

4. ANÀLISI DE MICROSATÈL.LITS MARCATS AMB FLUORESCÈNCIA

Per tal d'excloure les 5 regions cromosòmiques implicades en les 5 formes de LGMD autosòmiques dominants prèviament conegudes i per tal de trobar la regió cromosòmica a la qual es troba lligada la malaltia, es va utilitzar tota una bateria de marcadors microsatèl.lits polimòrfics del *Linkage Mapping Set Version 2 d'ABI PRISM™* (PE Applied Biosystems), que comprèn uns 400 marcadors de tots els cromosomes (els del cromosoma X no es van assajar) i que defineixen una resolució d'uns 10 centiMorgan (cM), tal com es pot veure en les taules 1 a 27. A més, s'han fet servir nous marcadors addicionals no inclosos als panells inicials (Taula 28). Aquests marcadors estan seleccionats del mapa de lligament del Génethon (Weissenbach 1992, Gyapay 1994, Reed 1994, Dib 1996). Els marcadors estan agrupats per panells i consisteixen en parells d'encebadors o *primers* marcats amb 3 fluoròfors diferents de colors blau, verd i groc ([FAM], [HEX], [NED]), que permeten ser detectats i analitzats, un cop amplificats, per l'autoanalitzador *ABI PRISM™ 310* (PE Applied Biosystems) (Veure Taules 1 a 28). També es van utilitzar marcadors addicionals *Human MAPPAIRS® simple sequence repeat* (SSR) fluorescents de *Research Genetics* (Weber 1989), igualment procedents del mapa del Génethon (Taula 29).

4.1 Amplificació de microsatèl.lits polimòrfics mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.1.1 Condicions marcadors PE Applied Biosystems (ajustades en assajos previs)

-Utilitzant microplaques de 96 pouets estèrils (*Applied Biosystems*), pipetejar 5 µl de la barreja dels dos encebadors de cada marcador a una concentració de 1 micromolar (µM) (inicialment el tub suministrat conté una solució mare dels 2 encebadors a 10 µM en TE = 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA i preparem una dilució 1:10, agafant 10 µl de dita solució mare i 90 µl d'aigua).

-Fer un *spin* molt curt en centrífuga (*Beckman*) per tal d'assegurar que tot el volum pipetejat es troba al fons del pou.

-Portar a evaporació tot incubant les plaques cobertes en un forn al buit a 80 °C (*Heraeus*) durant 30 minuts.

-Preparar la barreja *Mix* comuna en quantitat dependent del nombre de marcadors i mostres a assajar (preparar sempre en excés per compensar les pèrdues per pipeteig).

Dita barreja ha de contenir, per cada pou (es van ajustar aquestes condicions standard):

- * 0,75 µl de tampó 10 X de Taq *Platinum™ Polimerasa* (*Gibco BRL*)
- * 0,375 µl d'una solució 50 milimolar (mM) de MgCl₂, (*Gibco BRL*)
- * 1,5 µl d'una barreja a 1,25 mM de dNTPs (desoxinucleòtids trifosfat), (*Gibco BRL*)
- * 2,815 µl d'aigua bidestil.lada
- * 0,06 µl de Taq *Platinum™ Polimerasa* (5 unitats/µl) (*Gibco BRL*)

-Pipetejar 5,5 µl d'aquesta barreja a cada pou.

-Tornar a fer un *spin* per tenir tot el volum al fons del pou.

-Pipetejar 2 µl de solució d'ADN a 20 ng/µl (nanograms/microlitre) de cada pacient a estudiar i també del control disponible també de *PE Applied Biosystems*, el qual ens ha de donar uns productes de determinat tamany, segons consta a les taules de cada panel del *Linkage Mapping Set*.

-Fer un *spin*.

-Posar la placa al termociclador (*Perkin-Elmer 9700*) i incubar sota el programa següent (es van ajustar unes condicions standard per tots els marcadors que conformen els panels del *Linkage mapping Set*) (Saiki 1988):

Condicions de la PCR :

2 minuts de desnaturalització a 94 °C

+

10 cicles x $\left\{ \begin{array}{l} 5 \text{ segons a } 94 \text{ } ^\circ\text{C} \\ 15 \text{ segons d' } \textit{annealing} \text{ a } 55 \text{ } ^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons d'extensió a } 72 \text{ } ^\circ\text{C} \end{array} \right.$

+

20 cicles x $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ segons a } 89 \text{ } ^\circ\text{C} \\ 15 \text{ segons a } 55 \text{ } ^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons a } 72 \text{ } ^\circ\text{C} \end{array} \right.$

+

10 minuts finals d'extensió a 72 °C

-Un cop acabada la reacció de PCR, tornar a fer un *spin*.

