

5. ANÀLISI DE MICROSATÈL.LITS MARCATS AMB P³²

5.1 Amplificació per PCR utilitzant encebadors marcats amb P³²

Es van utilitzar marcadors addicionals tipus *Human MAPPAIRS[®] simple sequence repeat* (SSR) de *Research Genetics* per estudiar regions no cobertes pels panels de l'*ABI PRISM[™] Linkage Mapping Set d'Applied Biosystems* i poder obtenir un *fine mapping* de la regió candidata.

-Pipetejar 5 µl de solució d' ADN a 20 ng/µl a cada pou i assecar per evaporació de la mateixa forma que ho fèiem al preparar les PCR per l'estudi de marcadors fluorescents.

-Preparar una solució de cada encebador *Human MAPPAIRS[®]* (*Research Genetics*) a una concentració de 10 pmols/µl (picomols/microlitre).

-Marcar l'encebador *forward* per l'extrem 5' amb γ -P³²-ATP mitjançant reacció de fosforil.lació (*kinació*) (Sambrook 1989):

En un microtub PCR, pipetejar, per cada reacció:

- 0,1 µl d'encebador *forward* a 10 pmols/µl.
- 0,05 µl de tampó 10 X de kinasa (*Gibco BRL-Life Technologies*)
- 0,05 µl de γ -P³²-dATP (*NEN*)
- 0,02 µl de T4 Polinucleòtid Kinasa (10 u/µl) (unitats/microlitre) (*Gibco BRL-Life Technologies*)
- 0,28 µl d'aigua bidestil.lada

-Incubar la reacció sota les següents condicions al termociclador *Perkin Elmer 9700*:

37 °C durant 30 minuts

50 °C durant 5 minuts

-Preparar la reacció *mix* de PCR. Per cada reacció:

- * 0,1 µl d'encebador *reverse* a 10 pmols/µl
- * 1 µl de tampó de *Taq Platinum™* (*Gibco BRL*)
- * 0,3 µl de solució MgCl₂ (*Gibco BRL*)
- * 0,1 µl de dNTPs N100 X (*)
- * 0,1 µl de *Taq Platinum™* (*Gibco BRL*) (5 unitats/µl)
- * 7,9 µl d'aigua bidestil.lada

-Un cop acabada la PCR de marcatge, la barrejarem amb la *mix* preparada (0,5 µl de reacció de marcatge i 9,5 µl de *mix* per cada reacció).

-Pipetejar aquests 10 µl a cada pou corresponent de la microplaca on hi ha l'ADN dessecat.

-Fer un *spin*.

-Incubar al termociclador *Perkin Elmer 9700* sota les condicions següents (ajustades), del tipus *touchdown*, és a dir, fent 10 cicles de reducció progressiva de la temperatura d'*annealing* i fent 20 cicles finals a la mateixa temperatura:

Condicions de la PCR:

$$\begin{array}{l}
 2 \text{ minuts de desnaturalització a } 94 \text{ }^\circ\text{C} \\
 + \\
 10 \text{ cicles } \times \left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ segons a } 94 \text{ }^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons d' } \textit{annealing} \text{ a } 65 \text{ }^\circ\text{C (Touchdown fins a } 55 \text{ }^\circ\text{C)} \\ 1 \text{ minut d'extensió a } 72 \text{ }^\circ\text{C} \end{array} \right. \\
 + \\
 20 \text{ cicles } \times \left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ segons a } 94 \text{ }^\circ\text{C} \\ 30 \text{ segons a } 55 \text{ }^\circ\text{C} \\ 1 \text{ minut d'extensió a } 72 \text{ }^\circ\text{C} \end{array} \right. \\
 + \\
 5 \text{ minuts d'extensió final a } 72 \text{ }^\circ\text{C}
 \end{array}$$

5.2 Preparació del gel d'acrilamida

-Rentar bé els vidres i columnes (*BIO-RAD*) on muntarem el gel.

-Assecar bé.

-Llençar 1 ml de *SIGMACOTE* (*Sigma*) sobre un dels vidres i estendre-ho bé. Això evitarà que el gel s'enganxi en els 2 vidres quan el treiem.

-Per preparar un gel gran d'acrilamida al 5 % barrejarem en una probeta:

- 90 ml de solució 0,6 X TBE/ 7 M Urea (*Fisher*)
- 10 ml de *Long Ranger Gel Solution* (*FMC Bioproducts*) (**)
- 200 µl de persulfat sòdic (*Fisher*) al 10 %
- 60 µl de *TEMED* (*Sigma*)

-Barrejar bé per inversió després d'afegir cada reactiu i treure bombolles.

-Abocar la solució lentament a la columna entre 2 vidres fins a omplir-la tota tenint cura que no es formin bombolles i insertar la pinta invertida.

5.3 Càrrega de les mostres i electroforesi

-Omplir la columna amb solució 0,6 M TBE.

-Per tal d'atemperar el gel, es realitza un *pre-run*, connectant la columna a una font d'electroforesi (*Bio-Rad*) a 60 wats durant 30-45 minuts.

-Mentre es fa el *pre-run*, desnaturalitzarem les mostres: afegir 20 µl de tampó de càrrega (***), fer un *spin* i desnaturalitzar durant 5 minuts a 95 ° C (al termociclador) i posar immediatament en gel.

-Aturar la font, treure les bombolles amb una xeringa i insertar la pinta a 1 mm (milímetre) de profunditat.

-Carregar uns 5 µl de cada mostra desnaturalitzada amb una pipeta *Hamilton*, esbandint-la amb el mateix tampó de la columna entre cada sèrie de mostres (de 8 en 8).

-Connectar de nou a la font a 60 wats i deixar córrer aproximadament entre 1,5 i 2 hores, fins que el primer colorant arriba a baix.

5.4 Assecat del gel, exposició i revelat

- Desconnectar la columna de la font.
- Refredar el gel tot passant aigua freda corrent de l'aixeta per l'interior i exterior de la columna.
- Asseparar els vidres de la columna.
- Posar un paper *Whatman 3MM* sobre el gel fins que s'hi adhereixi.
- Embolicar el gel/*Whatman 3MM* amb plàstic.
- Portar a un assecador de gels (*Slab Gel Dryer SGD 4050 Savant*) i deixar-ho durant 1 hora (a uns 70 ° C al buit).
- Exposar un film (*X-OMAT AR 35 x 43 cm Kodak*) al gel amb pantalla intensificadora durant una nit o més i revelar (*Reveladora CURIX 60 Agfa*).

Tampons-reactius utilitzats

(*) Els dNTPs es van preparar prèviament, concretament una solució de 250 µl finals contenint 50 µl de solució mare de cadascun dels 4 a concentració de 50 µM (*Gibco BRL-Life Technologies*) i 50 µl d'aigua autoclavada.

(**) Concentrat d'acrilamida al 50 %

(***) Tampó de càrrega:

- 10 ml d formamida (*Fisher*)
- 10 mg de cianol de xilè (*Fisher*)
- 10 mg de blau de bromofenol (*Fisher*)
- 200 µl d'EDTA (*Boehringer Mannheim*) 0,5 M a pH 8,0

1 X TBE :

6,18 g d' Àcid bòric (*Fisher*)

12,1 g de Tris (*Sigma*)

0,746 g d'EDTA (*Boehringer Mannheim*)

Enrasar fins a 1 litre amb aigua destil.lada

Taula 30: Marcadors utilitzats amb radiactivitat (marcatge amb P³²) de *Research Genetics*

Marcador	Heterozigositat	Rang al.lels
D17S250	0.91	151-169
D17S1851	0.82	237-253
D7S487	0.75	174-188
D7S2527	0.59	111-155
D7S2203	0.36	Al voltant de 233
D7S686	0.76	254-266
D7S1822	0.76	Al voltant de 266
D7S680	0.72	119-131
D7S514	0.72	147-157
D7S635	0.81	216-234
D7S2501	0.71	271-281
D7S504	0.8	145-159
D7S1875	0.8	Al voltant de 81
D7S1529	0.73	Al voltant de 287
D7S530	0.79	106-118
D7S2544	0.76	154-166
D7S2519	0.81	114-132
D7S3054	(¿?)	97-113
ATA103D02 (Cromos. 7)	(¿?)	191-206
D7S2531	0.65	151-175
D7S512	0.72	159-190
D7S640	0.85	114-144
D7S2560	0.86	149-195
D7S684	0.81	169-187

L'anàlisi de *fine mapping* per tal d'acotar la regió candidata al cromosoma 7 i per excloure el cromosoma 17 va incloure els 55 individus dels quals es va extreure ADN. Aquests són, a més dels 15 ja esmentats en l'estudi de marcadors fluorescents i dels 8 cònjuges sans enumerats al principi:

Nº mostra-Posició al pedigrí

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)

6. AMPLIFICACIÓ DEL GEN CANDIDAT (FILAMINA C)

6.1 Reacció PCR per l'anàlisi dels exons:

Per tal d'amplificar els exons i les regions 5' i 3' flanquejants de la forma muscular de la Filamina C (FLNC), es van dur a terme reaccions de PCR utilitzant encebadors d'uns 20 nucleòtids amb temperatures de *melting* (T_m) del voltant de 60 ° C, per la qual cosa es van establir unes condicions standard, variant només segons els casos la temperatura d' *annealing* entre 55 i 59 ° C, en funció de la seva T_m . La T_m es calcula a partir de la fórmula (Suggs 1981):

$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Els encebadors (tant per amplificar exons com per altres regions del gen) es van dissenyar a partir de la seqüència de referència de la Filamina C segons Uhl (2000) (Nº d'accés a GenBank: AF252549) (Veure Taula 31). Les condicions d'amplificació s'han optimitzat depenent del fragment a obtenir i de les característiques dels encebadors (Saiki 1988). Tots els encebadors utilitzats han estat sintetitzats per *Boehringer-Mannheim Roche*. Per cada exó i pacient es realitza un assaig negatiu substituïnt l'ADN per aigua.

