

## **2. MATERIAL I MÈTODES**

---

## **2.1 MATERIAL BIOLÒGIC**

El material biològic processat es va obtenir a partir de mostres de sang perifèrica (SP) i tumorals de pacients afectats de Rb i dels seus familiars, i d'una mostra de vellositats corials, procedents del Servei d'Oftalmologia de l'Hospital Materno-Infantil de la Vall d'Hebron (Barcelona), del Servei de Genètica de la Corporació Parc Taulí (Sabadell), del Servei d'Oftalmologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona), i del Centre de Patologia Cel·lular i diagnòstic prenatal (CPC) (Barcelona).

### **2.1.1 Pacients**

A la taula 1 s'especifiquen les característiques clíniques i el tractament seguit pels 61 individus afectes estudiats.

La figura 2 correspon als arbres genealògics de les 9 famílies en que hi ha més d'un membre afecte.

### **2.1.2 Mostres de sang perifèrica**

Es van obtenir 60 mostres d'entre 0.5-5ml de sang en heparina sòdica (1%) per a l'estudi citogenètic, de les quals 48 corresponen a individus afectes i 12 a parents sans, i 118 mostres d'entre 0.5-15 ml de sang en EDTA tripotàssic per a l'estudi molecular, de les que 60 corresponen a pacients afectes i 58 a parents sans (taules 1 i 2). Les mostres es conservaren refrigerades fins a ser processades.

### **2.1.3 Mostres de teixit tumoral**

Es van obtenir 10 mostres de teixit tumoral a partir de biòpsies de peces d'exenteració ocular, immerses immediatament en nitrogen líquid fins el seu processat (taula 2).

### **2.1.4 Mostra de vellositats corials**

Es va obtenir una mostra de vellositats corials pel seu estudi citogenètic i molecular (taula 2).

Taula 1: característiques clíniques i tractament dels pacients estudiats

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>A</b>	<b>HF</b>	<b>ED</b>	<b>sexe</b>	<b>síntomes</b>	<b>tractament</b>	<b>E</b>	<b>AP</b>	<b>GS</b>
<b>A</b>	92-4Rb	UL(UE)	-	ND	M			Sí(UE)	ND	Sí
<b>B</b>	92-7Rb	UL(ND)	+	ND	M			ND		No
	92-8Rb	UL(ND)	+	ND	M			ND		No
<b>C</b>	92-11Rb	BL	-	4m	M		E/RT/QT	Sí(UE)	INO	Sí
<b>D</b>	92-14Rb	BL	-	3m	M	nistagmus, leucocòria, calcificació i DR	RT/QT	No		ND
<b>E</b>	92-17Rb	BL	-	6m	M	leucocòria	E	Sí(BL)	ND	ND
<b>F</b>	92-20Rb	BL	-	2m	M	leucocòria, glaucoma, calcificació i DR	RT/RTS/CT/E	Sí(BL)	NINOC	ND
<b>G</b>	92-21PRb	BL	+	40d	M		E	Sí(BL)	ND	ND
	92-23Rb	BL	+	2m	F	leucocòria i calcificació	RT/QT/CT/E	Sí(UE)	NINOC	Sí
<b>H</b>	92-26Rb	BL	-	9m	F	leucocòria i calcificació	RT/QT/E	Sí(BL)	INOC	Sí
<b>I</b>	93-29Rb	BL	-	5m	F	leucocòria DR	RT/RTS/QT/CT/FC	Sí(UD)	NINOC	ND
<b>J</b>	93-30Rb	UL(UE)	-	3m	M	leucocòria, estrabisme i calcificació	RT	No		ND
<b>K</b>	93-33Rb	BL	-	24m	F	exotropia, leucocòria, calcificació i DR	RT/QT/E	Sí(UD)	NINOC	ND
<b>L</b>	93-36Rb	BL	+	11m	F	leucocòria		ND		No

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>A</b>	<b>HF</b>	<b>ED</b>	<b>sexe</b>	<b>síntomes</b>	<b>tractament</b>	<b>E</b>	<b>AP</b>	<b>GS</b>
	93-37Rb	BL	+	9m	F	leucocòria	FC/RT	No		No
	93-38Rb	BL	+	6m	M	visualització tumor en examen rutinari	RT/CT/FC	No		No
<b>M</b>	93-41Rb	BL	+	ND	M			Sí(UD)	ND	Sí
<b>N</b>	93-45Rb	UL(UE)	-	27m	M	leucocòria i calcificació	E	Sí(UE)	NINOC	Sí
<b>O</b>	93-48Rb	UL(UE)	-	15m	F	estrabisme, leucocòria, glaucoma i calcificació	QT/E	Sí(UE)	INO	ND
<b>P</b>	93-51Rb	BL	-	18m	M	leucocòria i calcificació	RT/QT/E	Sí(BL)	INO	Sí
<b>Q</b>	93-53MRb	BL	+	8m	F			Sí(UE)	ND	ND
	93-55Rb	BL	+	7m	F		FC/RT/E	Sí(UE)	INO	Sí
<b>R</b>	93-58Rb	BL	-	32m	M	leucocòria, calcificació, DR, vitri tèrbol	RT/RTS/QT	Sí(UE)	NINOC	ND
<b>S</b>	93-60MRb	BL	+	24m	F		E	Sí(BL)	ND	Sí
	93-61Rb	BL	+	2m	F	visió tumors en examen rutinari.	RT/QT	No		No
						Calcificació				
<b>T</b>	93-64Rb	BL	-	12m	F	leucocòria, estrabisme, calcificació	E/RT	Sí(UE)	NINOC	ND
<b>U</b>	93-68Rb	BL	-	11m	M	leucocòria, calcificació	E/RT/QT	Sí(UE)	INO	ND
<b>V</b>	93-71Rb	UL(UE)	-	9m	F	llagrimaig, leucocòria, calcificació	RT	No		Sí

