



Nova Scientia

E-ISSN: 2007-0705

nova_scientia@delasalle.edu.mx

Universidad De La Salle Bajío

México

Canizales, S.; Salamanca, F.; García, N.; Arenas, D.
Identificación de mutaciones y diagnóstico molecular de portadoras en familias mexicanas con
distrofia muscular Duchenne/Becker
Nova Scientia, vol. 1, núm. 1, noviembre-abril, 2008, pp. 136-149
Universidad De La Salle Bajío
León, Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203315665008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revista Electrónica Nova Scientia

Identificación de mutaciones y diagnóstico molecular de portadoras en familias mexicanas con distrofia muscular Duchenne/Becker

¹Canizales, S., ¹Salamanca, F., ¹García, N. y ¹*Arenas, D.

¹Lab. de Genética Molecular, UIM Genética Humana, CMNSSXI, IMSS,
Distrito Federal, México

México

**Investigador responsable:* Dr. Diego J. Arenas Aranda. E-mail: arenasdi@gmail.com,
arenasdi@servidor.unam.mx

© Universidad De La Salle Bajío (México)

Resumen

Introducción: La Distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) es la miopatía hereditaria más frecuente en las poblaciones humanas. Se caracteriza por una debilidad muscular progresiva que ocasiona, para el tipo Duchenne, la muerte por falla cardíaca y/o respiratoria durante la segunda década de la vida. Para el tipo Becker las alteraciones musculares son menos severas y los pacientes generalmente sobreviven hasta la edad adulta. El gen DMD, responsable de la enfermedad, se localiza en el brazo corto del cromosoma X y se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X. La mutación más frecuentemente asociada a esta enfermedad es la eliminación genética de diversas partes del gen DMD.

La identificación del estado portador sólo se pudo realizar mediante estudios moleculares, debido a la ausencia de manifestaciones clínicas en las posibles portadoras.

En el presente trabajo se estudió la distribución de eliminaciones genéticas en el gen DMD de pacientes mexicanos con DMD/BMD y se identificaron portadoras para esta enfermedad en familias mexicanas con antecedentes de la miopatía y que no se habían estudiado previamente.

Método: Se obtuvo DNA y RNA de linfocitos de sangre periférica de pacientes con DMD/BMD y mujeres en riesgo, pertenecientes a familias mexicanas con antecedentes de esta enfermedad. La concentración e integridad de los ácidos nucleicos se determinó por espectrometría y electroforesis en geles de agarosa. Las eliminaciones genéticas se identificaron por ensayos de amplificación múltiple, analizándose los 2 puntos calientes de mutación y la región promotora del gen.

El diagnóstico molecular de portadoras se realizó mediante estudios de ligamiento genético empleando 5 marcadores microsatélites localizados en el gen DMD. En las familias en donde se identificó la eliminación genética el diagnóstico de portadoras se hizo mediante amplificación en cadena de la polimerasa acoplada a la síntesis de cDNA (RT-PCR).

Resultados: Se identificaron eliminaciones genéticas en 8/23 pacientes. En cuatro afectados se pudo definir la extensión de la eliminación, en uno de ellos, ésta también afectó a los genes cercanos GK y DAX-1. Se identificó un empalme alternativo en un paciente, lo que explicaría el

fenotipo leve que presenta. Con estudios de ligamiento genético y RT-PCR, 6/10 mujeres fueron portadoras.

Discusión o Conclusión: El porcentaje de eliminaciones genéticas en los pacientes estudiados fue menor al reportado en otras poblaciones. Un estudio con un mayor número de individuos permitirá saber si esta baja frecuencia es característica de nuestra población. El uso de estudios de ligamiento genético y de RT-PCR aumenta la posibilidad de definir el estado portador en mujeres pertenecientes a familias con DMD/BMD y así poder ofrecerles un adecuado consejo genético. Este es el primer trabajo realizado en México, donde se usó el RT-PCR como herramienta diagnóstica en esta distrofia, se identificó por primera vez, a nivel molecular, un paciente con Síndrome de genes continuos y se demostró un empalme alternativo en un paciente con esta miopatía para explicar su fenotipo.

Palabras Clave: DMD/BMD, Diagnóstico Molecular, PCR, RT-PCR, Enfermedad hereditaria humana.

