases assajats en el cribratge inicial i que ens serveixen com a límits d'exclusió. La principal conclusió que es pot extraure és que s'ha pogut acotar un interval que suposa el *locus* de la malaltia, que es confirmaria com a una nova entitat que anomenaríem LGMD 1F. Un cop establerta aquesta regió es va fer una recerca de gens descrits en l'esmentat interval que serien bons candidats a ser els implicats en la distròfia muscular. Així, el millor candidat trobat és la Filamina C, una proteïna d'unió a actina (Maestrini 1993, Xie 1998,

Gariboldi 1994, Van der Ven 2000a i b, Thompson 2000, Chakarova 2000), mapat a 7q32-35. En la Taula 1 figura la Filamina C en la posició 131300.

Tant pels trets clínics com per l'anàlisi de lligament a 3 punts, es pot excloure la forma 1E (mapada també al braç llarg del cromosoma 7) dins el nostre pedigrí.

En les figures 8, 9 i 10 de l'apartat de Resultats es pot observar la disposició dels haplotips dels 20 marcadors que figuren a la Taula 1 en 3 branques del pedigrí. Les posicions marcades amb un asterisc (*) indiquen al·lels que no concordarien amb la mendelització esperada, probablement per errors de la polimerasa en la reacció d'amplificació o mutacions espontànies. Com a tret general, tots els individus afectes (identificats per la coloració en negre) no recombinants presenten un cromosoma comú entre els marcadors D7S487 i D7S640, que seria el cromosoma portador de la malaltia, apareixent els valors dels al·lels amb color verd als extrems i en vermell els 7 marcadors que constitueixen la regió candidata final:

D7S487	2
D7S2527	10
D7S2203	2
D7S686	3
D7S1822	1
D7S680	1
D7S514	1
D7S635	10
D7S504	2
D7S1875	8
D7S530	4
D7S2544	6
D7S2519	10
D7S3054	4
D7S512	2
D7S640	4

S'ha de destacar la presència de 4 individus recombinants que poden ajudar a acotar encara més la regió candidata definitiva. En tots 4 individus es marquen els punts mínims de recombinació i apareixen en color blau els al·lels corresponents als marcadors que poden formar part de la recombinació però que la segregació no ha pogut confirmar per presentar-se haplotips comuns [individus 1 (IV-5) i 4 (IV-23)] o bé per absència de resultat d'un marcador [individu 36 (V-20)]. En primer lloc, l'individu nº 1,

una dona sana, presenta una recombinació que implica heredar part del cromosoma no portador de la malaltia procedent de la seva mare afecta [individu 17 (III-2)] entre el marcador D7S487 (centromèric) i com a mínim el marcador D7S514 i com a màxim el marcador D7S2544 (telomèrics). Per tant, l'individu 1 heredaria la part del cromosoma portador de la malaltia entre el marcador telomèric D7S640 i com a mínim el marcador D7S2519 i com a màxim el marcador D7S635 (centromèric). És impossible precisar la posició exacta de la recombinació donat que la mare (individu 17) presenta un genotip homozigot entre els marcadors D7S635 i D7S2544. Tot plegat sí podem assegurar que la recombinació exclou, com a mínim, com a candidata a la regió cromosòmica entre el marcador D7S2519 i el telòmer, comú en tots els individus afectes. En segon lloc, l'individu nº 4, un home afecte, presenta una recombinació que implica ser portador de part d'un cromosoma present en individus sans [els seus germans nºs 2 (IV-22) i 35 (IV-25)] entre els marcadors D7S487 (centromèric) i com a mínim el marcador D7S1822 i com a màxim el marcador D7S530 (telomèric). Així, l'individu nº 4 seria portador de part del cromosoma comú als individus afectes entre el marcador telomèric D7S640 i com a mínim el marcador D7S2544 i com a màxim el marcador D7S680 (centromèrics). En conclusió, dita recombinació en l'individu nº 4 exclou, com a mínim, com a candidata a la regió cromosòmica entre el marcador centromèric D7S487 i el marcador telomèric D7S1822. Per la seva part, l'individu nº 21 (V-7) (sa) presenta una petita recombinació que implica heredar part del cromosoma portador de la malaltia del seu pare afecte [individu nº 9 (IV-18)] entre el marcador centromèric D7S487 i el marcador telomèric D7S2203. Aquest individu hereda, doncs, el cromosoma no relacionat amb la malaltia del seu pare entre el marcador centromèric D7S686 i el marcador telomèric D7S640. Així, doncs, aquesta recombinació exclou com a candidata a la franja entre els marcadors D7S487 i D7S2203. Finalment, l'individu nº 36 (sa), presenta una recombinació que implica heredar part del cromosoma no implicat en la malaltia de la seva mare afecta [individu nº 14 (IV-27)] entre el marcador centromèric D7S487 i el marcador telomèric D7S1875 (com a mínim, i com a màxim el marcador D7S530, donat que no es va poder obtenir el genotip d'aquest darrer marcador). Aquest individu recombinant hereda, doncs, part del cromosoma portador de la malaltia de la seva mare entre el marcador centromèric D7S2544 (com a mínim i D7S530 com a màxim) i el marcador telomèric D7S640. Es podria concloure que la recombinació present en aquest individu exclouria com a candidata a la regió entre el marcador centromèric D7S2544 i el marcador telomèric D7S640. No obstant, és arriscat fer aquesta exclusió donat la

