

Análisis molecular de la cardiomiopatía dilatada ligada a X

Rocío Ortiz López*, Jeffrey A. Towbin**, Hugo Barrera Saldaña*

Las cardiomiopatías son enfermedades que afectan en forma anatómica y funcional al músculo cardíaco (miocardio). Este cuadro clínico tiene una prevalencia de 37/100,000 habitantes y constituye la causa más común de trasplante de corazón.^{1,2} Entre éstas, la cardiomiopatía dilatada (CD), caracterizada por aumento (dilatación) del diámetro ventricular y reducción de la función contráctil del miocardio, representa aproximadamente el 30% de los casos con esta patología. La CD puede tener patrones de herencia mendeliana o mitocondrial.^{3,4}

La CD ligada al cromosoma X (CDLX) es otra variante fenotípica de mutaciones del gen de la distrofina,^{5,6} entre los cuales también se encuentran las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y de Becker (DMB).⁷ La enfermedad afecta a jóvenes varones entre 10 años a 30 años de edad y puede ser idéntica a cualquier otro cuadro clínico de cardiomiopatía dilatada, excepto por su evidencia de transmisión ligada al cromosoma X y por los elevados niveles de creatinina de músculo esquelético (CK-MM) en el suero y la falta de evidencia de miopatía esquelética. Las portadoras están menos afectadas y pueden manifestar síntomas más tardíamente y de progresión muy lenta.⁴

La distrofina es una proteína del citoesqueleto de gran tamaño (427 kD), localizada en la cara interna del sarcolema (8). El gen de la distrofina cuenta al menos con 79 exones, expandidos en más de 2.5 Mpb. El transcrito correspondiente (RNAm), de 14 Kb, es expresado predominantemente en los tejidos muscular esquelético, cardíaco y liso, y en niveles bajos, en el cerebro.⁹ Al menos cinco promotores regulan la expresión de distrofina. Tres de éstos están localizados al inicio del gen o región 5' [promotor de músculo (Pm), promotor de cerebro (Pc) y promotor de células cerebelosas de Purkinje (Pp)] y generan proteínas de tamaño completo. Cada uno codifica para su exón 1 particular, el cual no se comparte entre los tres transcritos. Los otros dos promotores se localizan hacia el final del gen (región 3') y codifican para transcritos pequeños, cada uno con un exón 1 particular.¹⁰ Las mutaciones en el gen de la distrofina o en sus regiones reguladoras pueden causar baja producción de la proteína, o la completa ausencia de ésta en músculo y corazón.

La primera familia con CDLX fue reportada por Berko y Swift en 1987.⁵ Esta familia, y otra estudiada por Towbin y cols.,⁶ mostraron ligamiento con la sonda XJ1.1 (DXS206), ubicada en la región 5' del gen de la distrofina. Este último reporte sugería que la anomalía alteraba la región N-terminal de la proteína, que afectaba exclusivamente al miocardio, y que las mutaciones eran diferentes a las reportadas en DMD y DMB.^{11,12}

Como el análisis de ligamiento y el análisis de proteínas reportado por Towbin y cols. mostraron que la región 5' del gen de la distrofina era la directamente involucrada,⁶ este análisis se enfocó principalmente en esta región, y nos propusimos demostrar que las mutaciones en CDLX eran diferentes a las reportadas en pacientes con DMD/DMB.

Como el análisis de ligamiento y el análisis de proteínas reportado por Towbin y cols. mostraron que la región 5' del gen de la distrofina era la directamente involucrada,⁶ este análisis se enfocó principalmente en esta región, y nos propusimos demostrar que las mutaciones en CDLX eran diferentes a las reportadas en pacientes con DMD/DMB.

Materiales y métodos

Familias. Se recolectaron muestras de tres familias

* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N.L., México.