En l'estudi dels fragments exònics, la reacció de 50 µl en un microtub és:

- 5 µl d'ADN a 20 ng/µl
- 8 µl de dNTP (*Gibco BRL*) a 1,25 mM
- 5 µl de tampó 10 X (*Gibco BRL*)
- 1,5 µl de MgCl₂ (*Gibco BRL*) (1,5 mM final)
- 5 µl d'encebador *forward* a 2 µM
- 5 µl d'encebador *reverse* a 2 µM
- 20 µl d'aigua bidestil.lada
- 0,5 µl de Taq *Platinum™ Polimerasa* (*Gibco BRL*) (5 unitats/µl)

La reacció té lloc sota el programa del termociclador *PE 9700*:

Condicions de la PCR:

5 minuts de desnaturalització a 94 ° C

+

35 cicles x {

30 segons a 94 ° C

30 segons d'*annealing* entre 55 i 59 ° C

1 minut d'extensió a 72 ° C

}

+

5 minuts d'extensió final a 72 ° C

6.2 Reacció PCR d'obtenció del cADN (ADN complementari) del gen Filamina C

Es va obtenir un fragment de 8,3 Kb (*Long PCR* amb kit de *Takara Biomedicals*) que es va utilitzar en Northern i seqüenciacions:

Reacció de retrotranscripció (20 µl):

- * 3,5 µl d' ARN (al voltant d'un microgram)
- * 2 µl de barreja de dNTPs ja preparats del kit (1mM final)
- * 2 µl de tampó *RNA PCR buffer* 10 X
- * 4 µl MgCl₂ (5mM final)
- * 1 µl de *Random 9mers* del kit (0,125 µM final)
- * 0,5 µl d'inhibidor d' ARNs (1 unitat/µl)
- * 1 µl de Transcriptasa Inversa *Takara* (0,25 unitats/µl)
- * 6 µl d'aigua RNAsa *free*

La reacció té lloc sota el programa del termociclador *PE 9700*:

10 minuts a 30 °C

50 minuts a 42 °C

15 minuts a 70 °C

Un cop finalitzada aquesta reacció procedim a amplificar el cADN específic de la Filamina C, també amb el kit de *Takara Biomedics*, sota la reacció (50 µl):

- 10 µl del producte de la retrotranscripció
- 4 µl de tampó *Long PCR Buffer* 10 X
- 3 µl de MgCl₂ (1,25 mM final)
- 5 µl d'encebador *forward* T3F a 2 pmols/µl (Veure Taula 31)
- 5 µl d'encebador T1R *reverse* a 2 pmols/µl (“ ”)
- 0,25 µl de *Long PCR LA Takara Taq*TM (5 unitats/µl)
- 21,75 µl aigua bidestil.lada

La reacció té lloc sota el programa del termociclador *PE 9700*:

Condicions de la PCR:

2 minuts de desnaturalització a 94 °C
+
35 cicles x { 30 segons de desnaturalització a 98 °C
11 minuts d'*annealing*/extensió a 68 °C
+
10 minuts d'extensió final a 72 °C

Els productes de la reacció de PCR es corren en un gel d'agarosa (*Bio Rad*) a l'1 % amb tampó 1 X TAE (Tris-Acetate-EDTA), es visualitzen a un transil.luminador (*Vilber Lourmat*) gràcies al Bromur d'Etidi (*Gibco BRL Life Technologies*) (3 µl de solució 500 µg/ml per cada 50 ml de gel) incorporat al gel i si s'obté la banda del tamany esperat única es procedeix a purificar els productes i a seqüenciar.

Tampons-reactius utilitzats:

Tampó 1 X TAE:

4,845 g Tris (*Sigma*)
1,64 g NaAc (*Merck*)
0,372 g EDTA (*Boehringer Mannheim*)

Enrasar fins a 1 litre amb aigua destil.lada

Taula 31: Encebadors utilitzats per amplificar el gen de la Filamina (FLNC).

Exó	Encebadors	T ^a annealing	Tamany producte (pb)
1	1F: 5'-AGAAGTTGGAGAGGAGAGCA-3' 1R: 5'-GCCAGGTCTTCTCTCTATA-3'	59	614
2	2F: 5'-AGGTAGGCAGAGACTAGAGG-3' 2R: 5'-TAAGGGCTCCATGCTGTGCT-3'	55	410
3-4	3F: 5'-TTGGGTGAACAAATGCCCTG-3' 3R: 5'-TCAGGGAGAGCCTACATGTG-3'	57	520
5-6	4F: 5'-CACATGTAGGCTCTCCCTGA-3' 4R: 5'-GAACCAAGGATGTGAAGAGC-3'	55	527
7-8	5F: 5'-TGCTCTCCCCTAGAAGCTAA-3' 5R: 5'-AAGCCTCTGGCTTTGGTAAG-3'	57	629
9	6F: 5'-GGTTAGAAGGACTGGCACA-3' 6R: 5'-AATGAGCCTGAGATTCTGGG-3'	55	368
10-11	7F: 5'-GAGCTGGGACTTCAAGGATA-3' 7R: 5'-CATGCGCACTGCACCCATTA-3'	55	565
12-13	8F: 5'-TAATGGGTGCAGTGCGCATG-3' 8R: 5'-TAGTAAGGGCAGCAGAGACT-3'	55	567
14-16	9F: 5'-AGAGGCCACAGCTATGAACT-3' 9R: 5'-AGGTGCATGTGCGCTGTGAGT-3'	57	802
17-18	10F: 5'-AGCATCTAGCTGAGAGCAGG-3' 10R: 5'-AGAACTGGTCCCATGGGACT-3'	55	499
19-20	11F: 5'-AGTCCCATGGGACCAGTTCT-3' 11R: 5'-CTATCTTCCCAACAAGTCCC-3'	55	678
21	12F: 5'-TTGGAGGTGATGAGTTGGGT-3' 12R: 5'-TCCAGCTCTCAGCTCTTCTT-3'	55	785
22-23	13F: 5'-AGAGGGAGCATCTGTGTGAA-3' 13R: 5'-AGCTGAGGAGAAACGAGCTA-3'	55	711
24	14F: 5'-CCATTCAGCTACTCCCTCAT-3' 14R: 5'-CTCTAGGCTGTCCTCTCTAT-3'	55	348
25-26	15F: 5'-TCCCTGTGGGCATTTCAAAG-3' 15R: 5'-AGGAAAGCCTCACAGCAGAGA-3'	55	654

Exó	Encebadors	T ^a annealing	Tamany producte (pb)
27-28	16F: 5'-TGGCTCAAGATGAGATCACC-3' 16R: 5'-AAGAGAGAAGAGTGTGAGGC-3'	57	690
29-30	17F: 5'-GCCTCACACTCTTCTCTCTT-3' 17R: 5'-TTATCTGGGATCCCTGCTGCT-3'	55	502
31	18F: 5'-ATTCTCTGAGTCAGCCCCTA-3' 18R: 5'-CTGCAGAGGAGTAGAGAGAA-3'	55	240
32	19F: 5'-CATAGCATGGGTCAAACCTCC-3' 19R: 5'-ACTTCCTCTCTCTGGGCCTTT-3'	55	268
33	20F: 5'-AAAGGCCCAGAGAGAGGAAGT-3' 20R: 5'-ACACAGCGGGTGCTCAATAA-3'	55	483
34-35	21F: 5'-GCTCAGATAATCCCTGATGC-3' 21R: 5'-CCCTAATGTCACGAGTGACT-3'	55	552
36-37	22F: 5'-TGGAGTCATAGCAGCCTGAT-3' 22R: 5'-GACTGGTCAGGAAGTTTCAG-3'	55	598
38-39	23F: 5'-GAGAGGAAAGCATTGTGGCT-3' 23R: 5'-CATCTGGAACCAGTTTCCTG-3'	55	588
40	24F: 5'-CTGTGACCTCAACCTCAAGA-3' 24R: 5'-CCCATCAGTTAAACCTCCTC-3'	55	538
41-42	25F: 5'-GAGGAGGTTTAACTGATGGG-3' 25R: 5'-TTATCCCAGGAAAGGCTCTG-3'	59	796
43	26F: 5'-CAGAGCCTTTCCTGGGATAA-3' 26R: 5'-TCCTGCCCATCTCTCAGATA-3'	55	262
44-45	27F: 5'-CTTCAGAGAAGACTGCTCCA-3' 27R: 5'-AGCAAAGCAGCACCAGACTA-3'	55	540
46	28F: 5'-TAGTCTGGTGCTGCTTTGCT-3' 28R: 5'-ACTATGGCCTAGATGTGCGT-3'	55	451
47 i 3'UTR	29F: 5': TTCTGACTAGGTTTGTGCCC-3' 29R: 5': CAGGTGTTTGTAGTGTCTGA-3'	57	677

Fragment	Encebadors	T ^a annealing	Tamany producte (Kb o pb)
cDNA	T3F: 5'-AGTTGGAGAGGAGAGCAGCG-3' T1R: 5'-GGCTGGGCCTTCACTTCACC-3'	68	8,3 Kb
5'utr	F1pro: 5'-TACTCCTGGGCCTCTGGATT-3' R1pro: 5'-CTAGTTGGTGGCAGGCTGTT-3'	55	252 pb
5'utr	F2pro: 5'-CCCTGTCCACAGGTGGACAA-3' R2pro: 5'-TCCACACCCAACACACCAAA-3'	57	216 pb
5'utr	F3pro: 5'-CTGGCCTCAGTTTCCCCATT-3' R3pro: 5'-GGGGCGGGGGTTTAAGAAG-3'	59	346 pb
5'utr	F4pro: 5'-AACAGCCTGCCACCAACTAC-3' R4pro: 5'-CTGAGTAGCCGCTGTTGTTTC-3'	57	680 pb
North	F24F: 5'-CTGTGACCTCAACCTCAAGA-3' F00-2: 5'-AGCCATCTTTGCGATCCTCA-3'	55	647 pb
South	F28F: 5'-TAGTCTGGTGCTGCTTTGCT-3' T1R: 5'-GGCTGGGCCTTCACTTCACC-3'	58	1,7 Kb
Regió repeats	8Fbis: 5'-AGGTGCTGATCCACAACAAC-3' 8Rbis: 5'-GTTGACGTCATAGTCTCCAG-3'	55	659 pb

7. PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR

Per tal d'eliminar les restes de reactius de la PCR que podrien interferir en les seqüenciacions es va utilitzar el kit de purificació *QUIAquick™* de *Qiagen*:

- Afegir 200 µl de tampó PB al volum de producte de PCR (per fer que l'ADN quedi lligat a la resina de la columna).
- Pipetejar la barreja a una columna de purificació adaptada a un tub tipus *Eppendorf*.
- Centrifugar durant 2 minuts a 13500 g.
- Llençar l'eluit.
- Afegir 750 µl de tampó de rentat.
- Centrifugar com abans i llençar l'eluit.
- Repetir el pas de rentat.
- Posar la columna a un tub tipus *Eppendorf* net i pipetejar 50 µl d'aigua autoclavada (o menys si la banda obtinguda a la PCR és poc intensa).
- Centrifugar com abans i ja tenim la solució purificada.
- Resoldre els purificats en un gel d'agarosa a l'1 %.

8. REACCIÓ PCR DE SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA

Es va utilitzar el kit *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems).

A un tub pipetegem :

-5 µl del purificat

-1 µl d'encebador usat en la PCR inicial (*forward* en una reacció i *reverse* en altre reacció per confirmar) a concentració 2 µM

-4 µl de *mix Big dye™ Terminator* (PE Applied Biosystems).

Incubar al termociclador *Perkin Elmer 9700*:

Condicions de la PCR:

3 minuts de desnaturalització a 94 °C

+

25 cicles x $\left\{ \begin{array}{l} 10 \text{ segons de desnaturalització a } 96 \text{ °C} \\ 5 \text{ segons d'annealing segons } T_m \text{ de l'encebador (1)} \\ 4 \text{ minuts d'extensió a } 60 \text{ °C} \end{array} \right.$

(1) Temperatura aproximada resultant de restar 5 graus a la temperatura de *melting* (T_m) de l'encebador i el més propera possible a la utilitzada en la PCR d'amplificació.

9. PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE SEQÜENCIACIÓ

Per tal d'eliminar pics terminadors es van processar els productes de PCR passant-los per columnes de purificació.

- Centrifugar les columnes de purificació (*Edge Biosystems*) 2 minuts a 720 g i llençar l'eluit.
- Posar la columna a un tub tipus *Eppendorf* nou.
- Pipetejar tot el producte.
- Tornar a centrifugar 2 minuts a 720 g.

10. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA I INJECCIÓ AL SEQÜENCIADOR

-Pipetejar a un microtub 12 µl de *Terminator Suppressor Reagent (TSR)* (PE Applied Biosystems).

-En el mateix tub pipetejar 8 µl del purificat de producte de seqüenciació.

-Desnaturalitzar incubant 2 minuts i mig a 95 °C (a termociclador).

-Posar ràpidament en gel i deixar-ho uns minuts.

-Posar el tub al seu *rack* del seqüenciador *ABI PRISM™ 310* (PE Applied Biosystems) per tal que sigui injectada i analitzada la mostra.

11. SOUTHERN BLOT (Estudi d'expansió de repeticions de la Filamina C)

Per tal de poder esbrinar si existia una expansió de repeticions (present en diferents entitats neurodegeneratives com la Distròfia miotònica congènita i la oculofaríngea i en relació, en alguns casos, amb el fenomen de l'anticipació, podent afectar al processament, estabilitat i vida mitja de l'ARN) (Harley 1992, Speer 1998a, Lindblad 1994, Nielsen 1997, Imbert 1996, Martorell 1997, Sanpei 1996, Ross 1995, Wilson 1999, Lieberman 2000, Muller 2001) es va procedir a hibridar l' ADN genòmic en la regió 3' del gen de la Filamina C (al final del fragment 29 de PCR, després de l'exó 48) on es troba una seqüència AC repetida 11 vegades amb una sonda generada per PCR, un cop digerit l'ADN [de l'individu control nº 43 (III-17) i de l'individu afecte nº 34 (III-8)] amb 2 enzims de restricció que tenien que donar lloc, en cas de normalitat, a fragments d'unes 1,9 Kilobases. Es van seguir les condicions generals segons Southern (1975 i 1979) i Sambrook (1989).

11.1 Preparació de la sonda:

Utilitzant els encebadors F28-F i T1R (ja utilitzats per amplificar l'exó 46 i el cADN, respectivament, que han de donar un producte de unes 1,7 Kb) (Veure Taula 31), es va preparar en un microtub la reacció de PCR de 50 µl:

- 5 µl d'ADN a 20 ng/µl
- 8 µl de dNTP (*Gibco BRL*) a 1,25 mM
- 5 µl de tampó 10 X (*Gibco BRL*)
- 1,5 µl de MgCl₂ (*Gibco BRL*) (1,5 mM final)
- 5 µl d'encebador *forward* a 2 µM
- 5 µl d'encebador *reverse* a 2 µM
- 20 µl d'aigua bidestil.lada
- 0,5 µl de Taq *Platinum™ Polimerasa* (*Gibco BRL*) (5 unitats/µl)

Incubar al termociclador *PE 9700*:

Condicions de la PCR:

$$\begin{array}{c}
 5 \text{ minuts de desnaturalització a } 94 \text{ }^{\circ}\text{C} \\
 + \\
 40 \text{ cicles x } \left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ segons de desnaturalització a } 94 \text{ }^{\circ}\text{C} \\ 30 \text{ segons d'annealing a } 58 \text{ }^{\circ}\text{C} \\ 2 \text{ minuts d'extensió a } 72 \text{ }^{\circ}\text{C} \end{array} \right. \\
 + \\
 5 \text{ minuts d'extensió final a } 72 \text{ }^{\circ}\text{C}
 \end{array}$$

11.2 Purificació de la banda del producte a utilitzar com a sonda

Un cop retallada la banda d'interès (unes 1,7 Kb) d'un gel d'agarosa al 2% on es va resoldre el producte de PCR es va purificar utilitzant el kit *QIAEX® II Agarose Gel Extraction* de *Qiagen* tot seguint el protocol recomanat:

-Barrejar, en un tub tipus *Eppendorf*, el fragment retallat amb 750 µl de tampó *QXI* per solubilitzar l'agarosa.

-Afegir 30 µl de reactiu *QIAEX® II* (per fixar l'ADN)

-Incubar 10 minuts a 50 °C (Bloc tèrmic *Tembloc-Selecta*), tot vortexant cada 2 minuts.

-Centrifugar durant 30 segons a 13500 g.

-Rentar el *pellet* amb 500 µl de tampó *QXI* un cop eliminat el sobrenadant.

-Centrifugar durant 30 segons a 13500 g.

-Rentar 2 cops amb tampó *PE* centrifugant com a les passes anteriors.

-Assecar el *pellet* a l'aire lliure durant 2 minuts.

-Resuspendre el *pellet* amb 20 µl d'aigua bidestil.lada.

11.3 Tractament de l'ADN amb enzims de restricció

-Utilitzant els enzims *Nae I* i *Nco I* (*New England Biolabs*), preparar la reacció de 30 µl següent:

<u>Nae I</u>	<u>Nco I</u>
20 µl de solució d'ADN (10 µg)	20 µl de solució d'ADN (10 µg)
3 µl de tampó 1 de l'enzim	3 µl de tampó 4 de l'enzim
2 µl d'enzim (10 u/µl)	2 µl d'enzim (10 u/µl)
1 µl d' ARNsa A (1 u/µl) (<i>Gibco</i>)	1 µl d' ARNsa A (1 u/µl) (<i>Gibco</i>)
4 µl d'aigua bidestil.lada	4 µl d'aigua bidestil.lada

-Incubar la reacció a bany (*B Braun*) a 37 °C durant tota la nit.

-Inactivar la reacció incubant 20 minuts a 65 °C (bany).

Tampó 1 : Bis Tris Propan HCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 10 mM pH 7,0

Tampó 4 : Acetat potàssic 500 mM, Tris acetat 200 mM, Acetat de Magnesi 100 mM, DTT 10 mM pH 7,9

11.4 Electroforesi, tractament del gel i transferència

-Carregar tot el volum de la reacció de restricció a un gel d'agarosa a l'1 %.

-Aplicar voltatge (120 V) durant unes 4 hores.

-Depurar incubant el gel en HCl (*Fisher*) 0,25 M (uns 200 ml) en una safata de vidre en agitació suau (a *shaker Gyro Rocker Bibby*) durant 15 minuts.

-Desnaturalitzar incubant el gel en NaOH (*Fisher*) 0,5 N, NaCl (*Merck*) 1M (uns 200 ml) en safata durant 30 minuts.

-Neutralitzar incubant el gel amb Tris-HCl (*Sigma*) 0,5 M a pH 7,4 , NaCl 3M (uns 200 ml) en safata durant 30 minuts.

-Muntar la transferència:

* A una safata de vidre, omplir amb solució 10 X SSC.

* Posar un vidre atravessat.

* Posar una peça de paper *Whatman 3MM* al llarg de tot el vidre submergint-lo pels extrems en la solució 10 X SSC.

* Treure les bombolles amb una pipeta llarga de plàstic.

* Posar el gel sobre el paper *Whatman 3MM*.