4.1.2 Condicions marcadors *Research Genetics* (segons el seu protocol recomanat)

- Pipetejar a cada pou 1 µl de solució d'ADN a 20 ng/µl
- Fer un *spin*.
- Portar a evaporació tot incubant les plaques cobertes en un forn al buit a 80 °C durant 30 minuts.
- Preparar la barreja *Mix*, per cada pou:
 - * 1 µl de tampó 10 X deTaq *Platinum™ Polimerasa* (*Gibco BRL*)
 - * 1,6 µl d'una barreja a 1,25 mM de dNTPs, (*Gibco BRL*)
 - * 0,3 µl d'una solució 50 mM de MgCl₂, (*Gibco BRL*)
 - * 0,3 µl de solució d'encebador *forward* a concentració 8 µM (*Research Genetics*)
 - * 0,3 µl de solució d'encebador *reverse* a concentració 8 µM (*Research Genetics*)
 - * 0,045 µl de Taq *Platinum™ Polimerasa* (5 unitats/µl) (*Gibco BRL*)
 - * 6,455 µl d'aigua bidestil.lada
- Pipetejar, a cada pou, 10 µl de la *Mix*
- Fer un *spin*
- Posar la placa al termociclador (*Perkin-Elmer 9700*) i incubar sota el programa següent (standard per tots els marcadors *Research Genetics*) (Saiki 1988):

Condicions de la PCR:

2 minuts de desnaturalització a 95 °C

+

30 cicles x $\left\{ \begin{array}{l} 45 \text{ segons a } 94 \text{ °C} \\ 45 \text{ segons d' } \textit{annealing} \text{ a } 57 \text{ °C} \\ 1 \text{ minut d'extensió a } 72 \text{ °C} \end{array} \right.$

+

20 minuts finals d'extensió a 72 °C

- Un cop acabada la reacció de PCR, tornar a fer un *spin*.

4.2 Preparació de la mostra per la injecció i anàlisi per fluorescència en l'autoanalitzador ABI PRISM™ 310

-Pels marcadors *PE Applied Biosystems* pipetejar en un pou no utilitzat de la placa 5 µl de cadascun dels productes finals de PCR per colors. És a dir, en un pou tindrem una barreja de cada producte de cada marcador blau per un pacient, en altre pou tindrem la barreja pels marcadors verds i en altre la barreja pels marcadors grocs.

-Pipetejar en un pou no utilitzat 1µl de la barreja dels blaus, 2 µl de la barreja dels verds i 2 µl de la barreja dels grocs.

-En el cas dels marcadors *Research Genetics* barrejar directament 3 µl de cada marcador

-Fer un *spin*.

-Pipetejar en microtubs nets 12 µl d'una solució de formamida (*Fisher*) desionitzada i standard de tamany i 2 µl de la barreja final que hem preparat després de la PCR.

-Fer un *spin*.

-Desnaturalitzar les mostres incubant els tubs durant 5 minuts a 94 °C (a termociclador *Perkin-Elmer 9700*).

-Posar els tubs en gel durant 5 minuts.

-Adaptar la placa amb els tubs a l'autoanalitzador *ABI PRISM™ 310*, el qual, després d'una injecció capil.lar detectarà, mitjançant el programa *GeneScan Analysis® 2.1* els pics corresponents als productes de PCR obtinguts.

-La lectura dels resultats s'efectuarà tant de forma manual llegint directament els pics com també utilitzant el programa *Genotyper® 2.1*, que assigna automàticament els valors dels pics, un cop introduïts els valors que defineixen el rang de valors possibles per cada marcador (Diehl 1990, Ziegler 1992).