joventut d'aquest individu (8 anys), podent-se manifestar encara la malaltia en anys subsegüents. L'individu nº 23 (V-10), marcat amb un asterisc i considerat a partir de l'exàmen clínic com una dona sana, presenta tot l'haplotip comú als individus afectes, amb la qual cosa és molt probable que arribi a desenvolupar la malaltia en un futur, no havent-se manifestat ara per la seva joventut (11 anys). En el càlcul del *lod score* s'ha considerat aquests 2 individus (23 i 36) amb estat d'afectació desconegut. De forma similar, l'individu nº 30 (IV-3), considerat inicialment com a afecte, no presenta cap dels al·lels comuns als cromosomes afectes i es va considerar finalment com a sana, si bé a l'hora de calcular els *lod scores* es va considerar el seu estat com a desconegut. Agafant conjuntament les dades que ens proporcionen els 3 primers recombinants descrits podem establir que la regió candidata a la malaltia es trobaria entre els marcadors D7S680 (centromèric) i D7S2544 (telomèric), entre les posicions 129035 i 132710 (de color vermell als haplotips-pedigrís de les figures 8 a 10). Això suposaria una franja d'unes 3,7 megabases. Si ens fixem en els valors dels *lod scores* de la Taula 1, veiem valors significativament positius tant per sobre com per sota de la regió candidata final. En el cas dels marcadors D7S487, D7S686 i D7S640, l'haplotip homozigot de la mare afecta de l'individu nº 4 fa impossible precisar quin dels cromosomes va heredar aquest individu de la seva mare, donant lloc a valors de *lod score* àltament positius tot i ser fora de la regió candidata final. En el cas del marcador D7S1822, en el límit de la recombinació, tenim un valor de *lod score* de 2.17 a $\theta = 0$ (marcador i malaltia al mateix *locus*) i molt més elevat (8.48) a $\theta = 0.01$ (quan teòricament ja hi hauria 1 cM de distància entre marcador i malaltia). La proximitat de la regió lligada i la presència d'un al·lel poc freqüent en els individus afectes fan que s'obtinguin aquests valors tant alts per aquest marcador. L'elevat valor de *lod score* obtingut a $\theta = 0.0$ amb el marcador D7S2519 podria explicar-se per la taxa de penetrància incompleta assumida (90 %). Quan molts individus comparteixen el mateix haplotip, un individu recombinant solament pot no modificar gaire el valor global del *lod score*. A més, una recombinació en un individu sa no modificarà el valor de *lod score* com ho faria en un individu afecte. Cal remarcar, a més, que el valor de cada marcador es calcula de forma independent (cada cop malaltia-marcador). És per tot això que la delimitació final de la regió candidata s'obté a partir de l'estudi de les recombinacions i no pels valors absoluts finals dels *lod scores* dels marcadors. Els marcadors dels extrems (D7S515 i D7S486 centromèrics i D7S684 i D7S661

telomèrics), els valors de *lod score* dels quals eren ja negatius en el cribratge inicial, figuren com els més propers estudiats a la regió candidata, no estant lligats, si bé a la les figures dels haplotips no es pot seguir la co-segregació donat el reduït nombre de pacients en que es van assajar.

A la figura 6 de l'apartat de resultats es mostra el mapa físic de la regió 7q31-q32 entre les posicions de 125 i 135 megabases, segons la darrera versió del *Map View* de l'NCBI (*build* 26 de Novembre de 2001). Com hem dit, aquesta part 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, entre els quals figura la Filamina C, la fascina i la calumenina, tots 3 amb implicació en la funció muscular. Com ja hem explicat, de l'anàlisi dels recombinants trobats es despren que es pot acotar millor, dintre de la regió de 10 Mb, la posició física de la regió candidata final entre 129035 i 132710 Mb (distància de 3,7 Mb).

4. ANÀLISI MUTACIONAL DE GENS CANDIDATS

Un cop seleccionada la Filamina C com el gen candidat ideal es va procedir a seqüenciar la seva regió codificant, tant a partir d' ADN genòmic com de cADN en 2 individus afectes i 1 individu control per tal de buscar una mutació que pogués esdevenir la responsable de la malaltia en la família. Després d'amplificar per PCR i seqüenciar els 48 exons, el promotor i la regió 3' UTR 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), que donaria lloc al canvi d'una arginina per una glutamina. Després de trobar-se aquest polimorfisme en un individu afecte es va procedir a seqüenciar la resta d'individus afectes i sans de la família. Finalment es va descartar com a mutació donada la seva presència en individus sans i també la seva presència en homozigosi en certs individus afectes. En una malaltia amb herència autosòmica dominant el normal seria trobar la mutació en heterozigosi en els individus afectes.