* Tallar una peça de membrana de *nylon (Zeta-Probe® BIO-RAD)* de la mateixa mida que el gel i posar-la a sobre el gel.

* Treure les bombolles com abans.

- * Posar per sobre 4 peces de paper *Whatman 3MM* del tamany del gel.
- * Posar per sobre un bloc de tovallons absorbents també del tamany del gel.
- * Posar un vidre i un pes a sobre de tot.
- * Deixar transferir tota la nit.
- * Rentar la membrana en una safata amb 2 X SSC durant uns minuts i assecar-la a 80 °C en un forn de buit durant 30 minuts.

11.5 Marcatge de la sonda amb [α P³²-dATP]

Es va utilitzar el *Random Primed DNA Labeling Kit* de *Roche* tot seguint el protocol recomanat. Es sintetitza una cadena complementària a partir d'un encebador en forma d'hexàmers *random* des de l'extrem 3' incorporant-se en ella els nucleòtids de la reacció, entre ells el marcat (Feinberg 1983).

-En un microtub, pipetejar 2 μ l del producte purificat de la PCR i 7 μ l d'aigua bidestil·lada i desnaturalitzar incubant 10 minuts a 98 °C (a termociclador) i després posar en gel.

-En el mateix tub, pipetejar:

- * 1 μ l de dCTP (a 0,5 mM)
- * 1 μ l de dGTP (a 0,5 mM)
- * 1 μ l de dTTP (a 0,5 mM)
- * 2 μ l de barreja d'hexàmers (concentració no indicada)
- * 5 μ l de [α P³²] dATP (a 3000 Ci/mmol) (*NEN*)
- * 1 μ l d'enzim *Klenow* (a 2 u/ μ l)

-Incubar 30 minuts en bany a 37 °C

-Aturar la reacció incubant 10 minuts en bany a 65 °C

11.6 Purificació i valoració del marcatge de la sonda

Per tal de purificar la sonda marcada, eliminant els nucleòtids no incorporats en la reacció de marcatge, es va utilitzar la columna *ProbeQuant G-50* d' *Amersham Pharmacia Biotech* tot seguint el protocol recomanat:

- Afegir al tub de la sonda 30 µl de tampó STE 150 mM: 0,438 g de NaCl en 40 ml de tampó TE (Tris-HCl 10 mM a pH 8,0 i EDTA 1mM) i portant a 50 ml amb aigua bidestil.lada.
- Resuspendre la resina de la columna vortexant.
- Afluixar el tap i trencar la base de la columna.
- Acoblar la columna a un tub de 1,5 ml.
- Centrifugar a 720 g durant 1 minut (centrífuga *Eppendorf*).
- Acoblar la columna a un nou tub de 1,5 ml.
- Pipetejar lentament els 50 µl de la sonda-STE en el centre de la resina.
- Centrifugar a 720 g durant 2 minuts.
- Mesurar les contes d' 1 µl de la sonda purificada en líquid de centelleig (comptador *Beckman*). Un bon marcatge ha de proporcionar suficient senyal com per poder tenir 10⁶ cpm (contes per minut)/ml de solució d'hibridació (Sambrook 1989).

11.7 Pre-hibridació i hibridació

- Desnaturalitzar la sonda incubant el microtub a 98 °C durant 10 minuts (al termociclador) i posar de seguida en gel.
- Pre-escalfar la solució d'hibridació [Na₂HPO₄ (*Fisher*) 0,5 M a pH 7,2 i 7 % d'SDS (*Sigma*)] en el forn d'hibridació (*Hybaid*TM) durant 30 minuts a 65 °C.
- Humitejar una mica la membrana amb aigua destil.lada i introduir-la al tub d'hibridació amb uns 10-15 ml de solució d'hibridació.
- Incubar amb rotació durant 5 minuts a 65 °C.
- Buidar el tub i re-omplir-lo amb 10-15 ml de solució d'hibridació amb la sonda marcada (aproximadament 10⁶ cpm/ ml).
- Incubar amb rotació a 65 °C durant tota la nit.

11.8 Rentats, exposició i revelat

- Treure la solució d'hibridació del tub i afegir-hi 25 ml de solució de rentat 1 (Na₂HPO₄ 40 mM a pH 7,2 i 5 % d'SDS) pre-escalfada a 65°C.
- Incubar amb rotació a 65°C durant 30 minuts.
- Repetir un cop el rentat.

- Tornar a fer 2 rentats també de 30 minuts a 65°C amb 25 ml de solució de rentat 2 (Na_2HPO_4 40 mM a pH 7,2 i 1 % d'SDS).
- Treure la membrana del tub d'hibridació i embolicar-la en plàstic segellat.
- Exposar un film (*X-OMAT AR 35 x 43 cm Kodak*) a la membrana amb pantalla intensificadora durant una nit o més i revelar.

Tampons-reactius utilitzats:

Solució 20 X SSC :

175 g de NaCl (*Merck*) (3M)

88,2 g de Citrat Trisòdic (*Merck*) (0,3M)

800 ml d'aigua bidestil.lada

ajustar el pH a 7 i enrasar a 1 litre amb aigua bidestil.lada

12. NORTHERN BLOT

Per tal de poder saber si el nivell d'expressió de la Filamina C es trobava alterat en individus afectes respecte dels sans, es va procedir a hibridar l'ARN total amb una sonda de cADN. A més, com a control de normalització es va hibridar el mateix filtre amb una sonda de ciclofilina A. 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. Es van seguir les condicions generals similars a les del *Southern Blot* (Southern 1975, Sambrook 1989).

12.1 Preparació de les sondes

Per obtenir la sonda de la Filamina C es va preparar en un microtub una reacció de PCR de 50 µl, utilitzant els encebadors 24F i F00-2 (Veure Taula 31) que havien de generar un producte de 647 pb a partir del motllo de cADN :

- 5 µl de cADN
- 8 µl de dNTP (*Gibco BRL*) a 1,25 mM
- 5 µl de tampó 10 X (*Gibco BRL*)
- 1,5 µl de MgCl₂ (*Gibco BRL*) (1,5 mM final)
- 5 µl d'encebador *forward* a 2 µM
- 5 µl d'encebador *reverse* a 2 µM
- 20 µl d'aigua bidestil.lada
- 0,5 µl de Taq *Platinum™ Polimerasa* (*Gibco BRL*) (5 u/µl)

Incubar al termociclador *PE 9700*: Condicions de la PCR:

5 minuts de desnaturalització a 94 °C
+
40 cicles x {
30 segons de desnaturalització a 94 °C
30 segons d'*annealing* a 55 °C
1 minut d'extensió a 72 °C
+
5 minuts d'extensió final a 72 °C

Per obtenir la sonda de la ciclofilina A es va procedir a fer una retrotranscripció (RT) i PCR en una mateixa reacció utilitzant el kit *SuperScript™ One-Step* de *GibcoBRL-Life Technologies*, tot utilitzant uns encebadors que donaven un producte de 663 pb (hCypaF: 5'-ATGGTCAACCCCACCGTG-3' i hCypaR: 5'-TGCAATCCAGCTAGGCATG-3'). En un microtub pipetejar:

- 250 ng d'ARN
- 25 µl de *mix* del kit que inclou el tampó, el Mg i els dNTP
- 1 µl d'encebador *forward* a 10 µM
- 1 µl d'encebador *reverse* a 10 µM
- 1 µl de *Taq RT* polimerasa
- H₂O DEPC fins a 50 µl

Incubar al termociclador *PE 9700*:

Condicions RT-PCR:

30 minuts a 48 °C (retrotranscripció)
+
2 minuts de desnaturalització a 94 °C
+
35 cicles x $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ segons de desnaturalització a } 94 \text{ °C} \\ 30 \text{ segons d'annealing a } 55 \text{ °C} \\ 1 \text{ minut d'extensió a } 68 \text{ °C} \end{array} \right.$
+
7 minuts d'extensió final a 72 °C

12.2 Purificació de les sondes

Es va procedir tal com s'indica a l'apartat 7.

12.3 Marcatge de les sondes amb [α P³²] dATP, purificació i valoració del marcatge

Es va procedir de la mateixa forma que amb la sonda del *Southern Blot* (apartats 11.5 i 11.6).

12.4 Electroforesi, tractament del gel i transferència

-Preparar un gel a l'1 % d'agarosa tot bullint inicialment 233 ml d'aigua DEPC amb 3 g d'agarosa (*BIO-RAD*).

-Un cop refredat una mica afegir 15 ml de tampó 20 X MOPS (àcid 3-[N-morfolino]propan sulfònic) (*Sigma*) i 52,5 ml de Formaldehid al 35 % (*Sigma*).

-Preparar el tampó de càrrega per desnaturalitzar:

-20 μ l de formamida (*Sigma*)

-7 μ l de formaldehid al 35 % (*Sigma*)

-2 μ l de 20 X MOPS.

-2 μ l de Blau de Bromofenol (*Fisher*)

-Barrejar els 31 μ l del tampó de càrrega amb 9 μ l d'ARN (uns 15 μ g).

-Incubar a 65 °C (a termociclador o a bany) durant 10 minuts.

-Posar en gel.

-Afegir 1 μ l de Bromur d'Etidi a 500 μ g/ml.

-Carregar tot el volum al gel.

-Córrer el gel en tampó 1 X MOPS fins que el Blau de Bromofenol (*Fisher*) del tampó de càrrega hagi avançat uns 8 cm.

-Rentar el gel en safata amb prou volum d'aigua DEPC durant 30 minuts 2 vegades.

-Fixar el gel en prou volum de 20 X SSC durant 15 minuts 2 vegades.

-Mullar la membrana de *nylon* (*Z-Probe*® *Bio Rad*)(del tamany del gel) amb aigua DEPC i després en 20 X SSC.

-Girar el gel i muntar la transferència de la mateixa forma que es va fer en el *Southern Blot* (apartat 11.4) però posant 20 X SSC a la safata (deixar transferir tota la nit).