Recepción: 05-09-08

Aceptación: 24-10-08

Abstract

Introduction: Duchenne/Becker muscular Dystrophy (DMD/BMD) is the most common hereditary miopathy in the human populations. It is characterized by a muscular progressive weakness that causes, for the Duchenne type, the death of the patient for cardiac and / or respiratory fault during the second decade of his life. For the Becker type, the muscular alterations are less severe and the patients generally survive up to the adult age. The DMD gene, responsible of the disease, is located in the short arm of the chromosome X and is inherited in recessive form joined to X chromosome.

The genetic deletions of some parts of DMD gene are the most frequent mutations associated with the disease. Due to the absence of clinical manifestations in the possible carriers, the identification of them only could be realized by means of molecular studies.

In the present work we studied the distribution of genetic deletions in the DMD gene of Mexican patients with DMD/BMD and in women who belonged to Mexican families with past history of the miopathy, the carrier status was determined. The patients and your relatives used in this study were not studied before.

Method: We obtained DNA and RNA of peripheral blood lymphocytes of patients with DMD/BMD and women in risk, who belong to Mexican families with past history of the disease. The concentration and integrity of the nucleic acids were determined with spectrometry and electrophoresis in agarosa gels. The genetic deletions were identified by multiplex amplification of the two hot spots mutations sites and promotor region of DMD gene. The carrier diagnosis was made by genetic linkage using 5 microsatellites located in the DMD gene. In the families where the genetic deletion was identified, the diagnosis of carriers was made by RT-PCR.

Results: The deletions were identified in 8/23 patients. In four of them, the extension of the deletion was delimited. In one patient the deletion affected two nearby genes, GK and DAX-1. An alternative splicing was identified in a patient, which would explain the slight phenotype that he presents. With linkage genetic and RT-PCR studies, 6/10 women were carriers.

Discussion: The percentage of deletions in our patients was minor to the reported in other populations. Other studies are necessary to do with a greater number of patients, for to know if this low frequency is typical of our population. The use of genetic linkage and RT-PCR studies increase the possibility to define the carrier status in Mexican women belonging to families with past history of the disease. With these studies we can offer them a genetic council suitable. This one is the first work done in Mexico in which the diagnosis of this myopathia was done by RT-PCR, is the first time in which a Mexican DMD patient, with continuous genes Syndrome, was characterized at molecular level, and we identified an alternative splicing in one patient with an atypical phenotype.

Keywords: DMD/BMD, Molecular diagnosis, PCR, RT-PCR, Human genetic disease.

Introducción

La distrofia muscular Duchenne-Becker (DMD/BMD) es la miopatía mejor conocida desde el punto de vista clínico y genético. Esta enfermedad se hereda en forma recesiva ligadas al cromosoma X, por lo que generalmente los hombres son los afectados y las mujeres son portadoras sanas (Iannaccone S). La incidencia de esta miopatía es de 1/3300-1/3700 nacimientos de hombres vivos (Chang *et al*).

La enfermedad se caracteriza por un debilitamiento muscular progresivo que ocasiona que los pacientes mueren generalmente entre los 15-19 años por trastornos respiratorios y falla cardíaca (Melaccini *et al*).

El gen de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), con un tamaño aproximado de 2500 kb, se localiza en el brazo corto del cromosoma X. Codifica para un mRNA de 14 kb. Éste se traduce en una proteína de 3685 aminoácidos presente en la parte interna de la membrana de la fibra muscular (Koenig *et al*). La principal causa mutacional asociada a este padecimiento es la eliminación genética de varias partes del gen DMD, con un 60%. Las duplicaciones y mutaciones puntuales también se han reportado asociadas a la DMD/BMD con una frecuencia, para cada una de ellas, entre 10 al 20% (Den Dunnen *et al*). Las eliminaciones genéticas se localizan con mayor frecuencia en dos regiones del gen DMD, denominadas punto caliente mayor y punto caliente menor. El primero se encuentra entre los exones 44-52 y el segundo en la región 5' del gen. (Love *et al*).

Con lo que respecta a la proteína producida por este gen, conocida como distrofina, hasta el momento no se conoce su función, sin embargo se cree que juega un papel importante en la estabilidad de la membrana durante la contracción y relajación muscular (Betto *et al*).