A partir d'aquests resultats, no podíem considerar el gen de la Filamina C implicat en la malaltia, si bé, abans de descartar-lo definitivament es van realitzar proves addicionals, tant per comprovar si existien alteracions de la seqüència que no fossin detectables per amplificació per PCR com per estudiar l'estat de l'expressió del gen a individus afectes respecte de la normal a individus control.

Paralelament es va iniciar la seqüenciació d'altres gens candidats dins la regió candidata, com s'indica a l'apartat 6 d'aquesta discussió.

5 ESTUDI EXHAUSTIU DEL GEN DE LA FILAMINA C

5.1 Estudi d'una regió susceptible d'expansions al gen de la Filamina C

El fenomen de l'anticipació gènica, caracteritzat per la manifestació d'una malaltia a edats més primerenques a mesura que avancen les generacions s'ha descrit en diferents entitats (Pulst 1993, Durr 1995, Speer 1998a). A més, s'ha pogut relacionar aquest fenomen amb l'anomenada expansió de seqüències repetitives o *repeats* en forma de triplets en diferents malalties de tipus degeneratiu, com la Corea de Huntington (HDCRG 1994), la distròfia miotònica congènita (Harper 1992, Mahadevan 1992) o la malaltia de Machado-Joseph (Kawaguchi 1994). En d'altres entitats com la Síndrome de Cromosoma X fràgil (Webb 1986, Schalling 1993, Knight 1993), la distròfia oculofaríngea (Brais 1998, Muller 2001) o les ataxies de Friedrich i espinocerebel·lars (Orr 1993, Schalling 1993, Holmes 1999, Campuzano 1996, Pulst 1996, Zhuchenko 1997) també s'han descrit expansions de trinucleòtids. En total s'han descrit expansions d'aquest tipus en 14 afeccions neurològiques (Cummings 2000a). Si bé podrien haver-hi correlacions en altres malalties encara resta força per saber si les expansions trobades en algunes entitats es poden correlacionar realment amb l'anticipació i pel contrari, resta per saber si en certes entitats que semblen presentar un clar fenomen d'anticipació hi ha o no expansions de seqüències repetitives, com seria el nostre cas. Concretament, és més freqüent l'expansió de repeticions del tipus CAG/CTG (Sanpei 1996, Pulst 1996, Nielsen 1997). No obstant s'ha suggerit que d'altres seqüències repetitives podrien estar implicades en expansions en entitats neurodegeneratives (Lindblad 1994). A la distròfia muscular oculofaríngea s'han descrit expansions de repeticions GCG (Brais 1998, Muller 2001). En el cas de la distròfia miotònica s'han descrit expansions de repeticions CTG a la regió 3' no traduïda del gen de la miotonina o DM protein kinasa (Brook 1992, Buxton 1992, Harley 1992). A més de la distròfia miotònica i l'oculofaríngea, hi ha una altra entitat d'implicació muscular on s'han observat expansions de triplets, com és la malaltia de Kennedy (SBMA), essent expandits triplets CAG (La Spada 1991). Curiosament, s'ha descrit també el fenomen de l'anticipació en la distròfia muscular facio-escapulo-humeral, però en aquest cas relacionat no amb expansions de regions repetitives sinó amb delecions de les mateixes, havent-se descrit en algunes famílies una correlació entre el tamany de la

delecció i la severitat de la malaltia i fins i tot apareixent un major tamany de la delecció quan més primerenc era l'inici de la malaltia (Tawil 1996, Flanigan 2001).

Examinant la seqüència del gen de la Filamina C (Nº d'accés a GenBank: AF252549) (Figura 12 de Resultats), veiem que si bé no semblen haver-hi regions de triplets susceptibles d'expansió, sí hi ha diverses regions riques en G/C i a la regió 3' no traduïda trobem una regió amb 11 repeticions del dímer AC. Així, per tal de poder esbrinar si existia una expansió de repeticions, present en diferents entitats neurodegeneratives i en relació amb el fenomen de l'anticipació, podent afectar a l'estabilitat i vida mitja de l'mARN, (Harley 1992, Speer 1998a, Lindblad 1994, Nielsen 1997, Imbert 1996, Martorell 1997, Sanpei 1996, Ross 1995, Peltz 1991, Wilson 1999, Lieberman 2000, Muller 2001) i considerant la impossibilitat en moltes ocasions de que l'amplificació per PCR detecti aquestes alteracions (per amplificacions preferencials de seqüències salvatges) es va hibridar l'ADN genòmic en la regió 3' del gen de la Filamina C, on es troba la seqüència AC repetida 11 vegades, amb una sonda generada per PCR, un cop digerit l'ADN (de l'individu control nº 43 i de l'individu afecte nº 34) amb 2 enzims de restricció. En el cas concret de la distròfia miotònica, l'expansió de trinucleòtids CTG a la regió 3' no traduïda sembla estar relacionada amb alteracions del processament de l'ARN, amb acumulació de transcrits expandits en *clusters* nuclears i *splicing* i poliadenilació reduïts. Tot això pot venir donat per un anòmal reconeixement de seqüències repetitives per part de proteïnes d'unió a l'ARN (Davis 1997, Hamshire 1997, Lieberman 2000).