** Departamento de Cardiología Pediátrica. Baylor College of Medicine, Houston, Texas. EUA.

con CDLX y de 100 controles sanos de raza negra y caucásica (50 varones y 50 mujeres). Los participantes fueron evaluados por examen físico, electrocardiograma (ECG), ecocardiografía bidimensional modo-M y Doppler. Los afectados mostraron signos de daño cardíaco congestivo y ecocardiografía consistente con CD. La primera familia CDLX-1 fue evaluada en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill por Berko y Swift⁵ y las dos restantes (CDLX-2 y CDLX-3) en el Colegio de Medicina de Baylor y la Escuela de Medicina de la Universidad de Texas, en Houston. Después de obtener las formas de consentimiento informado, de cada individuo se obtuvieron 10 ml de sangre anticoagulada con heparina para inmortalización de linfocitos y otros 10 ml anticoagulados con citratos para extracción de DNAG. Cuando fue posible, se obtuvo biopsia de músculo esquelético y/o cardíaco de los afectados y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido (-170°C). De los controles se obtuvieron solamente 10 ml de sangre para la extracción de DNAG. Los linfocitos se sometieron al proceso de inmortalización (líneas linfoblastoides).^{13,14} De estas líneas se aislaron los ácidos nucleicos para los estudios de interés. Las familias afectadas, todas de ascendencia estadounidense, no estaban relacionadas. Las familias CDLX-1 y CDLX-3 eran de raza negra y la familia CDLX-2 era de origen caucásico. Los estudios de laboratorio (función tiroidea, carnitina, hierro, capacidad total de unión a hierro, títulos virales y de toxoplasma y niveles de CK) sólo mostraron elevación de CK totales y CK de músculo esquelético (CK-MM) en los afectados y algunas mujeres portadoras.

Aislamiento de ácidos nucleicos. El DNA genómico (DNAG) se aisló de linfocitos o linfoblastos, según el caso. Estos se digirieron durante 1 a 3 h a 37° C con proteinasa K. Los desechos celulares se eliminaron por centrifugación (15 min a 3000 rpm). El DNA se extrajo con fenol-cloroformo y precipitación con etanol al 100%. El RNA obtenido de linfocitos en cultivo, de biopsias de tejido congelado o de tejido fijado en parafina (en algunos casos), se aisló con el reactivo TRIzol,¹⁵ una solución premezclada de acetato de sodio, isotiocianato de guanidina y fenol. El homogenizado resultante se extrajo con Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1).

Posteriormente, éste se precipitó con 0.8 volúmenes de isopropanol a -20° C y se recuperó por

centrifugación. La pastilla se lavó con etanol al 70%, se secó, se resuspendió en 30 µl de agua tratada con dietil-pirocarbonato y se almacenó a -80° C hasta su uso.

Análisis de ligamiento. La familia CDLX-2 se sometió a análisis de ligamiento (las otras dos ya habían sido estudiadas), con los marcadores de la región 5' del gen de la distrofina [XJ1.1 (DXS206), XJ1.2 (DXS206), pERT 84-10 (DXS142) y pERT 87-30 (DXS164)]. Estos estudios se realizaron mediante análisis tipo Southern y PCR/RFLP (6). Para esto, se digirieron 5 a 10 µg de DNA con la enzima de restricción adecuada (6) y los fragmentos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador Tris-Acetato/EDTA (TAE). El material se transfirió a membranas de nylon Zeta probe (Bio-Rad, Richmond, CA). Las sondas utilizadas se marcaron a una actividad específica de 10⁹ cpm/µg, utilizando [a-(³²-P)]-dCTP y el estuche Megaprime DNA Labeling System (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra). La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C, siguiendo el método descrito por Church y Gilbert.¹⁶ Las sondas se preasociaron previamente con exceso de DNAG de placenta. Se hicieron lavados con 2X SSC, 1% SDS y 1 mM EDTA, hasta que menos de 500 cpm eran detectadas mediante el contador Geiger. Las membranas se expusieron a una película radioactiva (Kodak, Rochester, NY) durante toda la noche. Los patrones resultantes se compararon con los de Koenig y cols.^{17,18}

El análisis por PCR del polimorfismo de la enzima de restricción *Mae* III para el estudio de la región 5' del gen de la distrofina, cerca del promotor de músculo y dentro de la región pERT 84 (DXS142),⁶ se realizó con los iniciadores Mae-S (5'-CAGGGATGCAAAGGAAGT GGG-3') y Mae-A (5'-CAGTTTGTTTAACAGTCA CTC-3'). Los productos se digirieron con la enzima y se resolvieron en minigeles de poliacrilamida al 5%, que se observaron con bromuro de etidio (10 mg/ml) y luz UV. El ligamiento se investigó con el programa LINKAGE (V5.03). La puntuación LOD entre dos puntos se calculó para todos los pares de loci, utilizando el programa MLINK. Se asumió un patrón de herencia ligado al cromosoma X y una penetrancia del 100%.

Análisis de deleciones en el gen de la distrofina. El DNAG de los afectados se analizó mediante Southern blot, utilizando las sondas de DNAG des-

critas en por Koenig y cols.^{17,18} y mediante PCR Múltiplex.¹⁹ Para el análisis por Southern-blot se utilizaron las sondas de DNAC 1-2a, 2b-3, 4-5a, que cubren los exones 1 a 5 del gen de la distrofina. Para los estudios de PCR-Múltiplex se usaron los estuches comerciales de 5 y 9 parejas de oligonucleótidos descritos por Beggs y cols.

