

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Fins el moment de desenvolupar-se la present tesi s'havien descrit 5 formes autosòmiques dominants de Distròfia Muscular de Maluc (LGMD), coneixent-se el gen responsable en 3 d'elles. La família objecte d'estudi presentava ja uns trets clínics suggestius de representar una nova forma diferent a les prèviament descrites. És per això que es va procedir a la confirmació d'aquesta hipòtesi a nivell molecular i a tractar de conèixer els aspectes genètics d'aquesta nova entitat, tant a nivell de localització com de saber quin gen podia estar implicat en la mateixa. Els objectius concrets van ser:

-Excloure les 5 regions cromosòmiques implicades en les 5 formes LGMD autosòmiques dominants prèviament descrites (cromosomes 1, 3, 5, 6 i 7) per anàlisi de lligament a 3 punts.

-Identificar el *locus* cromosòmic en el qual es troba el gen responsable de la malaltia mitjançant anàlisi de lligament a 2 punts, utilitzant marcadors polimòrfics que cobreixin els 22 cromosomes autosòmics.

-Acotar al màxim la regió lligada dins el cromosoma identificat com a portador del gen responsable, tot analitzant el màxim nombre possible de marcadors addicionals dins d'aquella regió, confirmant l'ordre dels mateixos (*fine mapping*) en el cromosoma i examinant amb cura els haplotips dels individus recombinants que apareguin al pedigrí.

-Identificar els millors gens candidats dins la regió lligada, un cop establerts els límits centromèric i telomèric de la regió, tot revisant amb cura els diferents mapes físics i genètics disponibles a les bases de dades i considerant la seva funció i la seva expressió en teixit muscular.

-Iniciar l'estudi exhaustiu dels millors gens candidats, tot analitzant la seva seqüència nucleotídica des de diferents perspectives i comprovant els seus nivells d'expressió comparada entre individus afectes i individus sans.

MATERIALS I MÈTODES

1. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES :

Es va extreure sang perifèrica per venopunció de 55 individus de la família (veure pedigrí a Figura 1) : 27 afectes i 28 sans. 8 de les mostres corresponen a 8 cònjuges sans que es van incorporar al darrer moment a l'estudi de *linkage*. Aquests 8 individus són els cònjuges de III-1, III-2, III-11, IV-1, IV-18, IV-20, IV-21 i IV-22 (nº s d'ordre 86, 85, 48, 87, 80, 84, 81 i 83). El diagnòstic i seguiment de tots els pacients s'ha realitzat al Departament de Neurologia de l'Hospital General de la Vall d'Hebron de Barcelona. A l'apartat 14 es descriuen les característiques clíniques d'aquesta família.

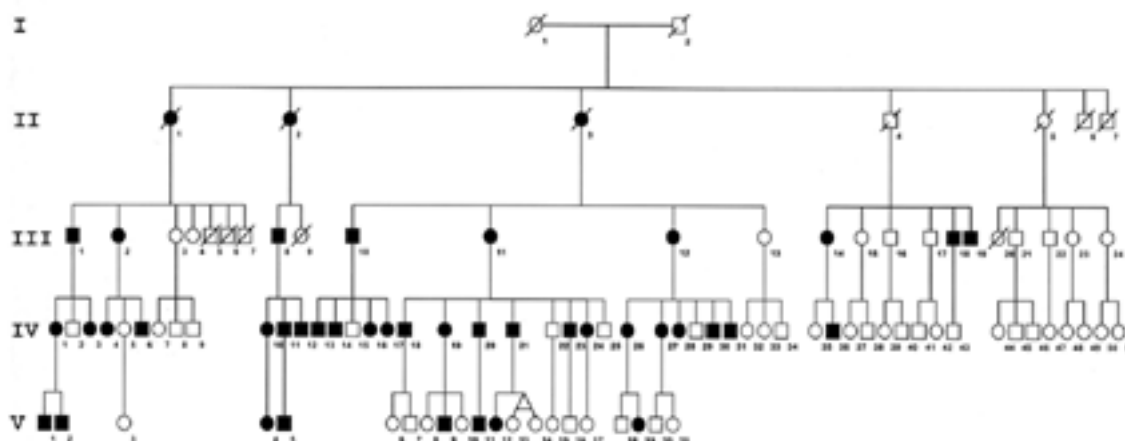


Figura 1 : Pedigrí de la família. Els símbols rodons representen dones, els quadrats representen homes. Els símbols en negreta representen individus afectes i els buits sans. Els símbols barrats representen individus morts.

2. EXTRACCIÓ D' ADN (àcid desoxirribonucleic) TOTAL A PARTIR DE SANG TOTAL PERIFÈRICA (MÈTODE *SALTING-OUT* [Miller 1988])

2.1 Rentat de les cèl.lules

Partint de 5 ml (mililitres) de sang recollida en tubs amb EDTA com a anticoagulant, es va realitzar un rentat de les cèl.lules (es produeix hemòlisi durant el procés d'extracció de la sang i la congelació-descongelació).