Tal com s'indica a la figura 11 de l'apartat de Resultats, si bé un enzim de restricció no va funcionar bé, amb l'altre (*Nco I*) es va obtenir la banda esperada de 1,9 Kb tant en l'individu control com en l'afecte. Per tant, sembla que a partir d'aquests resultats no podríem establir que hi hagués una expansió de repeticions AC significativa a la regió 3' del gen de la Filamina C que pogués tenir una influència en processament d'ARN, estabilitat, transcripció o vida mitja.

5.2 Anàlisi del nivell d'expressió del gen de la Filamina C

A més de fer un estudi a fons de la seqüència nucleotídica del gen de la Filamina C, es va realitzar un *Northern Blot* per tal de conèixer l'estat d'expressió en individus afectes respecte dels sans. Com es pot apreciar a la figura 13 de l'apartat de Resultats, no es van detectar diferències significatives d'expressió després d'hibridar l'mARN d'individus afectes i sans amb una sonda específica de Filamina C generada a partir de cADN i amb una sonda específica de ciclofilina A com a control de normalització. L'assaig es va realitzar amb mostres dels individus del pedigrí n°s 1 (IV-5), 29 (IV-1), 30 (IV-3) i 31 (V-1) i de 4 controls externs sans. En el moment d'obtenir les biòpsies es considerava que tots quatre individus de la família eren afectes, comprovant-se després d'examen clínic posteriors que només ho eren realment els individus 29 i 31, servint finalment els individus 1 i 30 com a controls interns. Així, podem concloure que tampoc l'expressió del gen de la Filamina C es veu modificada als individus afectes del nostre pedigrí.

5.3 Estudi d'una regió rica en G/C en el gen de la Filamina C. Comprovació de la presència d'expansions/reduccions

Com hem esmentat abans, a més de la regió 3' amb repeticions AC, es va detectar una regió discontinua amb abundància de repeticions de bases G i C entre els exons 21 i 24 del gen de la Filamina C que també podia ser susceptible de patir expansions per errors de la polimerasa (Veure Figura 15 de l'apartat de Resultats). Tenint en compte que dita regió abasta tant regions intròniques com exòniques, una mutació d'aquest tipus podria suposar l'alteració del patró d'*splicing* normal i per tant, donar lloc a una transcripció aberrant i en conseqüència una proteïna defectiva. Curiosament, després d'amplificar el cADN d'aquesta regió en un individu sa i en un afecte es va observar la presència d'una banda extra diferencial en l'individu afecte, de tamany menor a l'esperada de 659 pb (Veure Figura 14 de l'apartat de Resultats). No obstant, després de retallar i clonar les bandes, la seqüència obtinguda va ser la normal a la banda esperada tant en l'individu sa com en l'afecte però la seqüència de la banda adicional de l'individu afecte, després de fer una recerca comparada de seqüències (BLAST) no tenia cap homologia amb la seqüència de la Filamina C i sí amb la seqüència de la miosina D, esdevenint, per tant, una inespecificitat probablement resultat d'una amplificació inesperada deguda a l'elevada homologia dels encebadors utilitzats amb part de la seqüència de la miosina D (apareixent casualment només a l'individu afecte).

6. PERSPECTIVES DE FUTUR-ALTRES GENS CANDIDATS

Un cop la Filamina C sembla descartada com a gen implicat en la malaltia, el següent pas, a més de mirar d'acotar amb major precisió la regió lligada, és seguir analitzant altres possibles gens candidats dins la regió. De fet, aquesta feina ja s'ha iniciat i es pretén continuar fins a trobar el gen implicat. Actualment, davant la dificultat de trobar més marcadors microsatèl·lits polimòrfics amb prou grau d'heterozigositat com per que siguin informatius, s'està procedint ja a l'estudi de polimorfismes puntuals (*Single nucleotide polymorphisms* o SNPs) tant descrits al llarg de l'ADN genòmic present als diferents clons que comprenen la regió lligada com a d'altres trobats de forma casual al seqüenciar altres gens candidats. També s'està realitzant actualment el cribratge d'una sèrie de gens candidats addicionals i d'algun a mode de predicció per semblança amb gens coneguts, presents en la regió lligada del cromosoma 7. Tot i que la majoria d'ells no semblen presentar funcions específiques de múscul, 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 (Tubs 2000-no publicat), es va considerar un bon candidat donada la seva interacció amb l'actina. Altres gens ubicats en la regió lligada que actualment no presenten ESTs a teixit muscular no s'estan considerant de moment, per bé que seria possible que es descriguessin com a expressats en aquest teixit en un futur. La continua actualització de les diferents bases de dades genètiques podrà contribuir a fer aquestes acotacions d'una forma més precisa. Els gens escollits són:

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

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

6.1 ADP-Ribosylation factor 5 (ARF5)

Els ARF són proteïnes reguladores d'unió a GTP de baix pes molecular. S'ha vist que estimulen l'activitat ADP-ribosiltransferasa de la toxina de còlera *in vitro* i semblen jugar un paper important en el tràfic vesicular *in vivo*. De fet, inicialment es van descriure com a cofactors proteics de l'ADP ribosilació del component regulador estimulador de l'adenilat ciclase, $G_s \alpha$ i se sap ara que són proteïnes d'unió a GTP de 21 kDa (Kahn 1984, Kahn 1986). Els ARF depenen de GTP o els seus anàlegs per ser actius, s'uneixen a GTP amb una elevada afinitat en presència de dimiristoilfosfatidilcolina/colat i contenen seqüències consens d'unió a GTP i hidròlisi (Welsh 1994). S'ha vist que aquestes proteïnes es localitzen al complex de Golgi i regulen processos de transport vesicular a vies endocítiques i exocítiques (Stearns 1990, Clark 1993). Aquesta és una subfamília de la superfamília RAS de proteïnes G. S'han descrit 6 membres de la família dels ARF humans, classificats en 3 subgrups en funció del seu tamany, identitat aminoacídica, filogènia i estructura genètica (Welsh 1994) però es creu que podrien ser fins a 15 (Clark 1993, McGuire 1997). La seqüència aminoacídica està àltament conservada entre espècies, arribant al 100 % en alguna isoforma (Kahn 1991, Clark 1993, Welsh 1994) i entre elles mateixes hi ha una elevada identitat, de fins el 96 % entre les formes 1 i 3 (Kahn 1991, Clark 1993). La forma n° 5 (ARF 5) va ser mapada al cromosoma 7 (7q31.3) a partir d'un cromosoma artificial de llevat (YAC) i es va descriure la seva estructura genètica, amb 6 exons codificants i 5 introns, esdevenint una disposició única dins aquesta subfamília (McGuire 1997). Posteriorment s'ha pogut demostrar que ARF5 es troba expressat a tots els teixits, si bé el nivell d'expressió varia entre els diferents teixits, essent més elevat a pàncrees, glàndula pituitària i placenta (Lebeda 1999).

Donada la seva àmplia expressió multitissular, no semblaria, *a priori*, que ARF5 fos un gen específic a considerar com a candidat a estar implicat i alterat en una distròfia muscular, podent-se esperar que donada la seva funció general, pogués donar lloc a alteracions més sistèmiques en cas de mutació. No obstant, com ja hem dit, el nivell d'expressió no és el mateix a tots els teixits i l'existència de diferents isoformes podria afavorir una compensació de funció segons els teixits.

6.2 Fascina 3 (FSCN3)

Les fascines formen part d'una família genètica d'*actin-bundling proteins* (es podria traduir com proteïnes d'empaquetament o agregació d'actina). Inicialment es va descriure a humans una proteïna d'aquest tipus a cèl·lules HeLa (Yamashiro-Matsumura 1985) amb capacitat d'unió a actina de múscul esquelètic. Aquesta proteïna és el principal component de les xarxes d'actina, formades afegint actina exògena a extractes citoplasmàtics. Més endavant es va descriure una proteïna similar, homòloga a la fascina de l'eriç de mar i de *Drosophila*, descrites prèviament, amb expressió predominant en processos proliferatius (Duh 1994), remarcant-se la importància de la seva funció com a agregadora d'actina donada la poca homologia amb d'altres proteïnes d'unió a actina. Aquestes proteïnes, doncs, s'entrecreuen amb l'actina F donant lloc a feixos ordenats amb extensions cel·lulars dinàmiques (Tubb 2000), contribuïnt les estructures ordenades a estabilitzar processos cel·lulars mecanosensorials (Edwards 1995). Aquests feixos o *bundles* es troben a moltes estructures cel·lulars, com fibres d'estress, anells contràctils o microfilaments (Ono 1997). S'ha demostrat que la fascina indueix canvis morfològics cel·lulars, amb reorganitzacions al citosquelet i increment de motilitat en cèl·lules epitelials (Yamashiro 1998). La fascina es veu regulada negativament per fosforil·lació i per la proteïna caldesmon (proteïna d'unió a actina i Calmodulina) en coordinació amb la tropomiosina, les quals, juntes, impedeixen la unió de la fascina a l'actina i les dissocien (Ono 1997, Ishikawa 1998). La fosforil·lació i inhibició de la fascina ve controlada per factors d'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular (Adams 1999). En el cas de la Fascina 2 (FSCN2), específica de retina (concretament als segments interns i externs de les cèl·lules fotoreceptores) (Saishin 1997 i 2000), la seva funció sembla ser l'ensamblatge dels microfilaments d'actina per tal de facilitar la morfogènesi dels discs fotoreceptors (Tubb 2000). S'han descrit fins a 3 variants d' *splicing* retinals (Saishin 2000). És curiós remarcar que tant la Fascina 1 com la 2 es troben físicament lligats a una regió cromosòmica contigua a un gen d'actina (cromosomes 7 i 17, respectivament), suggerint-se que el parell fascina/actina deriva d'una duplicació gènica comuna.