19 y Chamberlain y cols.,²⁰ respectivamente, los cuales permiten el análisis simultáneo del promotor Pm y de los exones 4, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 48, 50, 51 y 52 del gen de la distrofina. Los productos amplificados se resolvieron en geles de agarosa Nu-Sieve al 3% teñidos con bromuro de etidio y se analizaron con luz UV.

Análisis de los promotores del gen de la distrofina. Los promotores Pm, Pc y Pp fueron amplificados en cada uno de los afectados y controles normales con oligonucleótidos, diseñados con base en secuencias reportadas previamente.^{7,8,9,21 y 22} Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los productos obtenidos se clonaron en vector-T (Invitrogen, Carlsbad, CA) para su posterior secuenciación.

Análisis del DNAC. Se incubaron 4 µl de RNA (1 µg/ml) en presencia de 20 U de RNAsin (Promega, Madison, WI), durante 5 min a 95° C y se transfirieron a hielo. A esta mezcla se le añadieron los componentes para la transcripción reversa de la primera cadena de DNA, con transcriptasa reversa del virus de la leucemia de Moloney (Promega, Madison, WI). Para la RT-PCR se utilizaron varios pares de iniciadores que cubrían la parte 3' de cada promotor hasta el exón 2 y los primeros 14 exones del gen.²¹ Se utilizaron 2.5 µl de la reacción de DNAC para realizar las PCRs. Para analizar el sitio de empalme del intrón 1 se usaron los iniciadores I1-1S, I1-1A e I1-2.²¹ Los productos obtenidos se clonaron para secuenciarlos.

Detección de mutaciones. Se realizó un análisis de cada uno de los exones (del 2 al 10) del gen de la distrofina²³ por SSCP en todos los participantes. Se diseñó un par adicional de oligonucleótidos para amplificar un segmento entre el extremo 3' del intrón 8 y el exón 9, los cuales flanqueaban las secuencias normal, polimórfica y mutada del exón 9 en la familia CMLX-1. Después de la amplificación radiactiva,

las muestras se desnaturalizaron agregando 40 µl de solución de formamida (formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilencianol al 0.05%) y calentando a 85°C durante 10 min. Las muestras se transfirieron inmediatamente a 4°C y se depositaron en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida: bisacrilamida (50:1) al 10%. Los geles se corrieron en amortiguador TBE al 0.5% durante 18 h a 8 W, en el cuarto frío. El gel se secó y se expuso a la película radiográfica Kodak durante toda la noche. Se compararon las bandas resultantes de los controles y de los afectados. Las bandas con patrones diferentes (anormales) de afectados y sus respectivos controles normales, se cortaron directamente de los geles de poliacrilamida secos. Estos se eluyeron en 100 ml de agua destilada y se calentaron a 65° C por 30 min. 10 µl del DNA eluido fueron utilizados como templado en una segunda PCR con los mismos iniciadores. Los productos finales se purificaron con columnas Qiaquick (Qiagen, Hilden, Alemania) y se utilizaron para la reacción cíclica de secuenciación.

Clonación y secuenciación. Los productos de la PCR se subclonaron en vector-T.²⁴ Las clonas se secuenciaron con los oligonucleótidos M13 y SP6 mediante la técnica de reacción de PCR-cíclico con un estuche comercial (Stratagene, La Jolla, CA). Los productos resultantes se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%, en presencia de urea. Los geles se secaron y expusieron a la película radiográfica durante toda la noche. La secuenciación automatizada se realizó en un secuenciador ABI 370.

Análisis de proteínas. Para el análisis Western-blot se utilizó tejido proveniente de biopsias de músculo esquelético o cardíaco. Aproximadamente 50 mg de tejido se trituraron con un bisturí, se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadieron 300 µl de solución de Laemmli (Trizma base 2.5 M, SDS 4%, Glicerol 50%, pH 6.8). Las muestras se hirvieron a 100°C durante 3 min. y se centrifugaron durante 5 min a 12,000 rpm. Se utilizaron 25 a 30 µl del sobrenadante para cargar geles de SDS-poliacrilamida al 6%, que se corrieron entre 50 a 80 V, hasta que el colorante del frente de corrimiento alcanzó el fondo. Las proteínas se transfirieron a membranas de nylon a 500 mA, durante 18 h a 15° C, utilizando un amortiguador (Trisma base 0.25 M,