Actualmente se emplean diversas estrategias moleculares para identificar y determinar la extensión de las eliminaciones genéticas en el gen DMD de tal forma que es posible saber si la distrofina producida por el paciente es o no funcional. Una de las técnicas más usadas es la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), que ha facilitado enormemente la detección de las eliminaciones genéticas. Se han diseñado diversos sistemas de amplificación múltiple, que amplifican conjuntamente varias regiones de los puntos calientes de eliminaciones genéticas del gen DMD. Con esta metodología es posible detectar del 65-70% de las mutaciones en los individuos afectados por DMD/DMB. Con lo que respecta a las portadoras, la forma de

identificarlas es mediante estudios de ligamiento, en los cuales básicamente se visualizan los productos de amplificación de microsatélites de todos los miembros de la familia. Para que alguna de las mujeres sea portadora debe compartir el mismo producto de amplificación que el individuo afectado (Arenas *et al*). Mediante el análisis del RNA mensajero (mRNA) del gen DMD también se pueden definir portadoras, siempre y cuando se haya identificado previamente la eliminación en el paciente (Roberts *et al*). En nuestro país se han realizado algunos trabajos moleculares en la DMD/BMD, en donde se han identificado mutaciones en el gen DMD (Coral *et al*, Coral *et al*) y determinado el estado portador en mujeres en riesgo (Arenas *et al*). En este trabajo se identificaron eliminaciones genéticas en otro grupo de pacientes con esta miopatía y se usaron dos metodologías diferentes para definir portadoras.

Métodos

Se estudiaron 22 pacientes con DMD/BMD y sus familiares. Todos los pacientes estudiados fueron mexicanos, con padres y abuelos nacidos en nuestro país. En este estudio solo participaron los individuos que firmaron carta de consentimiento informado. Cuando éstos eran menores de edad, la carta fue firmada por los padres o tutores.

El diagnóstico clínico de la DMD/BMD se realizó por la determinación de los niveles de la enzima creatinina fosfocinasa en suero y por la identificación de una serie de características clínico-patológicas características de esta enfermedad como pseudo hipertrofia de los músculos gemelos, anormalidades histológicas y electromiográficas, entre otras.

El DNA se obtuvo de linfocitos aislados de sangre periférica mediante el método descrito por Kempter (Kempter B) y fue purificado mediante extracciones fenólicas. La concentración del DNA se determinó mediante espectrometría UV a 260/280 y la integridad mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y Russell).

El RNA se obtuvo de linfocitos de sangre periférica previamente aislados mediante un gradiente de Ficoll-Hipaque. Las células fueron tratadas con Trizol (InVitrogen) para obtener el RNA. Este fue cuantificado mediante espectrometría UV a 260/280 y su integridad se determinó en geles de agarosa, por la presencia de las bandas 28S y 18S de RNA ribosomal (Sambrook y Russell).

La identificación de las eliminaciones genéticas en el gen DMD se realizó mediante PCR múltiple de los exones del punto caliente mayor de eliminación (exones 44-52) y del punto caliente menor de eliminación (exones 4-19). En los ensayos de PCR múltiple también se co-

amplificaron los exones 70, 74 y el promotor del gen DMD. Para determinar la extensión de la eliminación genética en uno de los pacientes, se amplificaron las regiones 5' y 3' del gen DAX-1 y el exon 6 del gen GK. Las reacciones de PCR múltiple se trabajaron con las siguientes co-amplificaciones: exones 4/8/12/13, exones 17/70, exones 19/74, exones 44/48/49, exones 45/46/52, exones 47/50/51 y promotor del gen DMD/exon 49. Para el paciente con la eliminación que abarcó al menos 2 genes vecinos se co-amplificaron: promotor del gen DMD/exon 6 del gen GK/región 5' del gen DAX-1/región 3' del gen DAX-1.

En general las condiciones de amplificación para cada reacción fueron: 2.5 uds de Taq polimersa (InVitrogen), 100-200 ng de DNA, 200 μ M de cada dNTP, 12.5 pmoles de cada oligonucleótido y 1.5 mM de MgCl₂. Las reacciones se hicieron en un termociclador RoboCycler Gradient 40 (Stratagene). La temperatura media de fusión (TM) fue de 55°C para todas las co-amplificaciones. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. En todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular (escaleras de 50 o 100 pb).