-Rentar la membrana breument en safata amb 6 X SSC.

-Fixar la membrana amb llum ultraviolada (*UV Stratalinker-Stratagene*) 2 vegades de cara i una del revés (i minut cada cop).

12.5 Pre-hibridació i hibridació

-Desnaturalitzar la sonda incubant el microtub a 98 °C durant 10 minuts (al termociclador) i posar de seguida en gel.

-Pre-escalfar la solució d'hibridació (50 % de formamida (*Sigma*), Na₂HPO₄ 0,12 M a pH 7, NaCl 0,25 M y 7 % d'SDS) al forn d'hibridació (*Hybaid™*) durant 30 minuts a 43 °C.

-Humitejar una mica la membrana de *nylon* amb aigua DEPC i introduir-la al tub d'hibridació amb uns 10-15 ml de solució d'hibridació.

-Incubar amb rotació durant 5 minuts a 43 °C.

-Buidar el tub i re-omplir-lo amb 10-15 ml de solució d'hibridació amb la sonda marcada (aproximadament 10⁶ cpm/ml).

-Incubar amb rotació a 43 °C durant tota la nit.

12.6 Rentats, exposició i revelat

-Rentar suaument la membrana amb 2 X SSC en safata.

-Fer 3 rentats de 15 minuts en safata amb les solucions:

2 X SSC/0.1 % SDS

0,5 X SSC/0.1 % SDS

0,1 X SSC/0.1 % SDS

-Embolcar la membrana en plàstic segellat.

-Exposar un film (*X-OMAT AR 35 x 43 cm Kodak*) a la membrana amb pantalla intensificadora durant una nit o més i revelar.

Tampons-reactius utilitzats

20 X MOPS: Barrejar 83,6 g de MOPS amb 800 ml d'aigua DEPC, ajustar el pH a 7.0 i enrasar fins a 1 litre amb aigua DEPC.

13. CLONATGE DE BANDES DIFERENCIALS DE LA FILAMINA C

Es va procedir a amplificar el cADN de la Filamina C entre els exons 21 i 24, tot tractant d'esbrinar si podia existir un canvi en la seqüència nucleotídica a partir d'una mutació tipus *splicing*, doncs tot observant la seqüència del genòmic, hi han certes zones intròniques repetitives de G i C susceptibles de patir expansions o reduccions i que podrien afectar l' *splicing*. Es va amplificar a partir de cADN d'un múscul control extern a la família i múscul de l'individu afecte 31 (V-1).

13.1 Amplificació de la regió d'interès i purificació

Així, es va fer una amplificació utilitzant els encebadors 8Fbis i 8Rbis (Veure Taula 31), obtenint-se un producte de 659 bp en la reacció de 50 µl:

- 5 µl de cADN
- 8 µl de dNTP (*Gibco BRL*) a 1,25 mM
- 5 µl de tampó 10 X (*Gibco BRL*)
- 1,5 µl de MgCl₂ (*Gibco BRL*) (1,5 mM final)
- 5 µl d'encebador *forward* a 2 µM
- 5 µl d'encebador *reverse* a 2 µM
- 20 µl d'aigua bidestil.lada
- 0,5 µl de Taq *Platinum™ Polimerasa* (*Gibco BRL*) (5 unitats/µl)

Un cop resolt el producte de PCR en un gel d'agarosa, es va procedir a retallar les diferents bandes obtingudes (l'esperada a individu sà i afecte i una més petita a l'individu afecte), tot purificant-les segons el protocol ja detallat en l'apartat 11.2.

Un cop purificades les bandes d'interès, es va procedir a fer un clonatge per poder fer una posterior seqüenciació, utilitzant el vector plasmídic *pCR® 2.1-TOPO®* (*Invitrogen*), que conté resistència a ampicilina, essent el lloc d'inscripció el gen lac Z, tot seguint el protocol *TA Cloning®* (*Invitrogen*). El fonament es basa en el fet que la Taq polimerasa té una activitat transferasa terminal que afegeix una deoxiadenosina (A) als extrems 3' dels productes de PCR. El vector linealitzat utilitzat conté residus de deoxitimina (T) a l'extrem 3'. Això permet als inserts lligar-se eficientment amb el

vector. En el cas que es produeixi la inserció s'obtidran colònies blanques a partir del cultiu bacterià, crescut en medi selectiu amb ampicilina, mentre que quan no es produeixi inserció les colònies obtingudes seran blaves com a conseqüència del producte del gen lac Z intacte, a partir del substrat a utilitzar per la β -galactosidasa. Flanquejant la zona d'inserció hi trobem les seqüències M13, utilitzades com a encebadors per tal d'amplificar l'insert (Sambrook 1989, Ausubel 1994).

13.2 Reacció de lligació

-En un microtub barrejar:

- 1 μ l de producte de PCR (banda retallada) purificat
- 1 μ l de Solució Salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M)
- 3 μ l d'aigua estèril
- 1 μ l de vector *pCR® 2.1-TOPO®* (Invitrogen)

-Incubar 5 minuts a temperatura ambient i posar en gel.

13.3 Transformació

Es va seguir el procediment de xoc tèrmic de cèl.lules bacterianes competents disponibles comercialment (Sambrook 1989).

-Descongular en fred un vial de cèl.lules competents *TOP 10* (Invitrogen) i portar a temperatura ambient el medi SOC (*Gibco BRL-Life Technologies*) que afegirem a les cèl.lules.

-Pipetejar 2 μ l de la reacció de lligació en el tub de cèl.lules competents.

-Incubar 30 minuts en gel.

-Fer un xoc tèrmic incubant 30 segons a 42 °C (bany *B Braun*) i després posar en gel.

-Afegir 250 μ l de medi SOC i incubar 1 hora a un agitador (*Adolph Kuhner AG*) a 37 °C.

-Uns 20 minuts abans de sembrar les cèl.lules, sembrar 40 μ l d' *X-Gal* (*Sigma*) (substrat de la β -galactosidasa) a una placa amb medi LB amb ampicilina.

-Un cop passada l'hora, sembrar 150 μ l de les cèl.lules transformades en la placa i incubar durant tota la nit a estufa (*Memmert*) a 37 °C.

13.4 Cultiu bacterià

-Picar amb una punta estèril el màxim nombre de colònies blanques possibles (les que tenen l'insert) i una de blava (sense insert, que ens servirà de control), tot introduint cadascuna de les puntes en un tub *Sterilin* de 30 ml amb 2 ml de medi LB amb ampicilina.

-Incubar unes 3-4 hores a l'agitador orbital a 37 °C.

13.5 Obtenció de l'ADN bacterià

-Pipetejar en un tub tipus *Eppendorf* 25 µl del cultiu i centrifugar durant 30 segons a 15000 g en una microcentrífuga (*Sigma*).

-Treure el sobrenadant amb pipeta.

-Afegir 25 µl d'aigua autoclavada, foradar els tubs i bullir durant 10 minuts a bloc tèrmic (*Tembloc Selecta*).

-Centrifugar durant 5 minuts a 15000 g.

-Utilitzar el sobrenadant per fer una PCR de control.

13.6 PCR de control

Per tal de comprovar que tenim insert i referenciar-lo en tamany a la banda que ens doni la colònia blava sense insert es fa una reacció de PCR:

-En un microtub, preparar la reacció de 25 µl:

- 5 µl del DNA del bacteri
- 0,5 µl de dNTP (*Ecogen*) a 10 mM
- 2,5 µl de tampó 10 X (*Roche*)
- 1,6 µl de MgCl₂ (*Roche*) (1,6 mM final)
- 1 µl d'encebador M13 *forward* a 5 µM
- 1 µl d'encebador M13 *reverse* a 5 µM
- 13,2 µl d'aigua bidestil·lada
- 0,2 µl de *Fast Start Taq Polimerasa* (*Roche*) (5 u/µl)

-Incubar al termociclador *PE 9700*:

Condicions de la PCR:

5 minuts de desnaturalització a 94 °C

+

30 cicles x {

1 minut de desnaturalització a 94 °C

1 minut d'*annealing* a 50 °C

1 minut d'extensió a 72 °C

}

+

10 minuts d'extensió final a 72 °C

-Córrer el producte de PCR en un gel d'agarosa a l'1 %.

-Seleccionar les colònies que hagin donat bandes de tamany diferent.

13.7 Mini-preparació de l'ADN plasmídic (Miniprep)

-En els tubs *Sterilin* corresponents als clons seleccionats de bandes de diferent tamany, afegir 4 ml de medi LB-ampicilina i incubar al *shaker* a 37°C durant tota la nit.

-Extraure l'ADN plasmídic del cultiu utilitzant el kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* de *Promega*, tot seguint el protocol recomanat amb lisi alcalina:

- Centrifugar 5 ml de cultiu a 1900 g (*Sorvall*) durant 5 minuts
- Llençar el sobrenadant i resuspendre el *pellet* amb 250 µl de Solució de Resuspensió de cèl.lules del kit en un tub *Eppendorf*.
- Afegir 250 µl de Solució de lisi del kit i invertir 4 cops per barrejar
- Afegir 10 µl de Solució de proteasa alcalina del kit, invertir 4 cops per barrejar i incubar 5 minuts a temperatura ambient
- Afegir 350 µl de Solució de neutralització del kit i invertir 4 cops per barrejar
- Centrifugar a 15000 g (centrífuga *Sigma*) durant 10 minuts a temperatura ambient
- Decantar el sobrenadant en una columna de purificació del kit adaptada a un tub de recollida

- Centrifugar a 15000 g durant 1 minut a temperatura ambient i llençar el sobrenadant
- Afegir 750 µl de Solució de rentat del kit i tornar a centrifugar a 15000 g durant 1 minut a temperatura ambient i llençar el sobrenadant
- Repetir el rentat amb 250 µl de Solució de rentat i centrifugar a 15000 g durant 2 minuts a temperatura ambient
- Passar la columna a un tub tipus *Eppendorf* i pipetejar 100 µl d'aigua nucleasa *free* del kit i centrifugar a 15000 g durant 1 minut a temperatura ambient
- Mesurar l'absorbància a 260 nm i calcular la concentració
- Còrrer una part del purificat en un gel d'agarosa a l'1 % per tal de comprovar la qualitat de l'ADN

Solucions utilitzades del kit:

-Solució de Resuspensió: Tris-HCl 50mM (pH = 7,5); EDTA 10 mM; ARNsa A 100 µg/ml.