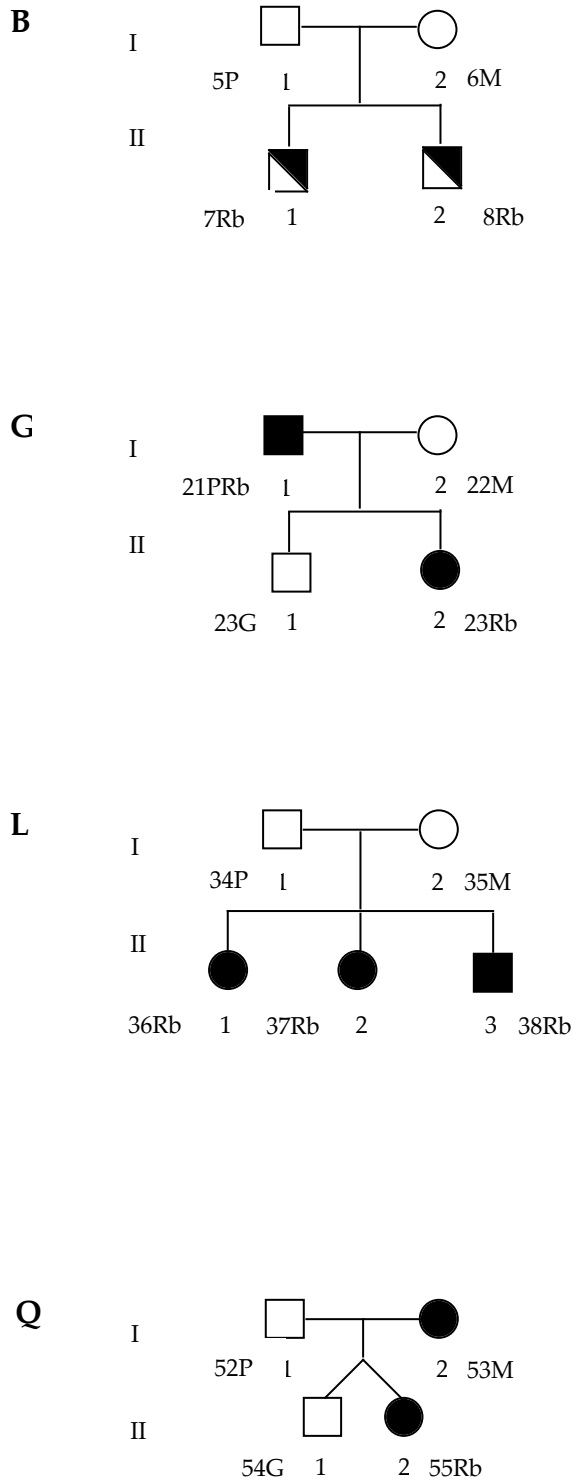
<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>A</b>	<b>HF</b>	<b>ED</b>	<b>sexe</b>	<b>síntomes</b>	<b>tractament</b>	<b>E</b>	<b>AP</b>	<b>GS</b>
X	93-73Rb	BL	-	8m	M	leucocòria, calcificació	QT/RT	No		Sí
Y	93-76Rb	UL (UE)	-	9m	M	leucocòria, calcificació	RT	No		Sí
Z	93-78MRb	BL	+	12m	F		E	Sí(UE)	ND	ND
	93-79Rb	BL	+	3m	M	leucocòria	RT/E	Sí(UE)	NINOC	No
AA	93-82Rb	BL	-	19m	F	estrabisme, leucocòria, calcificació	QT/RT/E	Sí(UD)	NINOC	ND
AB	93-83Rb	BL	-	24m	M	estrabisme, leucocòria	RT/E	Sí(UD)	NINOC	Sí
AC	93-86Rb	UL (UD)	-	36m	M	leucocòria, calcificació	RT/FC	No		Sí
AD	93-88Rb	UL (UE)	-	12m	F	leucocòria i estrabisme	E	Sí(UE)	NINOC	ND
AE	93-89Rb	UL (UE)	-	24m	F	leucocòria	E	Sí(UE)	NINOC	ND
AF	93-93Rb	UL (UD)	-	10m	M	leucocòria, calcificació	QT/E	Sí(UD)	NINOIC	Sí
AG	93-94Rb	UL (UD)	-	ND	F	glaucoma		Sí(UD)	ND	Sí
AH	93-95Rb	UL (UE)	-	36m	F	estrabisme, leucocòria, calcificació	RT/QT/E	Sí(UE)	INO	Sí
AI	93-96Rb	UL (UE)	-	33m	M	leucocòria, calcificació	E	Sí(UE)	NINOC	ND
AJ	93-97Rb	UL (UE)	-	36m	F	leucocòria, calcificació	E	Sí(UE)	NINOC	Sí
AK	93-98Rb	UL (UD)	-	6m	M	leucocòria, estrabisme, calcificació	RT/QT/E	Sí(UD)	ND	Sí

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>A</b>	<b>HF</b>	<b>ED</b>	<b>sexe</b>	<b>síntomes</b>	<b>tractament</b>	<b>E</b>	<b>AP</b>	<b>GS</b>
AL	93-99Rb	UL(UE)	-	20m	M			ND		ND
AM	93-102Rb	BL	-	9m	M	estrabisme, leucocòria, calcificació, DR	E	Sí(UE)	NINOC	ND
AN	94-103PRb	BL		ND	M			Sí(ND)	ND	ND
	94-105Rb	UL(ND)	+	ND	M			ND		No
	94-106Rb	BL	+	2m	M			Sí(UD)	-	No
AO	94-107Rb	UL(UD)	-	30m	F	leucocòria, calcificació	E	Sí(UD)	NINOC	Sí
AP	94-108Rb	BL	-	6m	M	nistagmus, estrabisme, calcificació, DR, glaucoma	QT/E	Sí(BL)	NINOC	Sí
AQ	94-109Rb	UL(UD)	-	72m	M	pèrdua visió, calcificació	E/QT	Sí(UD)	NINOIC	Sí
AR	95-110Rb	UL(UE)	-	98m	M	leucocòria, pèrdua visió, calcificació, DR, vitri tèrbol	E	Sí(UE)	INO	Sí
AS	95-111Rb	UL(UE)	-	24m	F	vermellor d'ull, calcificació	QT/E	Sí(UE)	INO	ND
AT	95-112Rb	UL(UE)	-	24m	F	leucocòria, calcificació	E/QT	Sí(UE)	ND	ND
AU	95-113Rb	UL(UE) MF	-	50m	M	leucocòria, calcificació	E	Sí(UE)	ND	ND
AV	98-115TRb	BL	+	15m	F	leucocòria, vitri tèrbol, DR	E/QT/RT	Sí(UD)	ND	Sí