La Fascina 3 (FSCN3), un paràleg de les fascines prèviament descrites i mapada a la regió del cromosoma 7 lligada amb la nostra distròfia muscular, s'ha descrit a testicle (Tubb 2000-no publicat). En principi podria pensar-se que aleshores no podria estar implicada en una disfunció muscular, però caldria confirmar si aquesta forma es

pot trobar expressada o no a teixit muscular. És prou suggerent, però, el fet que la funció de les fascines sigui una interacció directa amb l'actina. Donat que a *Xenopus* els més alts nivells d'expressió es van trobar a oòcits i testicles, es va especular amb la possibilitat que la fascina tingui un paper en la dinàmica dels microfilaments associada amb la formació i/o fertilització de les cèl·lules germinals de vertebrats (Holthuis 1994).

6.3 Calumenina

Aquesta proteïna, mapada a 7q32 (Yabe 1998), es troba expressada de forma ubiqua als teixits humans, amb uns més alts nivells d'expressió a cor, placenta i múscul esquelètic i s'ha pogut localitzar a l'aparell de Golgi i al reticle endoplasmàtic (RE) (Vorum 1998). Prèviament s'havia descrit fortament expressada a cor de ratolí. Funcionalment és una proteïna que presenta dominis *EF-hand* que lliguen calci i podria estar implicada en processos dependents de calci al RE. Pertany a una família de proteïnes que comparteixen la presència dels esmentats dominis EF i on es troben, a més, la reticulocalbina, la proteïna Cab-45 i la proteïna Erc-55, totes elles localitzades al RE (Vorum 1998). Així, és una proteïna que lliga calci i podria desenvolupar importants funcions al RE com el plegament de proteïnes. Més recentment s'ha vist que alguns membres d'aquesta família estan implicats en activitats patològiques com la transformació cel·lular cap a malignitat, mediació d'efectes tòxics de certs verins i possible participació en la formació d'amiloid (Honore 2000) La calumenina humana presenta un 98 % d'identitat amb la forma de ratolí (Vorum 1998 i 1999). Si bé no sembla ser una proteïna amb una funció específica de múscul, cal considerar la seva capacitat de lligar calci, quan aquest juga un paper important en el procés de la contracció muscular.

6.4 LOC63220 (similar a la subunitat de 14 kDa de l'ATPsa vacuolar)

Si bé aquesta seqüència suposa simplement una predicció de gen, l'existència d'ESTs a diversos teixits, entre ells múscul i la semblança amb un gen conegut, fan d'aquest un candidat vàlid dins la regió lligada (Nº accés a les bases de dades de l'NCBI: XM_004714). Com s'indica en l'encapçalament, estem davant una de les subunitats d'un enzim que actúa com una bomba de protons a través de la membrana. Aquesta proteïna vacuolar s'encarrega d'acidificar diferents compartiments cel·lulars i té una funció acidificadora especialment important a la via secretora, afectant l'empaquetament i processat del contingut de vesícules sinàptiques i grànuls cel·lulars (Peng 1996). La descripció d'un transcrit corresponent a la subunitat de 14 kDa a cervell humà (la seqüència del cromosoma 7 s'ha descrit a teixit muscular, entre d'altres i presenta una identitat total amb l' mARN de la subunitat de 14 kDa descrita per Fujiwara) ja va indicar una elevada conservació de la seqüència nucleotídica entre espècies. És una subunitat expressada de forma ubiqua i per això podria ser una proteïna *housekeeping* (Fujiwara 1995). S'ha vist que aquesta subunitat juga un paper clau com a lligam o coordinació entre la part catalítica de l'enzim i el canal protònic (Peng 1996). En el procés de remodelació de l'os juguen un paper important els osteoclastes, els quals adquireixen una conformació especial a la seva membrana, la qual es troba envoltada per un anell d'actina. En aquesta zona es produeix una acidificació gràcies a les ATPases vacuolars, la qual serà clau a l'hora de produir la dissolució òssia i la degradació de la matriu proteica òssia. Hi ha una unió directa d'aquesta bomba amb l'actina i sembla ser que la concentració de l'enzim a la regió on ha de portar a terme la seva funció té relació amb la seva interacció amb l'actina, produïnt-se una reorganització del citosquelet d'actina durant l'activació dels osteoclastes, asseparant-se aquesta de la bomba un cop l'enzim s'ha pogut concentrar a la zona a resorbir (Lee 1999). Recentment, certs experiments han revelat que les ATPases vacuolars juguen un paper clau en el creixement i la modulació fenotípica de miofibroblastes en cultiu (Otani 2000). Prèviament, al descriure's una subunitat similar a embrió de ratolí ja es van suggerir funcions específiques en les darreres etapes de l'embriogènesi, afectant de forma important, entre d'altres, a mioblastes en procés de fusió (Numata 1995).