- Dipositar els 5 ml de sang en tubs tipus *Falcon* de 15 ml.
- Enrasar fins a 12,5 ml amb solució salina fisiològica (NaCl a 0,9 grams/litre) (*Grifols*).
- Centrifugar les barreges durant 20 minuts a 1300 g a 4°C (graus centígrads) sense fre (centrífuga *Sorvall*).
- Descartar el sobrenadant extraïnt-lo amb pipeta.

2.2 Lisi d'eritròcits

- Afegir 12,5 ml de tampó de lisi d'eritròcits (TLE).
- Incubar els tubs en gel durant 30 minuts, agitant-los manualment diverses vegades.
- Centrifugar durant 15 minuts a 1900 g a 4°C.
- Descartar el sobrenadant.
- Repetir el procés amb 12,5 ml més de tampó de lisi.
- Incubar 5 minuts en gel.
- Aquest procés lisa totalment els eritròcits. En els casos en que el *pellet* encara té aspecte vermellós, realitzar una tercera ronda de lisi.

2.3 Lisi de leucòcits i digestió de proteïnes.

- Afegir 750 µl (microlitres) de tampó de lisi de leucòcits (TLL), 50 µl de SDS (Sodi dodecil sulfat) (*Sigma*) al 10% y 125 µl de proteinasa K a una concentració de 2 mg/ml (miligram/mililitre).
- Barrejar bé amb pipeta.

-Incubar els tubs a 50°C en agitació durant 5 hores (a bany *Aqua Shaker-Adolph Kuhner*), tot homogeneïtzant amb pipeta diverses vegades durant la incubació.

2.4 Extracció salina.

- Afegir 250 µl de NaCl (*Merck*) saturat 5,5 M (mol/litre).
- Agitar mitjançant vòrtex fins a obtenir una barreja escumosa.
- Centrifugar durant 20 minuts a 3000 g.
- Recollir el sobrenadant i passar-lo a un tub net.
- Repetir la centrifugació par tal d'extreure l'excés de sals.
- Tornar a recollir el sobrenadant en altre tub net.
- Afegir un volum de cloroform (1175 µl) (*QCA*), dissolvent orgànic que permet asseparar proteïnes i àcids nucleics.
- Agitar la barreja manualment durant 15 segons.
- Centrifugar durant 10 minuts a 1900 g. S'obtenen 3 fases: la superior aquosa on es troba l'ADN, una interfase on es troben les proteïnes i una fase inferior de cloroform.
- Recollir la fase aquosa i passar-la a un tub net.
- Afegir 117,5 µl de NaAc (Acetat Sòdic) (*Merck*) 3M a pH 5,2 i 2 volums d'etanol (*Merck*) absolut a -20°C (la sal, juntament amb l'alcohol, precipiten l'ADN).
- Agitar la barreja vigorosament fins que aparegui la *medusa* o *cotó* d'ADN.
- Recollir la *medusa* amb una pipeta *Pasteur*.

2.5 Rentat, preparació de la solució i mesura de la concentració

- Rentar la *medusa* amb etanol al 70%.
- Dissoldre en 500 µl de tampó Tris-EDTA (TE) a pH 8.
- Incubar durant 20 minuts en un bany (*Thermomix MM BBraun*) a 37°C.
- D'aquesta solució mare, prendre un petit volum per tal de valorar la concentració, tot mesurant l'absorbància a 260 i 280 nanòmetres (nm) (preparam una dilució 1:40, agafant 2 µl de la solució mare + 78 µl d'aigua, utilitzant 2 µl de tampó TE per preparar el blanc). La relació entre els valors de densitats òptiques de 260/280 nm ens indicarà la puresa de l'ADN (que no contingui un excés de material proteic), essent aconsellable que aquest valor estigui entre 1,7 i 2 (Sambrook 1989). El càlcul de la concentració en

µg/ml (micrograms/mililitre) ve donat per la multiplicació del valor d'absorbància a 260 nm, pel factor de dilució i per 50, el factor específic per ADN. Es va utilitzar un espectrofotòmetre *Amersham Pharmacia*. Congelar la solució a -20 °C.