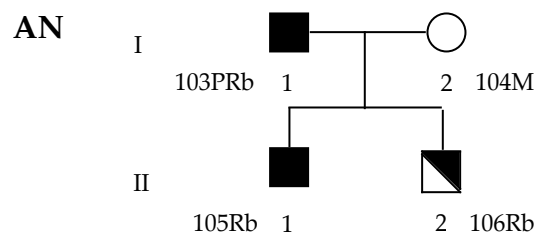
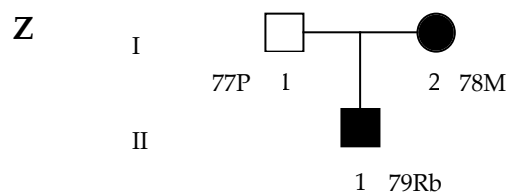
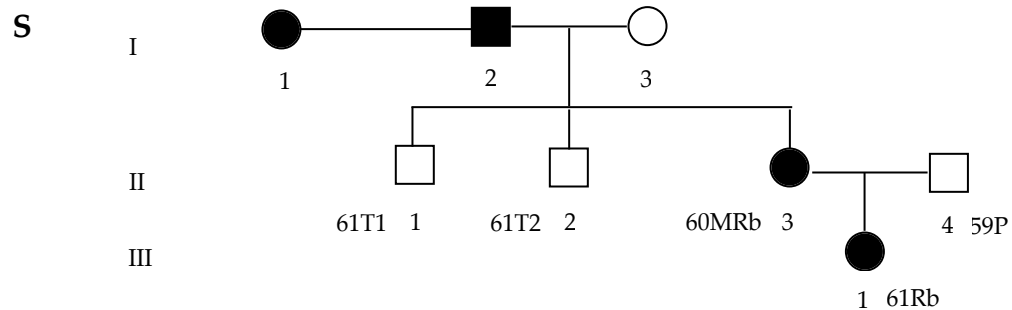
<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>A</b>	<b>HF</b>	<b>ED</b>	<b>sexe</b>	<b>símptomes</b>	<b>tractament</b>	<b>E</b>	<b>AP</b>	<b>GS</b>
	98-116Rb	BL	+	2m	M	leucocòria	QT/RT	No		Sí
<b>AX</b>	99-118PRb	BL	+	ND	M			Sí (BL)	ND	Sí
	99-120Rb	BL	+	6m	M			Sí (UE)	ND	No
	99-121Rb	BL	+	ND	M			No		No
	CPCRb	BL	-		M			Sí	ND	No

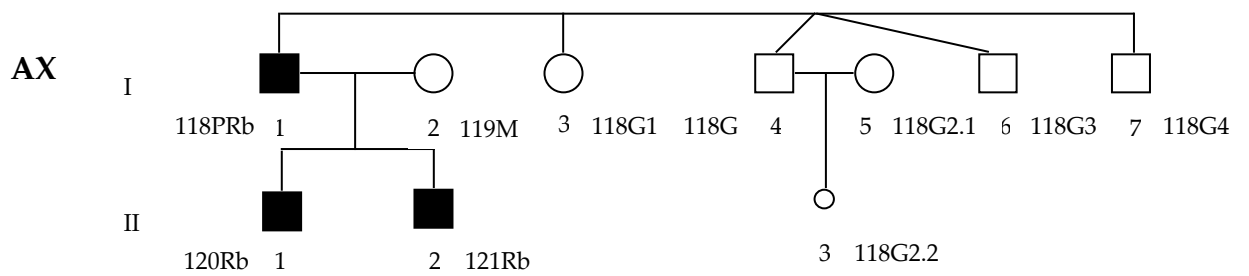
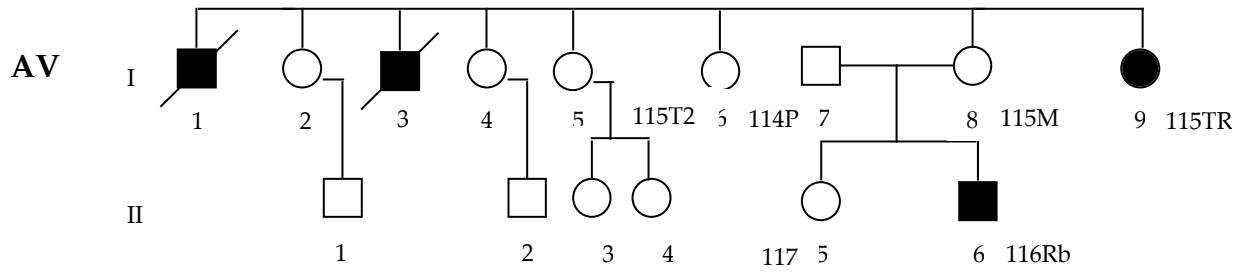
A: afectació; HF: història familiar de Rb; ED: edat al diagnòstic; E: enucleació; AP: resultat anatomia patològica; GS: germans sans; UL: unilateral; BL: bilateral; MF: multifocal; UE: ull esquerre; UD: ull dret; DR: desprendiment de retina; RT: radioteràpia; RTS: radioteràpia sectorial; QT: quimioteràpia; CT: crioteràpia; FC: fotocoagulació; INO: invasió nervi òptic; INOC: invasió nervi òptic i coroides; NINOC: no invasió nervi òptic ni coroides; P: pare de pacient afecte; M: mare de pacient afecte; Rb: pacient afecte; m: mesos; d: dies; M(en sexe): mascle; F: femella; ND: dada no determinada.