Para la reacción de RT-PCR, de 50-100 ng de RNA total se usó para sintetizar DNA de cadena sencilla (cDNA) mediante transcriptasa reversa y oligo-dT (InVitrogen). El cDNA se usó como molde para el PCR empleando las mismas condiciones del PCR múltiple.

La identificación de portadoras se hizo mediante ensayos de PCR usando 5 marcadores microsatélites localizados en los intrones 44, 45, 49 y 52, y en las regiones 5' y 3' del gen DMD, de acuerdo a las condiciones reportadas por varios grupos de investigadores. (Arenas *et al*, Clemens *et al*, Feenner *et al*, Powell *et al*). Durante las reacciones de PCR se incorporó un isótopo radioactivo (³²P). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-urea. El gel se secó y fue expuesto a una placa autoradiográfica para identificar los productos de amplificación (Sambrook y Russell).

Resultados

Se identificaron eliminaciones genéticas mediante PCR múltiple en 8/23 pacientes con DMD/BMD. En la figura 1 se muestran fotografías de geles de agarosa en donde se observan los productos de amplificación de varios afectados por DMD/BMD. En este caso se amplificó la región que corresponde al punto caliente mayor de eliminación (exones 44-52). El enfermo 4.1 con distrofia tipo Becker y el paciente 18.1 solo tiene eliminado un exon, a los pacientes 6.1, 11.3, 13.1 les faltan varios exones y los pacientes 5.1 y 22.1 no tienen eliminaciones en la región analizada.