Tampons-reactius utilitzats

TLE:

- 5 ml de Tris 2M (*Sigma*) a pH 7,5
- 2,5 ml de MgCl₂ (*Merck*) 1M
- 492,5 ml d'aigua bidestil.lada-MilliQ

TLL:

- 40 ml de NaCl (*Merck*) 5M
- 4 ml d' EDTA (*Boehringer Mannheim*) 0,25 M a pH 8,0
- 2,5 ml de Tris 2M (*Sigma*) a pH 7,5
- + enrasar fins a 500 ml amb aigua milliQ

Solució Proteinasa K:

- 2 mg de Proteinasa K (*Roche*)
- 100 µl de SDS (*Sigma*) al 10 %
- 4 µl d' EDTA (*Boehringer Mannheim*) 0,5 M
- + enrasar amb aigua milliQ fins a 1 ml

TE:

- 1 ml de Tris 2M a pH 7,5
- 8 µl d' EDTA 0,25 M a pH 8,0
- + enrasar fins a 100 ml amb aigua milliQ i autoclavar

Autoclau utilitzat: *Matachana*

Purificador d'aigua MilliQ_{plus} *Millipore*

3. EXTRACCIÓ d'ARN TOTAL (MÈTODE CHOMCZINSKY-SACCHI-1987)

3.1 Homogeneïtzació de la mostra

A partir d'una biòpsia de múscul d'uns 150 mg es va procedir a la seva homogeneïtzació.

- Mantenir la peça de teixit en gel sec.
- Netejar bé l'homogeneïtzador (*Politron*[®]-*PCU-Kinematica*) tot submergint-lo durant 1 hora en NaOH (*Merck*) 5M i després 1 hora en aigua ARNsa *free* (tractada amb dietilpirocarbonat-DEPC) (*Sigma*).
- Pipetejar 4 ml de Solució D en un tub estèril de plàstic de 10 ml (*Sarstedt*).
- Introduir la biòpsia en el tub.
- Homogeneïtzar la biòpsia sense descongelar-la durant uns 45 segons.

3.2 Extracció fenòlica

- Traspassar l'homogenat a un tub de vidre (*Corex*[®]) i barrejar amb 4 ml més de Solució D.
- Afegir 0,8 ml de NaAc (*Merck*) 2M a pH 4,0 i vortexar.
- Afegir 8 ml de fenol (*Merck*) equilibrat amb aigua DEPC.
- Afegir 1,6 ml de cloroform (*QCA*) i agitar fortament.
- Deixar en gel durant 15 minuts.
- Centrifugar a 7650 g (*Sorvall*) durant 30 minuts a 4 °C.
- Passar el sobrenadant a un altre tub *Corex*[®] procurant no arrossegar interfase.
- Afegir un volum d'isopropanol (*Merck*) a -20°C.
- Agitar fortament i incubar a -20°C com a mínim 1 hora.
- Centrifugar a 7650 g durant 30 minuts a 4 °C.
- Decantar el sobrenadant.
- Resuspendre el *pellet* en 400 µl de Solució D.
- Passar el volum resuspès a un tub *Eppendorf*.
- Afegir un volum d'isopropanol a -20°C i deixar precipitar durant tota la nit a -20°C.
- Centrifugar a 13500 g (centrífuga *Eppendorf* 5415) durant 30 minuts a 4 °C.

- Treure el sobrenadant i afegir 1 ml d'etanol al 80 % (amb aigua DEPC) a -20°C per rentar.
- Tornar a centrifugar a 13500 g durant 20-30 minuts a 4°C .
- Treure el sobrenadant i deixar assecar el *pellet* durant 2 minuts.
- Reconstituir el *pellet* amb 50 μl d'aigua DEPC a pH 8,5.
- Preparar una dilució per mesurar l'absorbància (per exemple, 2 μl de la solució i 68 μl d'aigua DEPC) com es fa amb l' ADN i calcular igualment la concentració però utilitzant ara un factor de 40.
- Córrer 2 μl de la solució final en un gel d'agarosa (*Bio Rad*) a l'1 % per valorar la puresa i integritat de l'ARN. S'han de veure les bandes 28S i 18S.
- Congelar la solució a -80°C .

Tampons-reactius utilitzats

Aigua-DEPC:

- Afegir 1 ml de DEPC (*Sigma*) a 1 litre d'aigua milliQ.
- Agitar fortament i deixar reposar durant tota una nit.
- Tornar a agitar fortament i autoclavar.

Solució D: Per 500 ml: 200 g de tiocianat de guanidina (*Boehringer Mannheim*)
14,08 ml de Citrat Sòdic (*Fluka*) 0,75M a pH 7,0
21,12 ml de Sarcosil (*Sigma*) al 10 %
234,4 ml d'aigua DEPC

- Escalfar la barreja a 65°C (bany *BBraun*) per dissoldre-la. Un cop refredada, afegir 360 μl de β -Mercaptoetanol (*Sigma*) per cada 50 μl de Solució D.

Fenol-Aigua DEPC:

- Equilibrar volum/volum amb aigua DEPC 2 vegades.
- Afegir 0,5 g d'hidroxiquinoleïna (*Sigma*) a 500 ml de fenol.