Glicina 0.2 M). Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en TBST [10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20] durante 2 h. Se utilizaron tres anticuerpos para la caracterización (anti-región N-terminal, anti-región central y anti-región C-terminal de distrofina). Se utilizó anticuerpo anti-actina como control interno del sistema. Todos los anticuerpos se usaron a una dilución 1:1000 en solución TBST y leche descremada al 5%. El primer anticuerpo se incubó durante 3 h. Las membranas se lavaron con PBS IX tres veces, durante 15 min. Las membranas se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario (IgG de conejo, anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina). El revelado se hizo con 10 ml de la mezcla de substratos cromogénicos NBT y BCIP, diluidos en TBST en presencia de 50 mM MgCl₂.

Análisis estructural de la proteína. El análisis de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo utilizando el programa MOSAIC,^{25,26} con un método diseñado para localizar estructuras secundarias (α -hélice y lámina β -plegada). La hidrofobicidad y la predicción de la estructura plot se realizó con el método de predicción de Garnier-Osguthorpe-Robson.^{27,28}

Resultados

Análisis de ligamiento. Se realizó el análisis de ligamiento en la familia CDLX2 con las sondas XJ1.1, XJ1.2, pERT 84-10 y pERT 87-30. Las familias CDLX-3 y CDLX-1 habían sido previamente analizadas (6). La sonda XJ1.1 proporcionó el mayor ligamiento con una puntuación LOD de +2.9 a una $q = \theta$, utilizando ligamiento de 2 puntos. El análisis multipuntual, utilizando las sondas XJ1.1, XJ1.2 y pERT 84-10 demostró una puntuación LOD combinada de +3.2. La sonda XJ1.1 está localizada dentro de la parte 5' del intrón 7 del gen de la distrofina.

Análisis del DNAg. Los patrones de bandas obtenidos mediante el análisis tipo Southern y la PCR-Múltiplex de las regiones promotoras P_m, P_c y P_p y los exones 2 al 10 fueron normales en todos los sujetos estudiados; con excepción del exón 9 en el sujeto afectado de la familia CDLX-1, en quien no fue posible amplificar este fragmento. Con las combinaciones de los iniciadores 8S/9A y 9S/10A se logró la amplificación del intrón 8, pero no la del

intrón 9. El fragmento de PCR correspondiente al intrón 8 (1500 pb) fue clonado y secuenciado. La comparación de las secuencias del intrón 8 entre el afectado de la familia CDLX-1 y un control normal, demostró mutaciones en las posiciones 1043 y 1045 del gen del afectado, que cambian la secuencia ACG por GCA. Con los iniciadores 9bS/9A se logró amplificación en todos los sujetos, implicando que el iniciador 9bS efectivamente flanqueaba el sitio del cambio. Este par de oligonucleótido, se utilizó también en el análisis por SSCP.

Análisis por SSCP. Los productos amplificados con los iniciadores mencionados se analizaron por SSCP y se observaron bandas de migración anormal en algunos afectados y madres portadoras (figura 1). Estas bandas se secuenciaron (figura 2). En la comparación con las secuencias del intrón 8 previamente obtenida y la del exón 9 reportada en el Gen-Bank (Ref. X14298), se identificaron tres alelos diferentes con cambios en la posición 1043: Un alelo presentaba el codón ACG, que correspondía a la mayoría de las muestras y controles normales. El segundo alelo presentaba el codón ACA [sustitución en la tercera base (G1045A)]. Esta mutación se encontró en más del 10% de los sujetos normales y en varios miembros de las familias CDLX-1 y CDLX-3. Todos los portadores de este polimorfismo eran de raza negra. El tercer alelo mostró la secuencia GCA [sustitución en la primera base (A1043G)]. Esta sólo se encontró en el sujeto afectado de CDLX-1 y en las mujeres portadoras de esta misma familia (figura 2). Esta mutación origina un cambio de treonina por

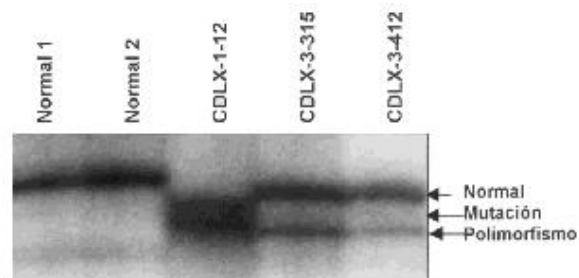


Fig. 1. Análisis por SSCP que revela la mutación en la familia CDLX-1. Se muestra el patrón de bandas generado por dos DNAs de controles normales, que muestran bandas semejantes, el patrón polimórfico detectado en el probando CDLX-1 y la familia CDLX-3 y la banda mutada en el afectado de la familia CDLX-3. Cada una de estas bandas fue cortada a partir del gel y analizada por secuenciación.