Fig.2: arbres genealògics de famílies amb més d'un membre afecte









-  Home normal
-  Dona normal
-  Home amb Rb unilateral
-  Home amb Rb bilateral
-  Dona amb Rb bilateral
-  Home finat
-  fetus

Taula 2: mostres obtingudes

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>afectació</b>	<b>sexe</b>	<b>m heparina</b>	<b>m EDTA</b>	<b>m tumor</b>
<b>A</b>	92-1P	-	M	-	Sí	-
	92-2M	-	F	-	Sí	-
	92-3G	-	M	-	Sí	-
	92-4Rb	UL(UE)	M	Sí	Sí	-
<b>B</b>	92-5P	-	M	-	Sí	-
	92-6M	-	F	-	Sí	-
	92-7Rb	UL(ND)	M	Sí	Sí	-
	92-8Rb	UL(ND)	M	Sí	Sí	-
<b>C</b>	92-9P	-	M	-	Sí	-
	92-10M	-	F	-	Sí	-
	92-11Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>D</b>	92-13M	-	F	-	Sí	-
	92-14Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>E</b>	92-15P	-	M	-	Sí	-
	92-16M	-	F	-	Sí	-
	92-17Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>F</b>	92-18P	-	M	-	Sí	-
	92-19M	-	F	-	Sí	-
	92-20Rb	BL	M	-	Sí	-
<b>G</b>	92-21PRb	BL	M	-	Sí	-
	92-22M	-	F	-	Sí	-
	92-23G	-	M	-	Sí	-
	92-23Rb	BL	F	Sí	Sí	-
<b>H</b>	92-25M	-	F	-	Sí	-
	92-26Rb	BL	F	Sí	Sí	-
<b>I</b>	93-27P	-	M	-	Sí	-
	93-28M	-	F	-	Sí	-
	93-29Rb	BL	F	Sí	Sí	-

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>afectació</b>	<b>sexe</b>	<b>m heparina</b>	<b>m EDTA</b>	<b>m tumor</b>
<b>J</b>	93-30Rb	UL (UE)	M	Sí	Sí	-
<b>K</b>	93-31P	-	M	Sí	Sí	-
	93-32M	-	F	Sí	Sí	-
	93-33Rb	BL	F	Sí	Sí	-
<b>L</b>	93-35M	-	F	-	Sí	-
	93-36Rb	BL	F	Sí	Sí	-
	93-37Rb	BL	F	Sí	Sí	-
	93-38Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>M</b>	93-39P#	-	M	-	Sí	-
	93-41Rb	BL	M	Sí	Sí	-
	93-42G	-	M	-	Sí	-
<b>N</b>	93-43P	-	M	-	Sí	-
	93-44M	-	F	-	Sí	-
	93-45G	-	F	-	Sí	-
	93-45Rb	UL (UE)	M	-	Sí	-
<b>O</b>	93-46P	-	M	-	Sí	-
	93-48Rb	UL (UE)	F	Sí	Sí	-
<b>P</b>	93-49P	-	M	-	Sí	-
	93-50M	-	F	-	Sí	-
	93-51Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>Q</b>	93-52P	-	M	-	Sí	-
	93-53MRb	BL	F	Sí	Sí	-
	93-55Rb	BL	F	-	Sí	-
<b>R</b>	93-56P	-	M	-	Sí	-
	93-57M	-	F	-	Sí	-
	93-58Rb	BL	M	Sí	Sí	Sí
<b>S</b>	93-59P	-	M	-	Sí	-
	93-60MRb	BL	F	-	Sí	-
	93-61Rb	BL	F	Sí	Sí	-

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>afectació</b>	<b>sexe</b>	<b>m heparina</b>	<b>m EDTA</b>	<b>m tumor</b>
	94-61T1	-	M	-	Sí	-
	94-61T2	-	M	-	Sí	-
<b>T</b>	93-62P	-	M	-	Sí	-
	93-63M	-	F	-	Sí	-
	93-64Rb	BL	F	Sí	Sí	-
<b>U</b>	93-66P	-	M	-	Sí	-
	93-67M	-	F	-	Sí	-
	93-68Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>V</b>	93-69P	-	M	-	Sí	-
	93-70M	-	F	-	Sí	-
	93-71Rb	UL (UE)	F	Sí	Sí	-
<b>X</b>	93-73Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>Y</b>	93-74P	-	M	-	Sí	-
	93-75M	-	F	-	Sí	-
	93-76Rb	UL (UE)	M	Sí	Sí	-
<b>Z</b>	93-77P	-	M	Sí	Sí	-
	93-78MRb	BL	F	Sí	Sí	-
	93-79Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>AA</b>	93-82Rb	BL	F	Sí	Sí	Sí
<b>AB</b>	93-83Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>AC</b>	93-86Rb	UL (UD)	M	Sí	Sí	-
<b>AD</b>	93-88Rb	UL (UE)	F	Sí	-	-
<b>AE</b>	93-89Rb	UL (UE)	F	Sí	Sí	-
<b>AF</b>	93-90P	-	M	Sí	Sí	-
	93-91M	-	F	Sí	Sí	-
	93-93Rb	UL (UD)	M	Sí	Sí	Sí
<b>AG</b>	93-94Rb	UL (UD)	F	Sí	Sí	-
<b>AH</b>	93-95Rb	UL (UE)	F	Sí	Sí	-
<b>AI</b>	93-96Rb	UL (UE)	M	Sí	Sí	-