Tampons-Reactius utilitzats

-Control : *DNA CEPH Individual 1347-02 (PE Applied Biosystems)*

-dNTPs [preparats a partir de 4 solucions mare de dATP, dCTP, dGTP i dTTP (desoxiadenina, desoxicitosina, desoxiguanidina i desoxitimidina trifosfat) 25 µM de *Gibco BRL*]

-Solució formamida desionitzada: 1,2 ml de formamida (*Fisher*); 100 µl d'standard

-Standard de tamany: *GeneScan™-400HD Size Standard* (marcadors *PE*)

-Standard de tamany *GeneScan™-TAMRA-C* (marcadors *Research Genetics*)

Taules 1 a 27 amb els marcadors del *Linkage Mapping Set*:

The figure displays 12 linkage mapping panels, labeled Panel 1 through Panel 12. Each panel is a table with 5 columns: Locus, Cyt Label, Rec, ARI, and CF (R²) (C). The data is organized into a 3x4 grid of these panels. The first two columns of each panel are highlighted in blue, and the last two are highlighted in green. The tables contain numerical data for various loci and markers, representing linkage mapping results.

Panel 13				
Llocus	Dye Label	Ref	AGP	QT (347-02)
D10887	FAU	0.22	101-78	111, 121
D10888	FAU	0.26	143-70	104, 105
D10889	FAU	0.79	201-22	204, 205
D10897	FAU	0.44	104-20	104, 101
D10904	MC	0.78	107-23	105, 104
D10905	MC	0.60	103-11	105, 104
D10906	FAU	0.33	127-10	105, 105
D10908	MC	0.74	239-10	240, 239
D10909	MC	0.70	239-28	237, 231
D10928	MC	0.72	85-73	109, 112
D10940	MC	0.74	22-14	100, 102
D10971	MC	0.79	104-68	105, 105
D10973	MC	0.74	209-26	210, 112
D10975	MC	0.77	242-18	244, 102
D10976	MC	0.90	202-10	104, 101

Panel 14				
Llocus	Dye Label	Ref	AGP	QT (347-02)
D10981	FAU	0.76	226-11	225, 104
D10987	FAU	0.76	100-10	100, 100
D10990	FAU	0.67	100-20	100, 100
D10993	FAU	0.80	229-27	230, 100
D10997	FAU	0.82	104-20	100, 100
D10998	MC	0.77	222-10	100, 100
D10999	MC	0.75	100-20	232, 100
D10999	MC	0.84	211-28	200, 100
D10999	MC	0.87	100-10	200, 101
D10999	MC	0.88	100-10	100, 100
D10999	MC	0.84	100-10	100, 100
D10999	MC	0.79	173-10	100, 101
D10999	MC	0.84	220-20	220, 100
D10999	MC	0.87	100-10	100, 100

Panel 15				
Llocus	Dye Label	Ref	AGP	QT (347-02)
D10994	FAU	0.20	100-10	100, 100
D10995	FAU	0.28	100-10	100, 100
D10996	FAU	0.73	202-21	200, 100
D10997	FAU	0.78	200-20	201, 200
D10998	FAU	0.79	200-20	200, 100
D10999	FAU	0.87	200-20	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.81	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.74	200-20	200, 100
D10999	FAU	0.75	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.82	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.72	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.84	200-20	100, 100

Panel 16				
Llocus	Dye Label	Ref	AGP	QT (347-02)
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.70	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.78	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.80	100-10	100, 100

Panel 17				
Llocus	Dye Label	Ref	AGP	QT (347-02)
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100

Panel 18				
Llocus	Dye Label	Ref	AGP	QT (347-02)
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100
D10999	FAU	0.27	100-10	100, 100

Panel 25				
Locus	Dye Label	Het.	ASR	GT (pb)
D14S1037	(FAM)	0.83	93-123	145, 145
D14S1037	(FAM)	0.84	154-160	155, 155
D14S1037	(FAM)	0.81	217-241	245, 245
D14S1037	(FAM)	0.84	271-295	295, 295
D14S1037	(FAM)	0.86	31-115	115, 115
D14S1037	(FAM)	0.78	153-158	158, 158
D14S1037	(FAM)	0.74	175-185	185, 185
D14S1037	(FAM)	0.76	213-239	239, 239
D14S1037	(FAM)	0.79	104-121	121, 121
D14S1037	(FAM)	0.78	168-168	168, 168
D14S1037	(FAM)	0.88	238-250	250, 250
D14S1037	(FAM)	0.81	263-299	299, 299