-Solució de lisi: NaOH 0,2 M i 1 % SDS

-Solució de Neutralització: Clorur de guanidina 4,09 M; Acetat potàssic 0,579 M; Àcid acètic glacial 2,12 M; pH = 4,2.

-Solució de Rentat: Acetat potàssic 60 mM; Tris-HCl 8,3 mM (pH = 7,5); EDTA 40 µM (pH = 8,0); 60 % etanol.

13.8 PCR de Seqüenciació

-Un cop obtingut l'ADN plasmídic es prepara la reacció de seqüenciació de 20 µl:

- Els µl d'ADN necessaris per tenir 900 ng
- 4 µl de reactiu *Big Dye™ Terminator (Applied Biosystems)*
- 1 µl d'encebador M13 (*forward* en una reacció i *reverse* en altre reacció per confirmar) (seqüència del vector flanquejant a l'insert) a 5 µM
- Aigua bidestil.ladafins a 20 µl

- Incubar al termociclador *PE 9700* sota les condicions standard ja esmentades i purificar i injectar a l'autoanalitzador *ABI PRISM™ 310* (*Applied Biosystems*) també sota les condicions esmentades als apartats 8, 9 i 10.

Tampons-reactius utilitzats:

El vector d'ADN plasmídic a concentració 10 ng/μl està suspès en:

- Glicerol al 50 %
- Tris HCl 50 mM a pH 7,4
- EDTA 1 mM
- DTT 1 mM
- Triton X-100 al 0.1 %
- BSA a 100 μg/ml
- Vermell de fenol

El medi SOC conté:

- Tryptona al 2 %
- Extracte de llevat al 0.5 %
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM
- Glucosa 20 mM

El medi LB (*Luria Broth Base* de *Gibco BRL-Life Technologies*) es va preparar afegint 25 g en 1 litre d'aigua destil·lada, autoclavant després. Per tal de tenir medi amb antibiòtic es van afegir 2 μl d'ampicilina (*Roche*) a 20 mg/ml per cada ml de medi LB. Les plaques es van preparar afegint 14 g de bacto-agar (*Gibco BRL*) a 1 litre d'LB, autoclavant i abocant un cop refredat el medi a 60 °C.

Els encebadors M13 utilitzats són: M13 F: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

M13 R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Les cèl·lules competents *TOP 10* són de la soca *E.Coli* amb el fenotip:

F-*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

14. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DE LA FAMÍLIA OBJECTE D'AQUEST ESTUDI

L'any 2001 Gàmez i els seus col.laboradors van descriure detalladament en una extensa família d'origen espanyol els trets clínics i l'herència d'una nova entitat no descrita fins aleshores i de la qual s'en desconeix el gen responsable. El pedigrí complert incloïa 105 individus de 5 generacions (veure Figura 1), dels quals es van fer estudis en 61. Es tractava d'una nova forma de distròfia muscular de maluc (LGMD) autosòmica dominant. 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.

Els símptomes de debilitat muscular a la cintura pèlvica es van detectar a l'inici en el 81,1 % dels casos. Els músculs afectats més freqüentment van ser l'*iliopsoas* (96 %), els glutis (75 %), els aductors del maluc (71,8 %), el deltoïdes (90,6 %), el *biceps brachii* (68,7 %), el paraspinal (65,6 %) i els flexors del coll (62,5 %). L'afectació de la cintura pèlvica era més severa i es produïa abans que a la part de les espatlles. La debilitat muscular proximal va oscil.lar entre els graus 0 i 4+/5 de l'escala MRC (*British Medical Research Council*), amb distribució simètrica. La capacitat funcional es va mesurar d'acord amb les escales designades per Vignos (1963) i Brooke (1983).

La debilitat distal va aparèixer tard en el curs de la malaltia o també en el primer quadre en pacients afectats severament de la forma juvenil, amb afectació freqüent de l'*extensor digitorum*, el *tibialis anterior* i els músculs extensors dels dits del peu.

6 pacients van presentar el fenomen d'escàpula alada. Dos pacients amb la forma juvenil van presentar debilitat facial moderada 10 anys després de l'inici de la malaltia. Els pacients amb un inici més primerenc de la malaltia presentaven pèrdua muscular generalitzada, implicant predominantment el quadríceps, els glutis, el deltoïdes, els *biceps*, l'*infraspinatus* i els *supraspinatus* (Veure pacient V-11 a Figura 2).



Figura 2: Pacient n° 24 (V-11) presentant lordosi, escàpula alada i pèrdua muscular proximal afectant els músculs pèlvics i de les espatlles (Gámez 2001).

No es van trobar contractures articulars en estadis primerencs. 3 pacients van desenvolupar contractures al tendó d'Aquiles en estadis tardants en el curs de la malaltia. 4 individus van presentar escoliosi o hiperlordosi, tots pertanyent al grup de la forma juvenil.

Es va observar afectació clínica dels músculs respiratoris en 4 pacients amb la forma juvenil. La capacitat vital mitjana en aquests pacients era del 38,6 % dels valors normals.

No es va observar ptosi, oftalmoparesi, disfàgia, alteracions en la parla, hipertròfia de panxell, miàlgia o alteració del coneixement a cap pacient.

La progressió de la debilitat durant un seguiment de 8 anys va presentar 2 patrons:

- progressió relativament lenta en individus amb la forma adulta
- progressió més ràpida en pacients amb la forma juvenil

La taxa de progressió semblava ser linial. 2 pacients amb inici de la malaltia abans dels 14 anys van precisar cadira de rodes abans dels 28 anys. Un noi que va manifestar la malaltia al primer any de vida va necessitar ajuda per caminar als 12 anys i l'ajuda de la seva mare per realitzar la majoria de tasques diàries (grau 6 a l'escala de Vignos).

El valor mitjà de CK va ser de 589, oscil.lant entre 47 i 2.920 (valor normal < 150 U/L). Es van trobar valors normals de CK al 40,6 % dels pacients. Els valors mitjans d'aspartat aminotransferasa (ASAT) i alanin aminotransferasa (ALAT) van ser de 35,7 i 44,5 U/L.

Els electromiogrames (EMG) van presentar canvis miopàtics de curta duració, polifàsia i potencials de baixa amplitud, que eren més pronunciats als músculs proximals. Les velocitats de conducció nerviosa sensorial i motora eren normals.

Les ressonàncies de cervell, els electrocardiogrames (ECG) i ecocardiogrames realitzats van ser normals.

El patró d'herència era consistent amb transmissió autosòmica dominant; 44 dels 76 (58 %) nens fills de pares afectes van manifestar la malaltia. Es van identificar 26 parells pare afecte/fill afecte. Les dades comprenen 18 parelles amb un progenitor a la generació III i 8 parells amb un progenitor a la generació IV. A les parelles parentals de la generació III es va observar un decreixement mitjà de 28,5 anys en l'edat d'inici de la malaltia de la descendència. Als parells parentals de la generació IV, aquest

decreixement va ser de 13,2 anys, el que suggereix l'existència d'anticipació genètica. Tot examinant els efectes de l'origen del gènere parental es va observar que la diferència mitjana d'edat d'inici de la malaltia entre progenitor i fill en 17 parells mare/fill era 1,6 anys més jove que en 9 parells pare/fill, no considerant-se, doncs, cap efecte significatiu del gènere parental en l'edat d'inici de la malaltia.

A nivell microscòpic, els trets morfològics trobats van ser similars en tots els casos, consistint en un tamany anormal de la fibra i variació del tamany, augment de teixit connectiu endo i perimisial, fibres degeneratives disperses amb miofàgia, bandes Z anormals i en alguns casos, vacuoles prominents a les vores (tipus *rimmed*) (Figura 3 A). Ocasionalment es van trobar nuclis centralitzats. La distribució i diferenciació dels tipus de fibres va ser normal. Un pacient va presentar fibres vermelles arrossegades (*ragged red fibers*, RRF). La tècnica de COX-SDH va revelar entre un 5 i un 30 % de fibres COX negatives en 3 casos. Totes les RRF van ser COX negatives, però també es van observar fibres COX negatives sense signes de proliferació mitocondrial. Les tincions immunohistoquímiques per distrofina i sarcoglicans van ser normals. No es van trobar dipòsits anormals de proteïnes tau, ubiquitina o β -amiloide. Es va observar sobreexpressió de desmina en algunes fibres però no de forma prou abundant com per considerar-ho com a una acumulació de desmina significativament anormal. La sobreexpressió de vimentina i proteïnes relacionades amb distrofina en fibres petites disperses sense deficiència en distrofina es va considerar una evidència de regeneració.

A nivell de microscopia electrònica es van veure 3 casos de vacuoles autofàgiques amb cossos prominents de pseudomièlina i cossos densos. En un cas es van trobar agrupacions intracitoplasmàtiques de filaments de 16 a 18 nm. No es van observar inclusions filamentoses addicionals a nuclis. En un cas es van observar prominents acumulacions anormals de mitocondris a nivell subsarcolèmic i paranuclear, moltes d'elles amb inclusions paracrystal·lines (veure Figura 3B) (Gámez 2001).