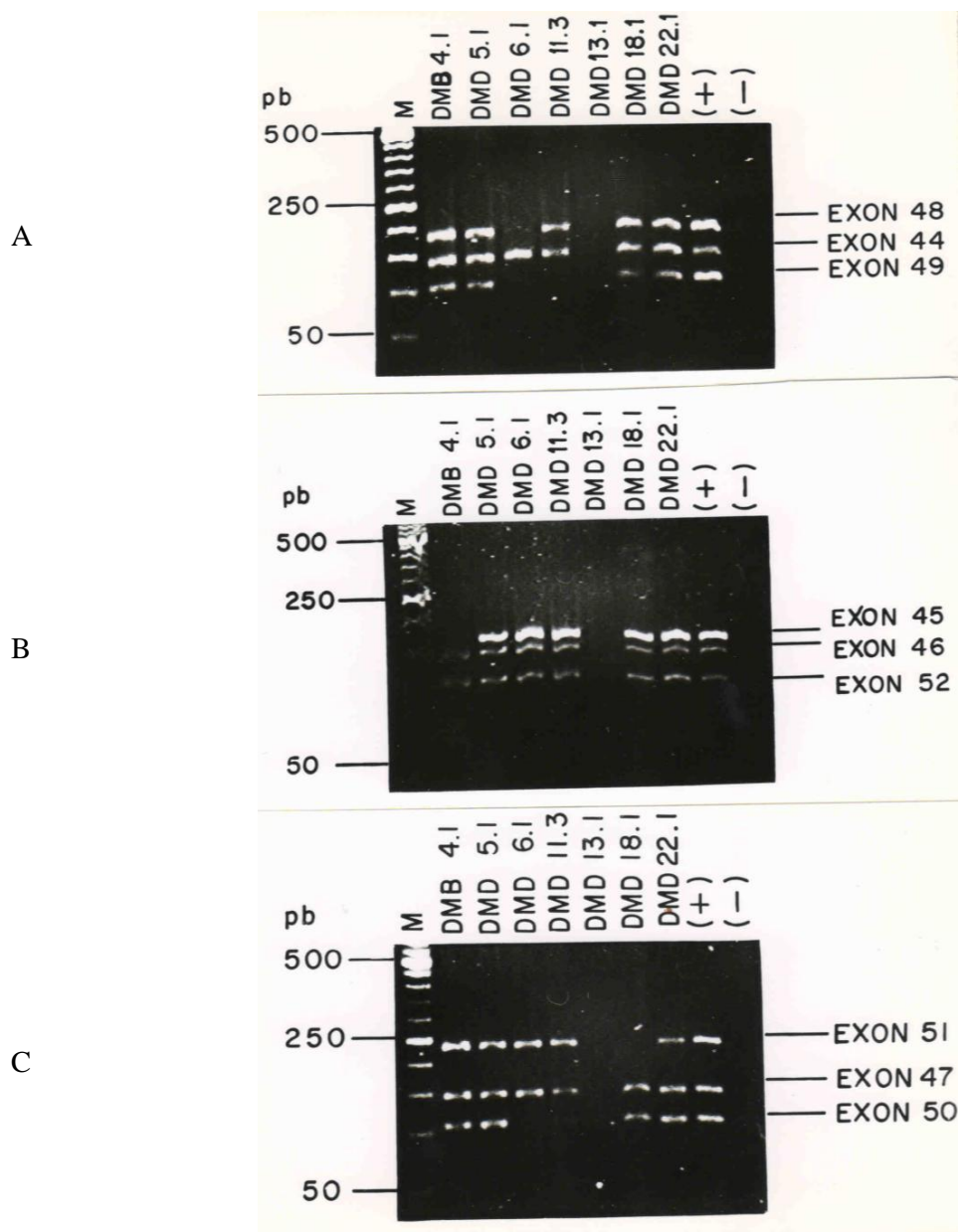


Figura 1. Identificación de eliminaciones genéticas en pacientes con DMD/BMD. En geles de agarosa se muestra la amplificación múltiple del punto caliente mayor de mutación, de 7 afectados por DMD/BMD. A= PCR múltiple de exones 44, 48, 49. B= PCR múltiple de exones 45, 46, 52. C= PCR múltiple de exones 47, 50, 51. (+)= Control positivo. (-)= Control negativo. M= Marcador de peso molecular (escalera de 50 pb).

En la tabla 1 se describe las eliminaciones encontradas en los pacientes estudiados. El porcentaje de eliminaciones fue de un 34%, distribuyéndose con un mismo porcentaje en ambos puntos calientes de mutación. En el paciente 4.1 no se encontró una correlación entre la eliminación identificada y el fenotipo esperado.

Tabla 1. Eliminaciones genéticas en individuos mexicanos con DMD/BMD.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXONES ELIMINADOS
1.3	DMD	-
2.1	DMD	-
3.1	DMD	-
4.1	BMD	45
5.1	DMD	4-19
6.1	DMD	48-50
7.1	DMD	-
8.3	DMD	-
9.1	DMD	-
10.1	DMD	-
10.2	DMD	-
11.3	DMD	49-50
12.2	DMD	-
13.1	DMD	dmd/GK/DAX-1
14.1	DMD	-
15.1	DMD	-
16.3	DMD	-
17.1	DMD	-
18.1	*	51
19.1	DMD	-
20.1	DMD	-
21.1	DMD	12
22.1	DMD	P-13

DMD= Distrofia muscular de Duchenne.

BMD= Distrofia muscular de Becker.

(-)= Sin eliminación.

GK= Gen de la glicerol cinasa.

DAX-1= Gen asociado a hipoplasia adrenal congénita.

P= Promotor del gen DMD.

dmd= Gen de la Distrofia muscular de Duchenne.

En la fig 2 se muestran los productos de amplificación de este paciente y su madre, obtenidos a partir del RNA de sus linfocitos. Como se puede observar existe un empalme alternativo que restaura el marco de lectura del gen, por lo que el paciente puede producir una distrofina parcialmente funcional, que explicaría por qué tiene un fenotipo tipo Becker. Por otro lado uno de los paciente estudiados presentó una gran eliminación de aproximadamente 4 megabases, que abarca toda la región codificante del exon DMD y dos genes adyacentes GK y DAX-1 (dato no mostrado).