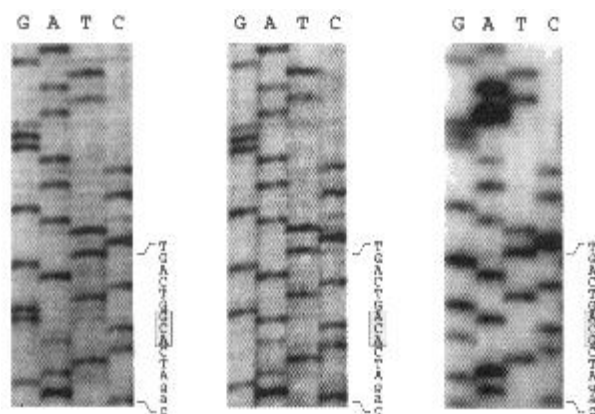


Fig. 2. Secuenciación de las bandas obtenidas por SSCP que revela la mutación en la familia CDLX-3. Secuenciación manual. Las cajas en las secuencias representan al codón 279 de la distrofina. Nótese el cambio de G por A en la tercera posición, la cual se interpreta como un polimorfismo, y la mutación de A por G en la primera posición, presente únicamente en el sujeto afectado, la cual se interpreta como la mutación responsable del fenotipo CDLX. La secuenciación automatizada corroboró los resultados.

alanina (aminoácido 279, región H1 de la proteína). Como este hallazgo sólo se presentó en el paciente, en su madre y en dos mujeres portadoras, se puede asumir que se trata de una mutación con repercusiones patológicas y no de un polimorfismo. Para el análisis de la segregación de la mutación, se utilizó el iniciador 9c-S (incluye la mutación en su secuencia). La amplificación con este iniciador se observó únicamente en el individuo afectado y en las mujeres portadoras de la familia CDLX-1.

Análisis de los DNAc. El análisis del DNAc obtenido a partir del RNA de linfocitos cultivados con los iniciadores para los exones 2 al 14, mediante secuencias sobrepuestas que cubrían los exones 2 al 14, mostró amplificación en todos los sujetos con excepción del afectado CDLX-3. A este paciente ya se le habían analizado (a partir de DNAg) todos los exones (del 2 al 9), sin haberse demostrado ninguna alteración. La amplificación a partir de DNAc de la biopsia del miocardio tampoco fue exitosa. También se probaron diferentes combinaciones de iniciadores (ejem: exones 1 a 2, exón 4 a 10, exón 2 a 13, etc.) y se ajustaron varias condiciones para PCRs largos (mayores de 1000 pb), sospechando que hubiera algún producto diferente de tamaño debido a un empalme alternativo, pero tampoco fueron exitosas. Como el segmento que abarca la región pro-

motora hasta el exón 10 (incluyendo los sitios de empalme), con excepción de la región de empalme del exón1-intrón 1 y el resto de los intrones 2 al 10, ya había sido analizado sin encontrarse mutaciones, se realizaron nuevas amplificaciones, utilizando la misma fuente de DNAc y un juego adicional de oligonucleótidos que amplificaban los exones 51 al 58 de la región 3' del gen. Con la nueva amplificación se demostró la ausencia de los exones 1 y 2 y la presencia de los exones 51 al 58 en el afectado de CDLX-3, lo cual indicaba que existía un problema en la expresión de la región 5' del gen.

Como las amplificaciones del DNAc eran negativas aun utilizando la combinación de oligonucleótidos para exón 1-exón 2, entonces la región candidata para alguna mutación estaba dentro del intrón I. A partir de la secuencia de la región promotora Pm y parte del intrón 1 reportada por Klamut y cols.,⁷ se diseñaron dos nuevos iniciadores (I1-1A e I1-2A), anidados dentro del intrón I y se realizaron las amplificaciones respectivas. La PCR de esta región fue exitosa al utilizar la combinación de iniciadores I1-1S/I1-1A e I1-1S/I1-2A. Los productos secuenciados mostraron una mutación en el sitio de empalme de la región donadora del exón 1. Esta mutación origina un cambio de G por T, que altera el sitio universal de empalme, lo que seguramente genera una proteína completamente diferente al incluir al intrón 2 como parte de la región codificante. Adicionalmente, en el análisis de la secuencia se encontró que el cambio de G por T generaba un nuevo sitio de restricción para la enzima *Mse* I, que no estaba presente en las muestras de los controles normales. Esto sugería que esta mutación permitiría un análisis de segregación en la familia afectada, mediante un simple análisis de restricción. Con este objeto, se eligió un segmento de 110 pb, que incluía parte del exón 1 y parte del intrón 1, que contenía la mutación y el nuevo sitio de restricción que podría generar fragmentos de 50 y 60 pb en los cromosomas mutados. El análisis de segregación en la familia CDLX-3 demostró una perfecta correlación entre la mutación y el afectado y las portadoras obligadas.