Com es veurà més endavant, es va fer un estudi de lligament que va excloure les 5 formes de LGMD autosòmiques dominants prèviament descrites com a responsables de la malaltia en aquest pedigrí. Tot plegat, la malaltia estudiada complia amb els criteris d'acceptació de distròfia muscular tipus LGMD (Bushby 1997a).

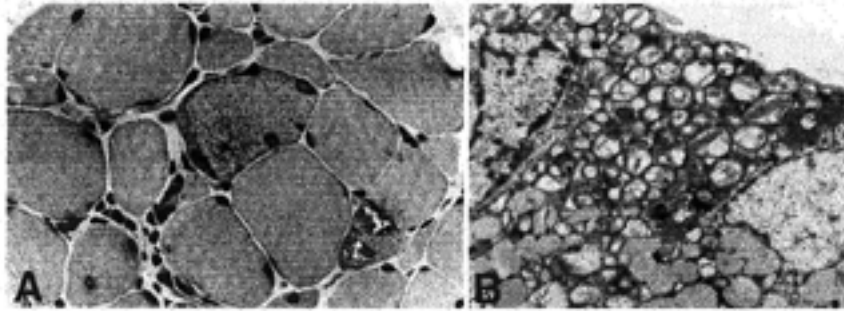


Figura 3: (A) Secció muscular criostàtica del pacient 19 (IV-6) (hematoxilina-eosina). Es pot observar la gran variabilitat del tamany de les fibres, una petita fibra amb 2 vacuoles prominents a baix a la part dreta i una fibra central que presenta basofília subsarcolèmica i una marcada xarxa intermiofibrilar, indicativa de proliferació mitocondrial. (B) Imatge de microscopia electrònica de tall transversal de fibra muscular esquelètica del pacient 24 (V-11), observant-se un elevat nombre de mitocondris paranuclears amb cristalls anormals i inclusions paracrystal.lines (Gàmez 2001).

15. APROXIMACIÓ METODOLÒGICA A L'ESTUDI GENÈTIC D'AQUEST PEDIGRÍ: ESTUDI D'ANÀLISI DE LLIGAMENT (*LINKAGE ANALYSIS*)

Mitjançant el clonatge posicional podem saber no només en quin cromosoma es troba localitzat el gen responsable d'una malaltia sino que també podem acotar la regió cromosòmica implicada. Podrem així aïllar el gen a partir de la seva localització genètica o física en el genoma. Les primeres passes al respecte les va donar Botstein (1980), al donar vida per primer cop a la genètica inversa, tot identificant gens basant-se només en la posició que tenen al genoma i establint la base teòrica per la qual es poden utilitzar els polimorfismes d'ADN per lligar malalties humanes. Per fer aquesta aproximació cal que busquem al llarg de tot el genoma seqüències genètiques repetitives àltament polimòrfiques, anomenades també microsatèl.lits (CHLC-*Cooperative Human Linkage Center*, Gyapay 1994). A partir d'elles podrem abordar l'anomenat anàlisi de lligament o *linkage*.

15.1 Fonament teòric de la tècnica de l'anàlisi de lligament

Si estudiem una malaltia nova de la qual desconeixem la seva base genètica, inicialment haurem de fer un cribratge general de tots els cromosomes, podent descartar el cromosoma X de confirmar-se l'herència autosòmica. Convindrà, per tal de tenir uns resultats el màxim fiables possibles, disposar d'una família el més gran possible, amb força membres afectes i de diverses generacions per tal de tenir un paràmetre estadístic indicatiu de lligament que sigui prou significatiu. El que tractarem de veure és el possible lligament de la malaltia amb els marcadors microsatèl.lits. És a dir, buscarem uns marcadors que co-segreuin amb la malaltia en tots els individus afectes del nostre pedigrí. El fonament de la tècnica es basa en el fenomen de la recombinació. Una de les formes de variabilitat genètica ve donada pel caràcter aleatori de l'assignació dels cromosomes dels pares als fills en la meiosi. Però hi ha una altra font de variabilitat. Quan els parells de cromosomes homòlegs resten aliniats formant un bivalent, pateixen un procés anomenat entrecruament o *crossing-over*, que dona lloc a la recombinació. En la recombinació, porcions del cromosoma homòleg matern recombinen amb el cromosoma homòleg patern i així es forma un cromosoma híbrid. És a dir, es produeix un intercanvi de material entre les cromàtides associades. Aquest intercanvi s'anomena quiasma. El quiasma representa un lloc en el qual 2 de les cromàtides d'un bivalent

s'han trencat en punts corresponents. Els extrems trencats es tornen a enganjar de forma creuada, generant-se noves cromàtides. Cada nova cromàtida estarà formada per material derivat d'una cromàtida a un costat del punt d'unió i per material corresponent a l'altra cromàtida a l'altra banda del punt d'unió. Així, les dues cromàtides recombinants tindran estructures recíproques (Veure Figura 4).

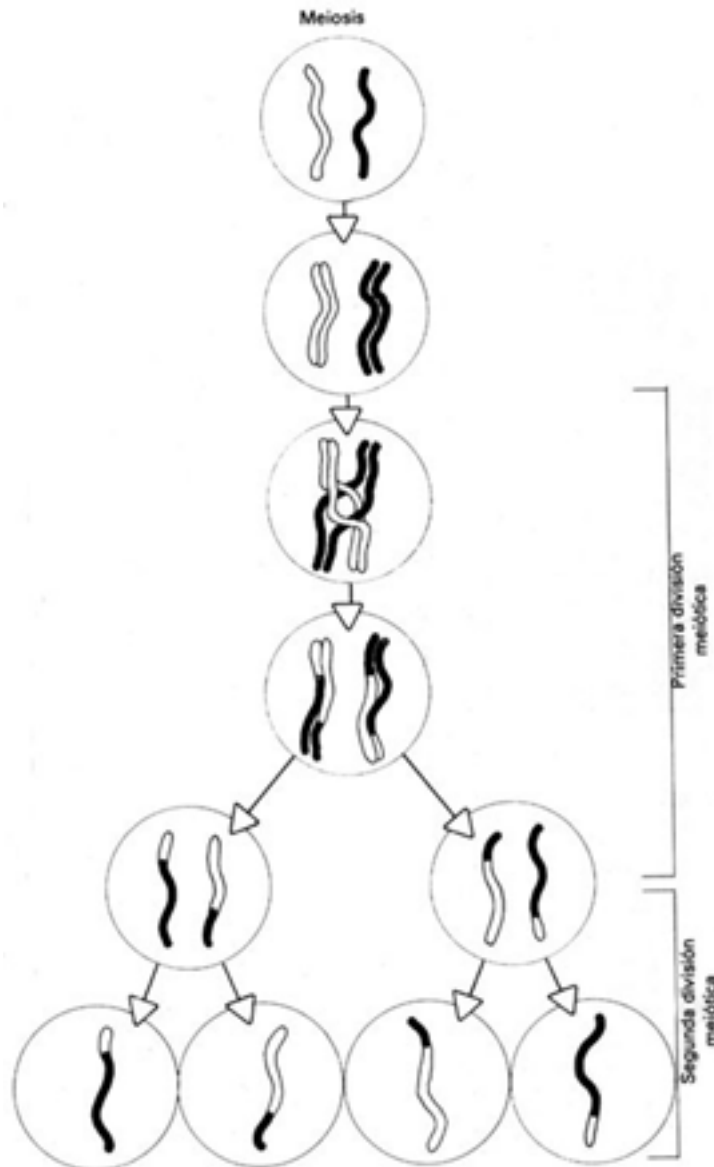


Figura 4: Esquema del procés meiótic amb l'intercanvi entre cromàtides.

El procés de la recombinació té lloc amb freqüència i sembla ser que té que produir-se un quiasma en cada cromosoma o braç cromosòmic en cada meiosi (Sturt 1976). A cromosomes acrocèntrics petits se solen presentar pocs entrecreuaments, essent múltiples els que tenen lloc als cromosomes més grans. A menor proporció de recombinants en la progènie, el lligament serà més fort. Morgan va proposar que el lligament genètic és simplement el resultat mecànic de la localització dels gens als cromosomes. Es pot demostrar que el *crossing-over* és el responsable de la recombinació gràcies a la correlació entre estructura cromosòmica i genotip. Això es pot evidenciar en les translocacions, en les quals, part d'un cromosoma ha sortit d'un cromosoma i s'ha incorporat en un altre (Lewin 1990). La base de l'anàlisi de lligament resideix en el fet que les recombinacions tenen lloc entre 2 *loci* genètics (gens, marcadors d'ADN, aberracions cromosòmiques, etc.) amb una taxa que està relacionada amb la distància entre ells en el mateix cromosoma. Dit d'una altra manera, *loci* que es troben físicament molt a prop l'un de l'altre tendeixen a heredar-se junts amb més freqüència. L'objectiu de l'anàlisi de lligament és determinar si 2 *loci* tendeixen a co-segregar amb més freqüència del que ho farien si no estiguessin físicament junts en el mateix cromosoma. Els 2 cromosomes homòlegs segreguen independentment. Així, un al·lel en un *locus* en un cromosoma segrega juntament amb un al·lel donat d'altre *locus* d'altre cromosoma amb una probabilitat del 50 %. La màxima recombinació entre 2 *loci* és del 50 % d'acord amb la segregació independent predita per Mendel en la seva segona llei. Al·lels a *loci* en el mateix cromosoma haurien de co-segregar amb una taxa que està d'alguna manera relacionada amb la distància entre ells en el cromosoma. Aquesta taxa és la probabilitat, o fracció de recombinació (que representarem amb el símbol θ), d'un esdeveniment de recombinació que tingui lloc entre 2 *loci*. En un mateix cromosoma poden succeir múltiples esdeveniments de recombinació. Si en un gàmete 2 *loci* han patit 2 entrecreuaments entre ells, el resultat final serà cap recombinació entre ells. Això redueix el nombre de recombinants, de manera que la freqüència de recombinació subestima la distància de mapa. Si considerem gens dins un mateix cromosoma, les distàncies de mapa individuals són aproximadament aditives. Així, si 2 gens A i B estan asseparats per 10 unitats i el gen C es troba a 5 unitats més enllà del B, la mesura directa o distància entre A i C estarà propera a les 15 unitats. Els gens, aleshores, poden situar-se en un ordre linial. La distància entre gens no depen dels al·lels en concret sinó només dels *loci* genètics (Lewin 1990). La fracció de recombinació oscil·la entre $\theta = 0$ per *loci* situats junts l'un amb l'altre i $\theta = 1/2$ per *loci*

llunyans en un mateix cromosoma o *loci* de diferents cromosomes, amb la qual cosa es pot prendre com a mesura de la distància genètica o distància de mapa entre *loci* genètics. Així, la distància genètica es podria calcular amb la fórmula:

$$\text{Distància de mapa} = \frac{\text{Nombre de recombinants} \times 100}{\text{Nombre total de descendència}}$$