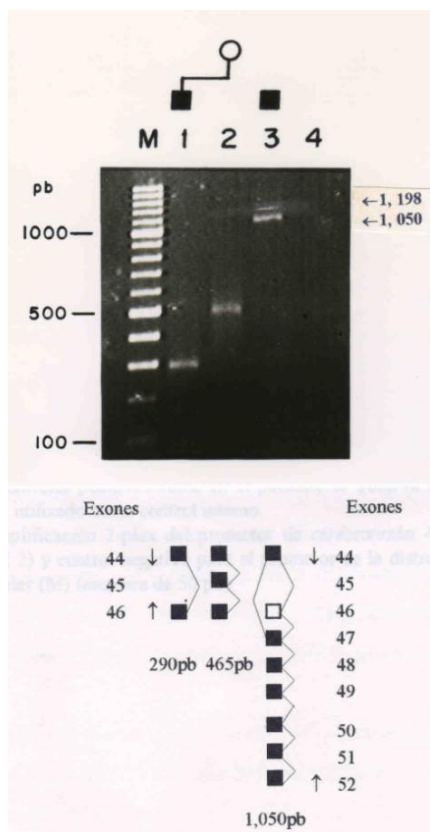


Figura 2. Empalme alternativo que restaura el marco de lectura en el paciente 4.1 afectado con distrofia tipo Becker (eliminación exon 45). Se muestran un gel de agarosa con los productos obtenidos mediante RT-PCR de una familia con DMD/BMD. En la parte inferior del gel se esquematizan las diferentes maneras en que se puede empalmar el mRNA, entre los exones 44-52. Las flechas verticales indican los oligonucleótidos usados en las reacciones de RT-PCR. Los cuadros llenos muestran los exones presentes en el DNA y mRNA, los cuadros faltantes corresponden a exones eliminados y el cuadro vacío representa un exón presente en el DNA pero no en el mRNA. Carriles 1 y 3= Paciente 4.1. Carril 2= Madre. Carril 4= Control negativo. M= Marcador de peso molecular (escala de 100 pb).

La detección de portadoras se hizo con dos estrategias diferentes, estudios de ligamiento genético empleando marcadores microsatélites de CA y RT-PCR. Esta última estrategia se usó en familias en donde previamente se había identificado alguna eliminación en el gen DMD. De un total de 11 mujeres en riesgo de ser portadoras pertenecientes a 4 familias con antecedentes de DMD/BMD, se identificaron 6 portadoras y cinco no portadoras, con una certeza de la prueba del 99%.

Discusión

En este trabajo se realizó el estudio molecular de 23 pacientes con DMD/BMD y se determinó el estado portador en mujeres pertenecientes a familias mexicanas con antecedentes de esta enfermedad. La identificación y delimitación de la extensión de las eliminaciones genéticas en el gen DMD se realizó mediante amplificación múltiple de 17 exones ubicados en las 2 regiones con mayor frecuencia de eliminaciones. Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se diseñaron para poder amplificar cDNA derivado del mRNA del gen DMD y para determinar si el marco de lectura del gen DMD con una eliminación genética queda o no en fase.

La frecuencia de eliminaciones en los individuos analizados en este trabajo fue del 34%, una de las más bajas reportadas, ya que en otras poblaciones, incluyendo una mexicana, las frecuencias andan entre el 50-70% (Coral *et al*, Coral *et al*). Esta baja frecuencia puede ser resultado del bajo número de individuos analizados, por lo que es necesario ampliar el número de pacientes. Otro dato interesante sobre las eliminaciones encontradas en nuestro grupo de pacientes fue la distribución similar de éstas, en los 2 puntos calientes de eliminación del gen DMD. Con lo que respecta a los pacientes sin eliminaciones, probablemente tengan mutaciones puntuales en otros exones del gen DMD. Varios grupos han reportado alta frecuencia de mutaciones puntuales en los exones 19, 70 y 74 (Prior *et al*), sin embargo el estudio de la distribución de mutaciones puntuales es difícil de realizar debido al gran tamaño del gen DMD.

El paciente 4.1, afectado por la distrofia tipo Becker, tuvo una eliminación del exon 45, que ocasiona que se rompa el marco de lectura del gen DMD y se produzca una distrofina no funcional. Esta aparente falta de correlación entre el fenotipo (distrofia tipo Becker) y genotipo (eliminación que rompe el marco de lectura) en este paciente, se resolvió mediante la demostración de un empalme alternativo que restaura el marco de lectura, como se muestra en la Figura 2.

El paciente 13.1 tenía un fenotipo compatible con un Síndrome de genes contiguos. Desde el punto de vista clínico presentó DMD/BMD, hipoplasia adrenal congénita y deficiencia de glicerol cinasa, por lo que en este trabajo se diseñaron una serie de oligonucleótidos para identificar y delimitar la extensión de la eliminación genética. Encontramos que el gen DMD presentó una eliminación desde el exón 4, con presencia del promotor. La eliminación se extendió a los genes GK y DAX-1, lo que explica el fenotipo del paciente. Este es el primer afectado por Síndrome de genes contiguos (DMD/BMD-GK-DAX-1) reportado en México y esta nueva estrategia metodológica es una forma rápida y sencilla para detectar eliminaciones en los genes GK y DAX-1.