6.5 TRN-SR (Transportina-SR)

Aquest és un gen descrit no fa gaire temps i constitueix un receptor que facilita el transport cap al nucli de certes proteïnes (Kataoka 1999). A més, és un factor de pre-*splicing* essencial localitzat al nucli que forma part de la família importina β /transportina i conté al menys un domini d'unió a RNA (Fu 1995). La importació de proteïnes cap al nucli està mediada pel complex dimèric importina α/β . La subunitat α s'uneix a un senyal de localització nuclear (NLS) directament i serveix d'adaptador per la unió de la importina β (Izaurre 1998). A més de la seva funció essencial com a factors d' *splicing*, les proteïnes SR poden modular la selecció del lloc d' *splicing* i desenvolupar així papers reguladors importants en l' *splicing* alternatiu (Ge 1990). També va ser caracteritzada a partir d'assajos en cèl·lules HeLa (Kataoka 1999) i s'han trobat ESTs a teixit muscular (*GenBank*). Les proteïnes SR contenen un domini anomenat RS que funciona com a NLS i ajuden al transport actiu de proteïnes cap al nucli (Kataoka 1999). Aquest tipus de domini es troba també a altres proteïnes amb funcions d'activació transcripcional (Zahler 1992). Posteriorment es va veure que la fosforil·lació d'aquest domini dona lloc a un canvi de localització de la proteïna SR, passant a estar més dispersa pel citoplasma i inclús podent arribar a estar absent del nucli (Cáceres 1998). Dins de la gran complexitat que suposa la mediació de la localització nuclear de proteïnes, també es va demostrar posteriorment que altre membre d'aquesta família de proteïnes, la transportina-SR2, interacciona amb el domini RS fosforil·lat d'altres proteïnes SR, mitjançant-se a partir d'aquesta interacció el seu trànsit cap al nucli. Sembla ser que aquesta capacitat de discernir l'estat de fosforil·lació pot ser el principal tret diferencial entre les formes 1 i 2, més tenint en compte que estructuralment es diferencien per la presència d'un fragment intern únic en la forma 2 que és absent a la forma 1 (Lai 2001).

En el cas d'aquesta proteïna és difícil predir quines són les possibilitats de que esdevingui la responsable de la malaltia, donat el seu paper general i, *a priori*, no específic de múscul.

6.6 UBE2H (Ubiquitin-conjugating enzyme E2H)

Aquest enzim, molt similar a un descrit a llevat, es va descriure a placenta, si bé s'han trobat ESTs a teixit muscular (Kaiser 1994 i *GenBank*). La via de la ubiquitina-proteosoma és la responsable de la degradació de moltes proteïnes i controla, per extensió, la degradació de la majoria de les cèl·lules eucariotes. A més, la degradació proteica és un mecanisme essencial per tal de mantenir l'homeostàsi cel·lular, en la qual s'eliminen de la cèl·lula proteïnes aberrants o en excés. La via implica una cascada enzimàtica a través de la qual múltiples molècules d'ubiquitina s'uneixen covalentment a la proteïna diana i aquesta és després degradada pel complex proteosoma 26S (Attaix 1998, Schwartz 1999). Els enzims conjugadors d'ubiquitina catalitzen la unió covalent de la ubiquitina als substrats cel·lulars. S'han descrit tota una sèrie d'enzims d'aquest tipus, essent remarcable que gran part d'ells tenen una expressió predominant a teixit muscular (Watanabe 1996, Katsanis 1998, Yokota 2001). S'ha emfatitzat ja a la literatura que la via ubiquitina-proteosoma juga un paper molt important en el procés de degradació proteica al múscul, teixit on es produeix una elevada activitat de contracció-relaxació, per la qual cosa la implicació d'un enzim conjugador d'ubiquitina en una alteració muscular sembla plausible. En estudis de fa uns anys, es va afirmar que tot i augmentar la degradació proteica en una entitat com la distròfia muscular de Duchenne, a nivell d'expressió només es va observar increment en els nivells d'mARN d'una proteasa dependent de calci, la calpaïna, implicada en la LGMD2A autosòmica recessiva (Combaret 1996). Però posteriorment s'ha vist que certes condicions catabòliques com el càncer, la diabetes i la sepsis s'associen amb atròfia muscular a partir de l'activació de la via proteolítica (incrementant-se els nivells d'mARN de components de la via) (Price 1998); a la miopatia distal amb vacuoles s'ha vist per immunohistoquímica una major presència de proteosomes i ubiquitina a les fibres musculars, essent aquest fet també cert a algunes distròfies musculars, si bé amb menys intensitat (Kumamoto 1998); també a nivell histològic finalment es va poder evidenciar un increment de proteosomes i ubiquitina en certs casos de distròfia muscular de Duchenne, confirmant-se que, a més de la degradació per calpaïna, la via proteolítica ubiquitina-proteosoma també jugava un paper en aquestes afeccions (Kumamoto 2000). Com s'ha descrit ja a la introducció, la LGMD1C implica mutacions en la caveolina-3. Un cop es detecta la presència de les proteïnes mutants, aquestes exerceixen un paper de dominància negativa, de forma que pateixen ubiquitinització i quan són degradades,