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>afectació</b>	<b>sexe</b>	<b>m heparina</b>	<b>m EDTA</b>	<b>m tumor</b>
<b>AJ</b>	93-97Rb	UL (UE)	F	Sí	Sí	-
<b>AK</b>	93-98Rb	UL (UD)	M	Sí	Sí	-
<b>AL</b>	93-99Rb	UL (UE)	M	Sí	Sí	-
<b>AM</b>	93-100P	-	M	-	Sí	-
	93-101M	-	F	-	Sí	-
	93-102Rb	BL	M	Sí	Sí	Sí
<b>AN</b>	94-103PRb	BL	M	-	Sí	-
	94-104M	-	F	-	Sí	-
	94-105Rb	UL(ND)	M	-	Sí	-
	94-106Rb	BL	M	Sí	Sí	-
<b>AO</b>	94-107Rb	UL (UD)	F	Sí	Sí	Sí
<b>AP</b>	94-108Rb	BL	M	Sí	Sí	Sí
<b>AQ</b>	94-109Rb	UL (UD)	M	-	Sí	Sí
<b>AR</b>	95-110Rb	UL (UE)	M	-	Sí	Sí
<b>AS</b>	95-111Rb	UL (UE)	F	Sí	Sí	Sí
<b>AT</b>	95-112Rb	UL (UE)	F	-	Sí	Sí
<b>AU</b>	95-113Rb	UL (UE)MF	M	-	Sí	-
<b>AV</b>	98-114P	-	M	Sí	Sí	-
	98-115M	-	F	Sí	Sí	-
	98-115TRb	BL	F	Sí	Sí	-
	98-116Rb	BL	M	-	Sí	-
	98-117G	-	F	-	Sí	-
<b>AX</b>	99-118PRb	BL	M	Sí	Sí	-
	99-118G1	-	F	Sí	Sí	-
	99-118G2	-	M	Sí	Sí	-
	99-118G2.1T	-	F	-	Sí	-
	99-118G2.2F	-	M	*	Sí	-
	99-118G3	-	M	Sí	Sí	-
	99-118G4	-	M	Sí	Sí	-

<b>família</b>	<b>pacient</b>	<b>afectació</b>	<b>sexe</b>	<b>m heparina</b>	<b>m EDTA</b>	<b>m tumor</b>
	99-119M	-	F	Sí	Sí	-
	99-120Rb	BL	M	Sí	Sí	-
	99-121Rb	BL	M	Sí	Sí	-
	CPCRb	BL	M	-	Sí	-

m heparina: mostra de SP obtinguda amb heparina; m EDTA: mostra de SP obtinguda amb EDTA; m tumor: mostra obtinguda de biòpsia tumoral; UL: unilateral; BL: bilateral; UE: ull esquerre; UD: ull dret; P: pare de pacient afecte; M: mare de pacient afecte; G: germà de pacient afecte; Rb: pacient afecte; M (en sexe): mascle; F: femella; ND: dada no determinada; #:pare de 93-42G, però no de 93-41Rb; F: fetus; \*: extensions cromosòmiques procedents de vellositats corials

## 2.2 MATERIAL DE LABORATORI

No s'inclouen a cada apartat els productes ja citats en apartats anteriors

### 2.2.1 Productes utilitzats en el cultiu de limfòcits i vellositats corials

Heparina sòdica 1% (Rovi)

EDTA tripotàssic (Aulabor)

Medi de cultiu RPMI 1640 (Gibco BRL)

*Foetal calf serum* (FCS) (Gibco BRL)

L-Glutamina (Gibco BRL)

Penicilina-Estreptomicina (Gibco BRL)

Fitohemaglutinina (Sigma)

Metotrexat (Sigma)

Timidina (Sigma)

Bromur d'etidi (Sigma)

Medi de cultiu RPMI 1640 (Gibco BRL)

Solució salina sense calci ni magnesi (HBSS *Hanks balanced salt solution*)  
(Gibco BRL)

Medi de cultiu AmnioMAX™-C100 (Gibco BRL)

## **2.2.2 Productes utilitzats en l'extracció dels cultius**

Colcemid KaryoMAX, Colcemid© (Gibco BRL)

Citrat trisòdic dihidratat (Merck)

Àcid acètic glacial (Merck)

Etanol absolut (Merck)

## **2.2.3 Productes utilitzats per l'obtenció de bandes**

Citrat sòdic salí (SSC) (Merck)

Colorant Wright

## **2.2.4 Productes utilitzats per la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH)**

Kit hibridació *in situ* (Oncor) compostat per: sonda de DNA marcada amb biotina, tampó d'hibridació i anticossos

Formamida (Boehringer Mannheim)

Tampó fosfat detergent (PBD) (Oncor)

Goma segelladora

Esmalt d'ungles

## **2.2.5 Productes utilitzats en l'extracció de DNA de SP i de tumor**

Sèrum fisiològic (NaCl 0,9%) (Merck)

Tris (Boehringer Mannheim)

MgCl<sub>2</sub> (Merck)



EDTA (Fluka)

SDS (Fluka)

Proteïnasa K (Sigma)

Cloroform (Merck)

Tris Cl (Boehringer Mannheim)

Fenol (Merck)

Alcohol isoamílic (Merck)

Acetat amònic (Fluka)

## **2.2.6 Productes utilitzats en l'anàlisi de lligament**

Enzims de restricció BamHI, XbaI, Tth 111 I (Promega) i Bst NI (New England Biolabs)

Tampó de PCR, MgCl<sub>2</sub> i Taq polimerasa (Promega)

Nucleòtids (Promega i PE Applied Biosystems)

Encebadors (Cruachem Ltd)

Dimetil sulfòxid (DMSO) (Fluka)

Agarosa i agarosa de baix punt de fusió (Ecogen SRL)

Acrilamida i bis-acrilamida (Serva)