Panel 26				
Locus	Dye Label	Het.	ASR	GT (pb)
D14S1037	(FAM)	0.83	106-126	126, 126
D14S1037	(FAM)	0.88	159-167	167, 167
D14S1037	(FAM)	0.80	200-224	224, 224
D14S1037	(FAM)	0.79	247-277	277, 277
D14S1037	(FAM)	0.88	121-143	143, 143
D14S1037	(FAM)	0.77	156-172	172, 172
D14S1037	(FAM)	0.82	216-228	228, 228
D14S1037	(FAM)	0.76	154-218	218, 218
D14S1037	(FAM)	0.82	250-272	272, 272
D14S1037	(FAM)	0.86	93-117	117, 117
D14S1037	(FAM)	0.80	164-190	190, 190
D14S1037	(FAM)	0.88	200-227	227, 227
D14S1037	(FAM)	0.77	280-308	308, 308

Panel 27				
Locus	Dye Label	Het.	ASR	GT (pb)
D14S1037	(FAM)	0.81	131-163	163, 163
D14S1037	(FAM)	0.71	154-214	214, 214
D14S1037	(FAM)	0.77	243-278	278, 278
D14S1037	(FAM)	0.84	93-110	110, 110
D14S1037	(FAM)	0.87	131-160	160, 160
D14S1037	(FAM)	0.75	166-200	200, 200
D14S1037	(FAM)	0.80	240-284	284, 284
D14S1037	(FAM)	0.80	10-121	121, 121
D14S1037	(FAM)	0.89	132-180	180, 180
D14S1037	(FAM)	0.83	162-168	168, 168
D14S1037	(FAM)	0.86	211-215	215, 215
D14S1037	(FAM)	0.80	290-322	322, 322

Panel 27				
Locus	Dye Label	Het.	ASR	GT (pb)
D14S1037	(FAM)	0.81	133-159	159, 159
D14S1037	(FAM)	0.79	164-174	174, 174
D14S1037	(FAM)	0.77	243-258	258, 258
D14S1037	(FAM)	0.80	93-110	110, 110
D14S1037	(FAM)	0.87	131-160	160, 160
D14S1037	(FAM)	0.75	166-200	200, 200
D14S1037	(FAM)	0.80	252-284	284, 284
D14S1037	(FAM)	0.80	101-121	121, 121
D14S1037	(FAM)	0.89	132-160	160, 160
D14S1037	(FAM)	0.83	162-166	166, 166
D14S1037	(FAM)	0.86	211-215	215, 215
D14S1037	(FAM)	0.80	290-320	320, 320

Het.: Grau d'heterozigositat del marcador

ASR: Rang de longituds esperades dels al·lels en parells de bases (pb)

GT: haplotip del control (pb)

El marcador D14S68 del panel 20 ha estat substituït per 2 marcadors addicionals que cobreixen una major distància: D14S1037 i D14S1044 (Taula 28). Es pot disposar actualment de bateries de marcadors microsatèl·lits asseparats només per 5cM que cobreixen tot el genoma (*PE-Perkin Elmer Applied Biosystems*).

Per tal d'estudiar les 5 regions cromosòmiques implicades en les 5 formes de LGMD prèviament descrites es van utilitzar marcadors pertanyents a aquestes taules, a més d'un addicional també de *PE*, el D1S2635, inclòs en la taula 28.

Taula 28: Marcadors fluorescents *Perkin Elmer Applied Biosystems* addicionals utilitzats:

Marcador	Fluoròfor	Heterozigositat	Rang al.lels	Valor Control
D1S2635	NED	0.87	150-167	154,162
D1S2766	NED	0.74	190-208	190,200
D1S245	HEX	0.81	243-261	246,246
D1S227	NED	0.69	65-79	75,77
D1S2864	FAM	0.81	147-175	147,147
D1S198	FAM	0.79	316-330	316,320
D2S2344	NED	0.78	281-301	289,291
D2S2361	NED	0.76	133-161	140,148
D2S2166	FAM	0.84	240-258	250,254
D3S3697	HEX	0.88	203-228	208,208
D3S3574	HEX	0.84	95-115	100,104
D4S2460	HEX	0.72	187-199	193,193
D4S2986	NED	0.8	221-237	231,233
D4S2920	FAM	0.68	113-123	115,117
D4S2924	FAM	0.72	263-279	267,269
D5S1960	FAM	0.8	125-163	132,142
D5S2073	FAM	0.78	245-261	251,251
D5S674	NED	0.77	274-284	274,280
D6S282	FAM	0.87	107-133	119,127
D6S1575	FAM	0.82	113-135	115,127
D6S1573	FAM	0.78	278-298	288,298
D6S452	NED	0.84	269-288	271,281
D6S1697	HEX	0.55	257-263	257,257
D6S300	FAM	0.75	190-216	195,209
D7S2560	NED	0.86	157-203	165,165
D7S2496	NED	0.71	215-241	215,227
D7S691	HEX	0.74	136-154	146,152
D8S543	FAM	0.75	117-141	131,131
D8S1705	FAM	0.83	196-216	198,208
D8S275	NED	0.75	147-165	159,161