Aquesta és una mesura útil per distàncies curtes. La unitat de mesura és 1 unitat de mapa o centimorgan (cM), corresponent, aproximadament, a una fracció de recombinació del 1 %. No obstant, a causa dels molts entrecreuaments, la fracció de recombinació no és una mesura de distància aditiva i s'ha de transformar per una funció de mapa en la distància de mapa. Com a exemple, la funció de mapa de Haldane transforma $\theta = 0,27$ (27 %) en 39 cM i la funció de mapa de Kosambi tradueix $\theta = 0,27$ en 0,30 Morgans o 30 cM (Ott 1991, Liberman 1984). Es considera que 2 *loci* estan genèticament lligats quan $\theta < 1/2$ i el fenomen que descriu aquest fet s'anomena lligament genètic (*genetic linkage*). A mesura que augmenta la distància entre 2 punts també augmenta la probabilitat de *crossing-over* entre ells. Així, assumint que el *crossing-over* és el responsable de la recombinació, quan més a prop resideixin uns gens dels altres, més fortament estaran lligats. L'objectiu de l'anàlisi de lligament és tenir una estimació de la θ i verificar si el seu valor és inferior a 1/2, és a dir, si una desviació del 50 % de recombinació és estadísticament significativa. L'estimació de la fracció de recombinació, normalment representada per θ , és en casos senzills, simplement la proporció de recombinants (proporció de nens que porten un gàmete recombinant) respecte totes les recombinacions possibles i el seu rang està, en principi, entre 0 i 1. Donat que les estimacions màximes de versemblança (*likelihood*) es defineixen a partir de valors paramètrics admissibles i la fracció de recombinació no pot ser superior a 1/2 (a menys que hi hagi una interferència cromatídica, la seva estimació està normalment restringida a $[0, 1/2]$). El terme *linkage* fa referència a *loci* i no a al·lels específics dins d'aquests *loci*. Al·lels de diferents *loci* es diu que estan acoblats quan tenen origen en el mateix parental. Per altra banda, 2 *loci* que es trobin en el mateix cromosoma s'anomenen sintènics, podent estar o no lligats. Per tal de poder conèixer si estadísticament tenim un lligament, s'acostumen a utilitzar mètodes basats en la

versemblança. Utilitzant programes informàtics sofisticats com *LINKAGE*TM, és possible avaluar la versemblança d'un pedigrí determinat sota diferents condicions o assumpcions en referència a la fracció de recombinació entre 2 *loci*. Així, s'utilitza un test de *ratios* de versemblança. En l'anàlisi de lligament, el *ratio* de versemblança és : $L(\theta)/L(\theta = 0,5)$, corresponent el denominador a la versemblança de les nostres dades sota l'assumpció de no lligament. En l'anàlisi de lligament, el test es formula en termes del logaritme en base 10 d'aquest *ratio* o *lod score*. La fórmula del *lod score* és :

$$Z(\theta) = \log_{10}L(\theta)/L(0,5) \text{ o el que és equivalent}$$

$$Z(\theta) = \log_{10}[L(\theta)] - \log_{10}[L(\theta) = 0,5]$$

El càlcul d'aquests paràmetres es realitza amb els esmentats programes informàtics, bàsicament englobats en *LINKAGE*TM (Lathrop 1984) (Terwilliger 1994). S'ha convingut que un valor de *lod score* màxim (Z_{\max}) de 3 o més evidencia un lligament estadísticament significatiu en malalties autosòmiques, essent el valor de 2 suficient en el cas de malalties lligades al cromosoma X, donat que la probabilitat prèvia de lligament és molt més alta que per una malaltia autosòmica. En el cas de malalties complexes el llindar del valor 3 pot no ser suficient. En el cas que s'obtinguin valors al voltant de 2 convindrà estudiar més individus, més famílies o be marcadors addicionals propers als que ens hagin donat aquest valor. A més, valors de $Z(\theta)$ iguals o inferiors a -2 exclouran el lligament entre 2 *loci*. En algunes ocasions ens podem trobar amb marcadors no informatius. És a dir, marcadors que, un cop analitzats, resulten no ser tant polimòrfics, presentant un al·lel comú en la majoria dels membres del pedigrí, traduïnt-se en un *lod score* de valor proper a 0 en totes les fraccions de recombinació calculades (Ott 1991, Terwilliger 1994). Gràcies a la continua millora de les diferents bases de dades i a l'avenç en el coneixement del genoma humà, s'ha pogut anar disposant cada cop de més marcadors polimòrfics dispersos pels diferents cromosomes, que permeten cobrir distàncies que abans podien escapar a l'anàlisi de lligament. Així, el CEPH (*Centre d'Etude du Polimorphisme Humain*) aporta les dades referents a marcadors polimòrfics, molts d'ells microsatèl·lits. A partir d'aquestes dades es van poder establir unes posicions en el mapa genètic, obtenint-se el mapa de lligament *Généthon* (Weisenbach 1992, Gyapay 1994, Dib 1996). Estudiant el genotip de tots els

microsatèl·lits descoberts fins ara (varios milers) en més de 500 individus de diferents famílies s'ha aconseguit construir aquest mapa del genoma humà. Gràcies també a la continua aparició de nous clons, YACs (*Yeast Artificial Chromosomes*), BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), EST (Adams 1992), agrupacions de *contigs* i confirmació de les seves orientacions, tot accedint a ells per diverses bases de dades com l' NCBI s'està millorant el que és el mapa físic (Cohen 1993), de gran importància per tal de conèixer l'ordre dels marcadors. Tècniques com la del *Radiation Hybrid Mapping* han permès també situar molts marcadors en les posicions relatives entre ells en els cromosomes. No obstant, encara resta molt a fer per tal de saber amb exactitud quin és aquest ordre total al genoma i la integració final dels mapes genètic i físic serà clau per tal de localitzar amb precisió qualsevol gen.

15.2 Càlculs i suport informàtic

Per tal d'interpretar els resultats dels marcadors fluorescents es van utilitzar els programes *GeneScan Analysis*® 2.1 i *Genotyper*® 2.1 en l'autoanalitzador *ABI PRISM*™ 310. Les anàlisis de lligament s'han realitzat amb el paquet informàtic *LINKAGE*, concretament *FASTLINK* 4.0 (Cottingham 1993) (Terwilliger 1994) en un sistema operatiu Unix SunOS 5.8.

A l'anàlisi de lligament paramètric a 2 punts (marcador-malaltia) es va utilitzar el programa *MLINK* per tal de calcular 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. Com s'ha explicat anteriorment, aquest paràmetre ens valorarà si la desviació de la θ respecte del 50% és estadísticament significativa, tot enfrontant la probabilitat de lligament a diferents θ amb la de *loci* independents. Recordem la fórmula:

$$Z(\theta) = \log_{10}L(\theta)/L(0,5)$$

La malaltia es va considerar autosòmica dominant amb un 90 % de penetrància. La freqüència genètica estimada de la malaltia és de 1/100.000. Les freqüències al·lèliques dels marcadors es van estimar a partir del comptatge d'al·lels de tots els individus genotipats i es va considerar que la recombinació era igual en homes i dones.

Els valors màxims de Z iguals o superiors a 3 ens permeten acceptar que 2 *loci* estan lligats i els valors iguals o inferiors a -2 ens permeten excloure el lligament entre 2 *loci* (Terwilliger 1994).

Per tal d'excloure les 5 regions cromosòmiques implicades en les LGMD autosòmiques dominants prèviament descrites es va utilitzar el programa *LINKMAP* per fer una anàlisi a 3 punts (2 marcadors i la malaltia). L'ordre dels marcadors i la distància genètica entre ells estan basats en el mapa de lligament *Généthon*.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi s'han consultat freqüentment diferents bases de dades, tant per buscar informació de marcadors, mapes genètics i físics per conèixer ubicació i ordre de marcadors, gens i EST, homologies, bibliografia, entre d'altres. La principal base de dades consultada ha estat la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), que engloba a les més importants. Entre les més utilitzades en ella i en altres es troben:

GeneMap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmap>)

The Chromosome 7 Project (<http://www.genet.sickkids.on.ca/chromosome7>)

WebGene Home Page (<http://www.itba.mi.chr.it/webgene>)

Genome Data Base (GDB) (<http://www.gdb.org>) amb accés a *HUGO* (<http://www.gdb.org/hugo/Chr7>)

On Line Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db:OMIM>)

Ensembl Genome Server (<http://www.ensembl.org>)

GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>)

Généthon (<http://www.genethon.fr>)

Cooperative Human Linkage Center (CHLC) (<http://lpg.nci.nih.gov/CHLC>)

Marshfield (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics>).

El disseny dels encebadors d'òptimes condicions per l'amplificació s'ha realitzat mitjançant el programa OLIGO®-4.02 *Primer Analysis Software*.