Marcadors de pes molecular X174/Hinf I, X174/Hae III, /Hind III/EcoRI (Promega), i marcador pes molecular Ladder XIV (Boehringer Mannheim)

Nitrat de plata (Merck)

## **2.2.7 Productes i solucions utilitzats en la detecció de mutacions**

Encebadors per l'amplificació dels exons 2, 8, 15 i 16, 18, 19, 20, i 23 (MGW-Biotech GmbH)

AmpliTaq Gold with GeneAmp (Applied Biosystems, manufacturat per Roche) i Polimerasa Pfu (Promega)

<sup>33</sup>P

MDE 2X (BioWhittaker Molecular Applications), TEMED (Serva), i persulfat amònic (Bio-Rad)

Enzims de restricció HphI, HpaI, NdeI, HinfI (New England Biolabs), DdeI, HpaII, AluI (Boehringer Mannheim)

Marcador de pes molecular pBR322/MspI (New England Biolabs)

Xilene cyanol i blau de bromofenol kit (Amersham Pharmacia Biotech)

Àcid nítric (Merck)

Polimerasa Thermo Sequenase (Applied Biosystems)

QIAquick PCR purification kit i QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), i DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech)

## 2.2.8 Material de laboratori

Tubs, flascons, plaques de Petri, agulles hipodèrmiques i pipetes Pasteur estèrils.

Portaobjectes i cubreobjectes

Tubs de centrífuga

Tubs eppendorff

Puntes de pipeta amb i sense filtre

Morter

Rodets Polaroid 667

Films autoradiografia Kodak biomax

## 2.2.9 Aparells

Cabines de flux laminar

Incubador

Centrífuga refrigerada (Sigma 3K10)

Placa calefactora

Vòrtex

Bany maria agitador

Nevera i congelador

Microscopi de fluorescència Zeiss Axioplan amb bombeta de 50W equipat amb filtres específics per FITC i Texas Red/FITC

Sistema de fotografia MC80

Pipetes automàtiques Finnipipette Digital ACL (Labsystems)

Termocicladors: GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems), PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.), MiniCycler (MJ Research, Inc.)

Cubeta d'electroforesi horitzontal Wide Mini-Sub cell GT (Bio-Rad)

Cubeta d'electroforesi vertical Owl's Aluminum Backed Sequencing System S4S (Owl Scientific, Inc.)

Fonts d'alimentació: Power-Pac 300 (Bio-Rad) i EC 3000-90 (E-C Apparatus Corporation)

Transil·luminador (Fluo-Link)

Assecador de gels

Càmara fotogràfica (Polaroid)

Revelador automàtic de radiografies (Agfa-Gevaert)

Sequenciador automàtic ABI 373 A Strech (Applied Biosystems)

## 2.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 2.3.1 Cultiu de limfòcits de sang perifèrica

Es van utilitzar dos protocols de cultiu. Ambdós protocols permetien l'obtenció de cromosomes prometafàsics, amb un nombre de bandes superior a 650.

El medi de cultiu utilitzat va ser RPMI 1640 suplementat [2 ml FCS, 0,1 ml L-glutamina 20 mM, 0,1 ml barreja penicilina (10u/ml)-estreptomicina (10mg/ml) 0,1 ml heparina sòdica 1%, i fins a 10 ml de medi]. Com a estimulant de la divisió cel·lular es van utilitzar 0,3 ml de fitohemaglutinina. Es va sembrar 1 ml de sang en 10 ml de medi, en flascó, i es va incubar a 37°C durant 96 h.

Segons el protocol 1, a les 72 h després d'iniciat el cultiu, es van afegir 0.25 ml de metotrexat (MTX)  $10^{-6}$  M, per induir la sincronització de la divisió cel·lular. Després de 19 h d'incubació amb MTX, es van afegir 0,1ml de timidina  $10^{-5}$  M, per desbloquejar i reactivar la divisió. El cultiu va ser aturat amb colcemid 5 h després d'afegir-hi la timidina.

Segons el protocol 2, a les 94 h després d'iniciat el cultiu, es van afegir 50 µl de bromur d'etidi, a una concentració final de 5 µgr/ml, per descondensar la cromatina, i 0,1 ml de colcemid durant 2 h.

Després de la incubació amb colcemid i l'obtenció del precipitat cel·lular per centrifugació es va sotmetre a les cèl·lules a un xoc hipotònic (KCl 0.075M) durant 30min a 37°C, i posteriorment es van fixar amb Carnoy (metanol:àcid acètic 3:1).

### 2.3.2 Cultiu de vellositats corials

Les vellositats obtingudes van ser transportades en contenidor estèril amb medi de cultiu RPMI 1640 suplementat (com en el cas anterior). Un cop al laboratori la mostra va ser manipulada en placa de petri que contenia solució salina sense calci ni magnesi, atemperada a 37°C. Es va separar el material d'origen fetal, del d'origen matern, utilitzant agulles hipodèrmiques amb les que també es va disgregar el material fetal. Aquest

material es va traspasar a una nova placa, contenint medi de cultiu AmnioMAX™-C100. La mostra va ser incubada a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> durant 72 h. Passat aquest temps es van afegir 0,2 ml de colcemid (10mg/ml), i es va continuar la incubació durant 50 min. Les vellositats van ser passades a un tub cònic de vidre, eliminant el medi de cultiu. Es van afegir 5 ml de solució hipotònica de citrat trisòdic dihidratat al 1%, i es va incubar a 37°C durant 30 min. Posteriorment es va eliminar la solució hipotònica i es va afegir fixador fresc (4 parts d'àcid acètic glacial per una d'etanol absolut), gota a gota, fins un volum de 5 ml. Es va deixar actuar durant 20 min, a 4°C, després es va eliminar i es van afegir 3 ml de fixador nou, mantenint aquesta vegada durant 20 min a temperatura ambient (TA). Una vegada eliminat aquest fixador, es van afegir 2 ml més, que van actuar durant 2 h a 4°C. Per últim, es van afegir 15 gotes d'àcid acètic al 60% a les vellositats, per tal de disgregar-les, i es van estendre sobre portaobjectes escalfats en una placa calefactora a 50°C. Els portaobjectes es van anar movent suaument fins el seu assecat.