també ho són les molècules normals. S'ha vist que bloquejant l'acció proteolítica no només no es degrada la proteïna mutant sino que es conserva la normal i pot exercir la seva funció (Galbiati 2000). Molt recentment (Frosk 2002) s'ha descrit una mutació en el gen d'una lligasa d'ubiquitina en la LGMD autosòmica recessiva 2H, la qual cosa dóna més força a la UBE2H com a gen candidat.

6.7 HSPC216 (*Homo Sapiens Hypothetical protein*)

Si bé no podem considerar l'existència del gen com a tal, aquesta seqüència s'ha predit com un mARN que donaria lloc a una proteïna hipotètica. Seria una proteïna definida per predicció (Zhang 2000), amb exons putatius i senyals d' *splicing*. A partir d'aquesta definició la considerariem candidata amb el recolzament de la descripció d'ESTs a teixit muscular (*GenBank*). A partir d'un ampli i ambiciós estudi sobre cèl·lules mare hematopoiètiques CD34+, tot seguint una estratègia de catalogació d'ESTs, clonatge, seqüenciació i amplificació d'extrems de cADN (RACE), es van definir més de 300 seqüències codificants de gens no descrits prèviament. A més, es van ubicar als cromosomes corresponents gràcies a un mapatge electrònic i a mapes *Radiation Hybrid* (RH), és a dir, tot utilitzant bases de dades existents amb informació d'ordenació i localització específica de seqüències. En el cas de HSPC216, es preveu que el gen constaria d'un mínim de 3 exons i la proteïna teòrica d'uns 342 aminoàcids (Zhang 2000). A part d'això, no es disposaria de gaire més informació al respecte, suposant la incògnita més gran dins el grup de gens candidats de la regió lligada del cromosoma 7. recolzat tot plegat per la descripció d'ESTs a teixit muscular.

6.8 KIAA0265 (*Kelch-like protein*)

De forma similar al cas de la HSPC216, ja fa alguns anys més es va procedir a la seqüenciació de clons de cADN a partir de línies cel·lulars mieloids i cervell humans (Nagase 1996) corresponents a trànscripats llargs de longitud completa, predint-se les seqüències codificants de 80 nous gens, entre ells KIAA0265, que sembla expressar-se a diferents teixits, havent-se trobat, entre d'altres, a múscul (*GenBank*). Hi han trets característics que indiquen, si més no, una relació amb components musculars. Tot examinant la proteïna putativa que es derivaria del cADN descrit, veiem que presenta una regió o motiu anomenat *kelch*, definida inicialment com un domini implicat en interaccions proteïna-proteïna i certes activitats enzimàtiques, que interacciona amb l'actina. Aquesta proteïna formaria part d'una família caracteritzada per aquest domini repetitiu de 50 aminoàcids (Xue 1993). S'han descrit diverses proteïnes amb aquest domini en diferents organismes de complexitat diversa. Una de les darreres descrites és la proteïna IPP, descrita a partir de placenta i expressada ubiquament. A partir dels estudis d'aquesta darrera proteïna i amb el que es coneix de les anteriors s'ha emfatitzat la importància de la relació entre aquest tipus de proteïna i el citosquelet d'actina, podent-se modular la funció citosquelètica gràcies a aquest domini proteic (Kim 1999). Tradicionalment els citosquelets d'actina i els microtubulars s'han considerat com a 2 entitats asseparades i amb funcions diferents, si bé se sap ara que els 2 sistemes de filaments cooperen funcionalment en diversos processos cel·lulars (Gavin 1997). Les proteïnes associades a microtúbuls s'han pogut veure també interaccionant amb actina, amb la qual cosa es pot considerar que ambdós citosquelets podrien estar lligats tant física com funcionalment (Goode 2000). Una darrera demostració d'aquest fet s'ha pogut constatar amb el funcionament d'una proteïna tipus *kelch* que té un paper clau en el creixement cel·lular polaritzat a llevat. Tant l'actina com els microtúbuls són necessaris per aquest tipus de creixement i aquests últims també per una correcta distribució de l'actina (Sawin 1998). En conjunt, els microtúbuls sembla que podrien transportar aquesta proteïna tipus *kelch* als pols cel·lulars, on dita proteïna regularia l'ensamblatge dels fragments d'actina corticals, que són necessaris per tal de dirigir la deposició de la nova membrana i la biosíntesi de la paret cel·lular (Goode 2000).

Si bé caldria saber amb precisió la possible implicació d'aquest gen en una distròfia muscular, sembla, al menys lògic, considerar-lo com a candidat.