Las mujeres portadoras para la DMD/BMD son asintomáticas por lo que es de suma importancia desarrollar metodologías que permitan definir el estado portador en ellas. Existen algunas pruebas clínicas para definir portadoras, sin embargo son poco precisas. La clonación del gen DMD permitió identificar secuencias polimórficas intra y extragénicas (Koenig *et al*), usadas para identificar portadoras mediante estudios de ligamiento genético. La certeza diagnóstica de estos marcadores genéticos es cercana al 99%, cuando se emplean, al menos, 4 marcadores genéticos. En familias en donde no está claro si hay antecedentes de la enfermedad o se ha identificado eventos de recombinación, los microsatélites no son útiles para la identificación de portadores, sin embargo, sí en los afectados pertenecientes a estas familias se ha identificado alguna eliminación genética en el gen DMD, el diagnóstico de portadoras se puede realizar mediante RT-PCR, con una certeza del 99%.

Los estudios moleculares de las enfermedades genéticas son las mejores herramientas disponibles para conocer, diagnosticar y tratar estas patologías.

Agradecimientos

Se agradece a los afectados por la DMD/BMD y sus familiares por su participación en el estudio, deseando que en un futuro cercano el desarrollo científico permita revertir esta enfermedad.

Referencias

Arenas D, Coral R, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Méndez J, Martínez C, Montañez C. (1996). Carrier detection in Duchenne and Becker muscular dystrophy, using dinucleotide repeat polymorphisms. A study in mexican fami-

- lies. Arch Med Res (27): 151-156.
- Betto R, Biral D, Sandona D. (1999). Functional roles of dystrophin and of associated proteins. New insights for the sarcoglycans. Ital J Neurol Sci (20): 371-379
- Chang Y, Mendell R. (1992). The Childhood Muscular Dystrophies: Making Order Out of Chaos. Seminars Neurol. 9-23.
- Clemens P, Fenwick R, Chamberlain J, Gibbs R, De Andrade M, Chakraborty R, Caskey T. (1991). Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. Am J Hum Genet (49): 951-960.
- Coral R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman S, Salamanca F, Montañez C. (1993). Analysis of Dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. Arch Med Res (24): 1-6.
- Coral R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montañez C. (1997). Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: The use of new designed primers for the analysis of major deletion "hot spot" region. Am J Med Genet (70): 240-246.
- Den Dunnen J, Bakker E, Breteler E, Pearson P, van Ommen G. (1987). Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. Nature (329): 640-642.
- Feener C, Boyce F, Kunkel L. (1991). Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: Application to 5' region of the dystrophin gene. Hum Genet (48): 621-627
- Iannaccone S. (1992). Current Status of Duchenne Muscular Dystrophy. Pediatr Neurol (39): 879-894.
- Kempter B. (1992). Quick preparation of high molecular weight by freezing. TIG (8): 7-8.
- Koenig M, Hoffman E, Beterlson C, Monaco A, Feener C, Kunkel L. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell (53): 219-228.
- Koenig M, Monaco A, Kunkel L. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell (53): 219-228.
- Love D, Forrest S, Smith T, England S, Flint T, Davies K, Speer A. (1989). Molecular analy-

- sis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull* (45): 659-680.
- Melaccini P, Vianello A, Villanova C. (1996). Cardiac and Respiratory Involvement in Advanced Stage Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromusc Disord* (6): 367-376.
- Powell J, Fodor F, Cockburn D, Monaco A, Craig I. (1991). A dinucleotide repeat polymorphism at the DMD locus. *Nucleic Acids Res* (19): 1159.
- Prior T, Bartolo C, Papp A, Snyder P, Sedra M, Burghes A, Mendell J. (1996). Nonsense mutations in a Becker muscular dystrophy and an intermediate patients. *Hum Mut* (7): 72-75.
- Roberts R, Barby T, Manners E, Bobrow M, Bentley D. (1991). Direct detection of Dystrophin gene rearrangements by analysis of Dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet* (49): 298-310.
- Sambrook J, Russell D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. 3 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.