Análisis de la proteína. Se analizaron muestras de tejido provenientes del afectado de las familias CDLX-3 por Western-blot. La familia CDLX-1 había sido previamente por Towbin y cols.⁶ Las muestras se procesaron simultáneamente y bajo las mismas condicio-

nes y se observó homogeneidad en la intensidad de las bandas correspondientes a actina, utilizada como control interno. El anticuerpo anti-región N-terminal de distrofina demostró que la muestra del afectado en CDLX-3 no presentaba niveles detectables de distrofina.

El gel muestra otras bandas que tienen reacción cruzada con el anticuerpo utilizado, como las correspondientes a las proteínas 156 DAG, 59 DAP y 50DAG (pertenecientes al complejo de proteínas asociado a distrofina). El gel contiene muestras de tres pacientes con DMD, en quienes se observa la ausencia de distrofina.

La predicción del cambio en la estructura de la proteína mutada se realizó únicamente para la mutación encontrada en el exón 9. Puesto que la mutación del sitio de empalme entre los exones 1 y 2 predice la inclusión del intrón 1 en la síntesis del transcrito primario, no se requiere del análisis predictivo de la proteína. Este análisis, realizado con el programa MOSAIC, muestra un cambio en la es-

tructura secundaria de la segunda que predice la desestabilización de la proteína (figura 3). El análisis de la hidrofobicidad predice que la mutación T279A induce un cambio en la polaridad en esta región de la proteína, debido a que la treonina es un aminoácido polar neutro y la alanina es un aminoácido no-polar, lo cual altera la conformación de la bisagra I de la distrofina.

Discusión

El término "distrofinopatía" se utiliza para describir desórdenes alélicos de la distrofina, que abarcan desde la DMD clásica hasta casos clínicamente silenciosos con niveles de CK-MM muy elevados. En este trabajo se hace la caracterización molecular de una variante fenotípica recientemente descrita, la CDLX, resultante también de mutaciones en este gen, cuyo daño afecta principalmente al miocardio. La hipótesis del trabajo era que las mutaciones en el gen de la distrofina en pacientes con CDLX eran diferentes a las encontradas en pacientes con DMD o DMB. Logramos descubrir mutaciones en dos de las tres familias estudiadas.

En la familia CDLX-1, la mutación ocurrió en el exón 9 (cambio de A por G en la posición 1043), que altera la región H1 (bisagra 1) de la distrofina. La región H1, es una región altamente conservada de la distrofina y estructuralmente crítica para su función.^{18,29,30} El resultado final es la conversión de un segmento α -hélice a uno β -plegada de la región H1 localizada entre el dominio N-terminal y el dominio en barra de la proteína. Los cuatro dominios de bisagras flexibles (H1 a H4) de la distrofina^{17,18} confieren la flexibilidad necesaria para el soporte de la red de proteínas del citoesqueleto.³¹ Esta flexibilidad debe ser crucial en los procesos de contracción y relajamiento de las fibras musculares. Por otro lado, debe considerarse que las fibras del miocardio están sometidas a un trabajo constante a lo largo de toda la vida, por lo que el desgaste o la manifestación del daño se hace más evidente en este tejido.

De cualquier manera, el daño de la distrofina también se encuentra en el tejido muscular esquelético del paciente CDLX-1,⁶ el cual se evidencia por los niveles elevados de CK-MM. Muntoni y cols.³⁰ reportaron la expresión de las variantes de la distrofina (de músculo, cerebro y células de Purkinje) en un paciente con CDLX y encontraron que había una compensación de la expresión de distrofina en