### **2.3.3 Tècniques de tinció i identificació cromosòmica**

#### **2.3.3.1 Bandes G**

Les preparacions obtingudes dels cultius de SP i vellositats corials es van mantenir en una estufa a 65°C durant 24 h, després es van submergir en solució de 2XSSC (citrat sòdic salí) de 2 seg a 1 min, i es van tenyir amb colorant Wright.

#### **2.3.3.2 FISH**

Es va utilitzar una sonda comercial específica pel cromosoma 13 (*locus* RB1), aplicada sobre nuclis interfàsics i metafases obtingudes del cultiu de limfòcits de SP.

En primer lloc, es va fer un pretractament de les preparacions en 2X SSC a 37°C durant 30 min i després es van desnaturalitzar en una solució de 70%formamida/2X SSC, durant 2 min a 72°C.

Posteriorment es va procedir a la deshidratació de la preparació, utilitzant concentracions creixents d'etanol fred (70%-80%-96%) durant 2 min, a TA. Les preparacions es van assecar a l'aire.

Paral·lelament es van atemperar 10 µl de la sonda marcada amb biotina durant 5 min a 37°C.

Es va aplicar la sonda sobre la preparació, es va cobrir amb un cobreobjectes de vidre i es va segellar amb goma.

La preparació es va incubar en cambra humida durant 12-16 h a 37°C.

Finalitzada la incubació, es va eliminar la goma i es va rentar la preparació en solució de 2X SSC durant 5 min a 72°C, fent lliscar el cobreobjectes. Posteriorment es va rentar en solució 1X PBD a TA.

Per a detectar la hibridació, es van aplicar 20 µl d'anticòs I (antiavidina marcada amb fluoresceïna) i es va cobrir la preparació amb cobreobjectes de plàstic.

La incubació de l'anticòs es va realitzar durant 15 min, a 37°C, en cambra humida, i posteriorment es van fer dos rentats en solució 1X PBD, en agitació, a TA durant 4 min.

L'amplificació del senyal d'hibridació es va continuar amb l'aplicació de 20 µl de l'anticòs II (antiavidina-biotina), incubant i rentant d'igual manera que amb l'anticòs I.

Per finalitzar la detecció es van aplicar 20 µl d'anticòs III (avidina-fluoresceïna), incubant i rentant d'igual manera que amb l'anticòs I.

Per últim, les preparacions es van contratenyir amb 15 µl de iodur de propidi, es van tapar amb cobreobjectes de vidre i es van segellar amb esmalt d'ungles.

### **2.3.3.3 Observació i valoració**

La mitjana de metafases analitzades citogenèticament a partir dels cultius de limfòcits va ser de 19, amb un rang de 11-25, realitzant-se el cariotip d'una mitjana de 10.

Van ser analitzades citogenèticament un total de 20 metafases procedents del cultiu de la vellositat corial, realitzant-se el cariotip de 8 d'elles.

Es van analitzar mitjançant FISH metafases i nuclis interfàsics de diferents pacients i de mostres control. A partir de les mostres control es va establir un llinar per la valoració de falsos positius, amb un interval de confiança del 99.9%.

### **2.3.4 Extracció de DNA de mostres de sang perifèrica**

Es van rentar les mostres amb un volum de sèrum fisiològic igual al de la sang, agitant suaument, i centrifugant a 800 g durant 10 min a 4°C, sense fre, per tal de no alterar el precipitat. Un cop descartat el sobrenedant, sense destorbar la capa cel·lular, es va afegir la solució de lisi d'eritròcits (5 ml de Tris 2 M, a pH 7,5, 2,5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M, i H<sub>2</sub>O fins a 500 ml), fins a un volum de 50 ml (per 20 ml de mostra). Aquesta solució és extemporània, pel que s'ha de preparar fresca cada vegada. Després d'agitar suaument, fins observar que la mostra prenia un color marronós, es va centrifugar a 1300 g durant 15 min a 4°C, sense fre. Aquesta operació es va repetir un cop més, i després de centrifugar per segona vegada s'obtenia un precipitat cel·lular blanc visible. Depenent de la mida del precipitat es van afegir de 3 a 6 ml (per 20 ml de mostra inicial) de solució de lisi de leucòcits (40 ml de CNa 5 M, 4 ml de EDTA 0,25 M, 2,5 ml de Tris 2 M a pH 7,5, i H<sub>2</sub>O fins a 500 ml), de 200 a 400 µl de SDS al 10%, i de 500 a 1000 µl de solució de proteinasa K (100 mg proteinasa K, 5 ml de SDS 10%, 400 µl de EDTA 0,25 M, i H<sub>2</sub>O fins a 50 ml). Després d'agitar amb un vòrtex fins a aconseguir una solució homogènia, es va incubar a 37°C en bany maria, en agitació, durant 12-16 h. Després de la digestió enzimàtica es va procedir a la precipitació salina del DNA, afegint 1 ml (per 20 ml de mostra) de NaCl saturat 5,5 M, agitant amb vòrtex i centrifugant a 1300 g, a 4°C, sense fre. Després de descartar el sobrenadant es va repetir la centrifugació per tal d'eliminar l'excés de sals. La solució de proteinasa K utilitzada permet obviar els rentats amb fenol, i per tant, una vegada eliminades les sals, únicament va ser necessari afegir cloroform v/v i centrifugar de 15-20 min a 1300 g, fins a obtenir una solució transparent. Afegint etanol absolut a aquesta solució transparent es van obtenir precipitats visibles de DNA.