Marcador	Fluoròfor	Heterozigositat	Rang al·lels	Valor Control
D8S1827	NED	0.66	162-172	164,168
D8S1734	FAM	0.67	111-121	113,117
D8S1779	HEX	0.75	197-211	203,203
D9S271	FAM	0.74	142-166	158,160
D9S259	FAM	0.67	138-152	143,143
D10S213	FAM	0.82	181-199	191,193
D11S4126	NED	0.59	137-151	147,147
D12S304	FAM	0.7	314-328	316,320
D12S1675	FAM	0.74	218-232	223,231
D12S367	HEX	0.76	143-157	143,149
D12S1682	NED	0.77	141-159	147,151
D13S1236	FAM	0.67	127-141	129,131
D13S1243	NED	0.78	252-266	253,253
D14S1037	NED	0.82	98-148	126,130
D14S1044	FAM	0.65	230-244	238,240
D14S1023	FAM	0.81	101-117	105,107
D14S990	NED	0.84	151-169	154,154
D14S972	FAM	0.75	206-218	208,212
D14S1040	NED	0.73	90-120	110,112
D15S1014	NED	0.73	192-204	197,199
D16S418	FAM	0.82	174-196	180,186
D16S3027	FAM	0.87	214-238	214,224
D16S521	FAM	0.71	162-182	164,178
D16S3100	FAM	0.66	274-288	277,283
D18S1107	NED	0.72	85-99	93,95
D18S56	NED	0.73	109-123	110,112
D18S450	HEX	0.79	223-239	224,228
D18S1127	FAM	0.86	184-210	198,200
D19S865	NED	0.88	199-235	210,212
D19S572	FAM	0.8	124-142	137,137
D19S931	HEX	0.77	154-182	171,177

Marcador	Fluoròfor	Heterozigositat	Rang al.lels	Valor Control
D21S1255	NED	0.8	312-332	314,319
D22S1174	NED	0.82	126-152	146,150

Taula 29 : Marcadors fluorescents *Research Genetics* utilitzats:

Marcador	Fluoròfor	Heterozigositat	Rang al.lels
D3S1598	HEX	0.87	290-316
D6S1027	FAM	0.81	Al voltant de 125
D7S680	TET	0.72	119-131
D7S689	HEX	0.65	125-135
D8S1145	FAM	0.63	271
D15S652	TET	0.81	285
D17S1293	TET	0.88	262-290
D17S933	HEX	0.82	188-206
D17S1299	FAM	0.76	188-208
D17S958	TET	0.69	101-115
D16S402	HEX	0.87	161-187
D22S425	FAM	0.62	192-202

El cribratge inicial de tots els cromosomes amb marcadors fluorescents i de les 5 regions cromosòmiques de localització de les 5 formes de LGMD autosòmiques dominants prèviament conegudes es va realitzar a partir de l'estudi de 15 membres del pedigrí de les generacions IV i V :

Nº mostra-Posició al pedigrí

30	IV-3 (sana)
1	IV-5 (sana)
19	IV-6 (afecte)
8	IV-9 (sa)
9	IV-18 (afecte)
10	IV-19 (afecta)
2	IV-22 (sa)
13	IV-24 (afecta)
14	IV-27 (afecta)
15	IV-28 (afecta)
16	IV-36 (afecte)
31	V-1 (afecte)
32	V-2 (afecte)
24	V-11 (afecte)
25	V-12 (afecta)

Veure disposició dels individus a pedigrí reduït a apartat 1.1 de Resultats