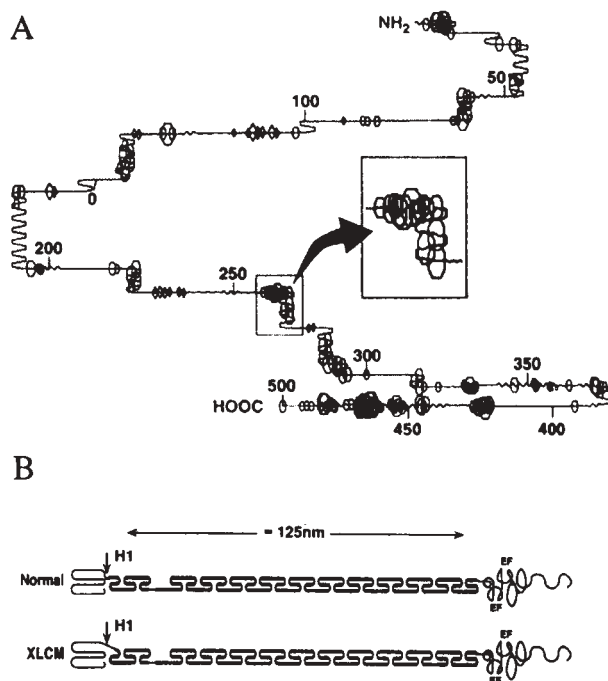


Fig. 3. Predicción computarizada de la estructura de la distrofina mutada en la familia CDLX-1. A. Distrofina normal y distrofina mutante (en el recuadro). Nótese el cambio estructural entre los aminoácidos 250 y 300 (flecha), el cual provoca un cambio en la estructura secundaria. B. La mutación T279A en la región H1 genera un cambio en la estructura secundaria que desestabilizaría la proteína.

músculo esquelético, conducida por el promotor de cerebro, mientras que en el corazón no había expresión alternativa de las otras dos isoformas mayores. Se puede especular que en los casos muy críticos, cuando la mutación en el gen de la distrofina conlleva a una expresión nula de la proteína, se activa el mecanismo compensatorio de la expresión de distrofina dirigido por el promotor de cerebro, pero esta compensación no se lleva a cabo en el miocardio. En la mayoría de los casos de DMD y DMB (aproximadamente el 85%), la mutación en el gen de la distrofina genera proteínas de tamaños diferentes y con función alterada, pero en la CDLX la producción de distrofina está completamente abolida. Es posible que la mutación que altera la bisagra I produzca desestabilización y degradación de la proteína. Reiss y Rininsland¹⁶ describieron un caso de empalme alternativo, que elimina completamente el exón 9 y encontraron que aproximadamente el 50% de los transcritos estudiados en linfocitos de sangre periférica presentaban este cambio, el cual no se observaba en los transcritos de músculo esquelético ni cardíaco. Adicionalmente, cuando se analiza la secuencia del gen después de la delección completa del exón 9, se observa que no existe rompimiento en el marco de lectura que altere la secuencia del RNAm, apoyando también el trabajo de Koenig y cols.,¹⁹ en el que se reportan mutaciones en el exón 9 que resultan en fenotipo DMB.

En la familia CDLX-3 la mutación origina un cambio de G por T, alterando la posición +1 del sitio donador del empalme, que debe reunir a los exones 1 y 2. Ya que la G al inicio del sitio 5' del empalme es una posición altamente conservada en eucariontes, esta mutación genera sin lugar a duda un cambio que afecta la maduración normal del RNAm. La destrucción del sitio 5' de empalme impide la remoción del intrón 2, que es muy largo (mayor 200 Kb) y predice la producción de un RNAm seguramente inestable. Dado el tamaño de este intrón, es probable que exista algún sitio crítico de empalme alternativo a lo largo de éste, lo cual no excluye que un RNAm aberrante pueda originarse, el cual no sería amplificable por PCR.

Las dos mutaciones identificadas difieren de las reportadas por Muntoni y cols.^{30,32} en pacientes con el mismo cuadro, por lo que se puede especular que el fenotipo CDLX resulta de diversas mutaciones en el gen de distrofina, las cuales están localizadas en una región crítica del extremo 5', que se-

lectivamente afecta la expresión de la proteína en el miocardio.

Conclusión

Dependiendo del tipo de mutación presente en el gen de la distrofina, se puede inducir o no la expresión compensatoria de las isoformas de distrofina, capaces de prevenir la miopatía en los varones afectados. De acuerdo al trabajo de Muntoni,³⁰ la transcripción de estas isoformas está severamente disminuida en el corazón. Estos hallazgos son consistentes con el daño cardíaco selectivo en estos pacientes. Nuestras observaciones señalan la existencia de un mecanismo selectivo de regulación al inicio de la transcripción de los diferentes promotores de la distrofina en estos dos tejidos.

Agradecimientos

ROL está auspiciada por el programa de Repatriación de Científicos Mexicanos del CONACYT.

Resumen

Se analizaron tres familias con CDLX, para determinar por qué esta distrofinopatía afecta selectivamente al miocardio. Se estudió el gen de la distrofina, su RNAm y su proteína en sujetos afectados y controles. Se detectaron mutaciones en el exón 9, que implicaría la producción de una distrofina inestable por daño de la bisagra I de ésta; y otra en el intrón 1, que altera el sitio de empalme del gen y produce un transcrito anormal. Ninguna de las mutaciones descubiertas ha sido descrita en pacientes con DMD/DMB. Sugerimos que estas mutaciones afectan particularmente al miocardio y explican el fenotipo de CDLX.

Palabras clave: Cardiomiopatía, distrofina, mutación, empalme, estructura secundaria.

Abstract

We analyzed 3 families with X-linked dilated cardiomyopathy (XLDC) to understand the selective mechanisms responsible for myocardial damage. The dystrophin gene, its mRNA and protein were studied in the affected families and healthy controls. Two mutations affecting intron 1 and exon 9 were found.

The first mutation implies the production of an unstable dystrophin in which the hinge I (HI) is damaged. In the second case, a mutated splicing site generates an abnormal transcript. None of these mutations has been described in DMD/DMB patients. We suggest that these mutations affect particularly the myocardium and explain the XLDC phenotype.

Keywords: cardiomyopath, dystrophin, mutation, splicing, secondary structure.

Bibliografía

- Schalant RC, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, Sonnenblick EH. (1994). *The Heart, Arteries and Veins*. McGraw-Hill, Inc. 8th Edition. Capítulos 89,90 y 91. Pags:1609-1646.
- Braunwald E. (1988). Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Capítulo 15. W.B. Saunders Co. 5° edición.
- Towbin JA (1993). Molecular genetic aspects of cardiomyopathy. *Biochem Med Metab Biol.*, 49:285-320.
- Schewengert KO y Towbin JA. (1999). Genetic basis of inherited cardiomyopathies. *Current Opinion Cardiol.*, 10:312-321.
- Berko BA, Swift M. (1987). X-Linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.*, 316:1186-1191.
- Towbin JA, Hejmancik JF, Brink P, Belb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M. (1993). X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*, 87:1854-1865.
- Boyce FM, Beggs, AH Feener C, Kunkel LM. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88:1276-1280.
- Hoffman EP, Brown RH Kunkel LM. (1987). The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51:919-928.
- Roberts R.G. (1995). Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Advan Genet.*, (33):177-231.
- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*, 338:509-511.
- Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M. (1994). Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat.*, 4:1-11.
- Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, Mendell JR. (1995). Spectrum of small mutations in the dystrophin-coding region. *Am J Hum Genet.*, 57:22-23.
- Miller G, Lisco H, Stitt D. (1971). Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 137:1459-1465.
- Anderson N, Steinitz M, Koskimies S, Klein S, Maketa O. (1979). Establishment of specific antibody producing human lines by antigen preselection and Epstein-Barr virus (EBV-transformation). *J Clin Lab Immunol.*, 2:1-7.
- Chomczynski P. y Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162:156-159.
- Church GM and Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:1991-1995.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50:509-517.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53:219-228.
- Beggs AH, Koenig M, Boyce FM; Kunkel LM. (1990). Deletion of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.*, 86:45-48.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.*, 23:11141-11156.
- Ortiz-López R. (1999). Análisis molecular y caracterización de la cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Capítulo 4. pp 38 y 40.
- Nudel U, Zuck D, Elinat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D. (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in

- muscle and brain. *Nature*, 337:76-78.
23. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879.
 24. Marchuk D, Drumm M, Saulino A, (1990). Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.*, 19:1154.
 25. Salamov AA, Kolchanov NA, Lim HA, eds. (1994). Secondary structure prediction based on discriminant analysis. *Computer Analysis of Genetic Macromolecules*. World Scientific Inc., 352-364.
 26. Solovyev VV, Salamov AA, (1994). Predicting *a*-helix and *b*-strand segments of globular proteins. *Comput Appl Biosci.*, 10:661-669.
 27. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol.*, 120:97-120.
 28. Roberts RG, Coffey A, Bobrow M, Bentley DR. (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics.*, 16:536-538.
 29. Ahn AH and Kunkel L.M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. Review. *Nature Genetcs.*, 3:283-288.
 30. Muntoni F, Melis MA, (1995). Ganau A. Dubowitz V. A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J Clin Invest.*, 96:693-699.
 31. Koenig M, Kunkel LM. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem.*, 265:4560-4566.
 32. Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V. (1995). Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X-linked dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.*, 56:151-157.