El precipitat de DNA es va rentar en etanol al 70% i es va resuspendre en TE (Tris, pH 7,5 10 mM, EDTA 0,2 mM). Les mostres així obtingudes es van conservar congelades a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins ser utilitzades.

### **2.3.5 Extracció de DNA de mostres de teixit tumoral**

El tractament clínic dels pacients amb Rb, inclou en alguns casos l'enucleació del globus ocular afectat. Les peces oculars obtingudes per enucleació al servei d'Oftalmologia Infantil de l'Hospital Materno-Infantil de la Vall d'Hebron es remeten immediatament al Servei d'Anatomia Patològica del propi hospital. Sempre que va ser possible ens va ser proporcionada una fracció de la massa tumoral, que es va congelar immediatament en nitrogen líquid fins el seu processat.

Es van obtenir així mostres tumorals d'entre 110 i 380 mg que es van utilitzar per l'obtenció de DNA.

Les mostres congelades van ser trocejades amb un morter fins aconseguir una pols fina. Aquest polsim es va resuspendre en 1,2 ml de tampó de digestió (NaCl 100 mM, TrisCl 10 mM, SDS 0,5%, proteinasa K 0,1mg/ml) per cada 100 mg de teixit. La barreja es va incubar a  $50^{\circ}\text{C}$  durant 12-18 h, en agitació. Després d'obtenir una solució viscosa, homogènia, les mostres es van rentar en solució de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1), i es van centrifugar durant 10 min a 1040 g. En cas de no obtenir una bona resolució de fases, s'afegia tampó de digestió i es centrifugava novament, i si la interfase no era suficientment neta es repetia l'extracció orgànica.

La precipitació del DNA es va aconseguir afegint solució de 1/2 volum d'acetat amònic 7,5 M i 2 volums d'etanol 100%, i centrifugant durant 3 min a 3636 g.

Després de rentar en etanol al 70% el precipitat es va dissoldre en TE pH 7,5. Les mostres es conservaren congelades a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.6 Anàlisi de lligament**

Es va fer l'estudi indirecte de segregació del gen RB1 mutat en set famílies amb, al menys, dues generacions d'individus afectes (taula 2, pàg 30).



Es van utilitzar 5 marcadors de DNA intragènics. Tres d'aquests marcadors són polimorfismes de restricció (RFLPs).

En tots cinc casos la detecció del polimorfisme es va basar en l'amplificació del fragment d'interès mitjançant PCR.

Les mostres utilitzades van ser de SP d'individus afectes i familiars sans, i de vellositats corials en un cas.

#### 2.3.6.1 Polimorfismes de restricció

**Lloc polimòrfic BamHI:** localitzat a l'intró 1 del gen RB1 (Bookstein *et al.* 1990a). Quan és present, la diana variable per BamHI es localitza dins del fragment amplificat de 180 pb, a 50 pb del seu extrem 3', de forma que després de la digestió amb l'enzim BamHI, s'obtenen dos fragments de 130 i 50 pb.

**Lloc polimòrfic XbaI:** localitzat a l'intró 17 del gen RB1 (Wiggs *et al.*, 1988). Quan és present, després de digerir el fragment amplificat de 945 pb amb l'enzim XbaI, s'obtenen dos fragments de 630 i 315 pb.

**Lloc polimòrfic Tth 111 I:** localitzat a l'intró 24 del gen RB1 (Wiggs *et al.*, 1988, McGee *et al.*, 1989). El fragment amplificat, de 1351 pb, conté una diana invariable i una diana polimòrfica per l'enzim Tth 111 I, de forma que després de digerir amb aquest enzim, si la seqüència conté únicament la diana fixa, s'obtenen fragments de 1182 i 169 pb, si conté la diana polimòrfica resulten tres fragments de 634, 548 i 169 pb.

#### 2.3.6.2 Polimorfismes de longitud

**Polimorfisme Rb1.20:** localitzat a l'intró 20 del gen RB, consisteix en la repetició de l'oligonucleòtid CTTT(T) en nombre variable (n=14-26) (Yandell *and* Dryja, 1989b).

**Polimorfisme VNTR16 (VNTR, variable number tandem repeat):** localitzat a l'intró 16 del gen RB1 (Wiggs *et al.*, 1988). Consisteix en la repetició d'un oligonucleòtid d'aproximadament 50 pb, un nombre variable de vegades. Mitjançant reacció de PCR s'ha aconseguit identificar 11 al·lels d'entre 650 i 1800 pb (Scharf *et al.*, 1992).

### 2.3.6.3 Condicions d'amplificació

Les reaccions d'amplificació es van portar a terme seguint les condicions especificades en les taules 3 i 4, que són modificació d'altres descrites a la literatura (Bookstein *et al.* 1990a, McGee *et al.*, 1990, Vaughn *et al.*, 1990, Brandt *et al.*, 1992, Scharf *et al.*, 1992).

Taula 3: productes i concentracions per la reacció

	BamHI	XbaI	Tth 111 I	Rb1.20	VNTR16
vol. tampó 10X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
[encebadors]	0,5 µg	20 pmols	20 pmols	1 µM	0,5 µM
[nucleòtids]	200 µM	200 µM	250 µM	200 µM	250 µM
[MgCl <sub>2</sub> ]	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM
quantitat DNA	100ng	500ng	250ng	500ng	500ng
quantitat Taq pol	2,5 u	2,5 u	2,5 u	1,25 u	1 u
altres additius	5µl DMSO		2,5 µl formamida		
volum final	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Taula 4: condicions d'amplificació

	BamHI	XbaI	Tth 111 I	Rb1.20	VNTR16
<i>Hot start</i>	95°C 10min	95°C 5min	95°C 10min	95°C 5min	95°C 5min
<i>annealing</i>	60°C 30seg	50°C 30seg	55°C 30seg	52°C 10seg	58°C 60seg
nbre cicles	30	30	30	35	28

En tots els casos les temperatures de desnaturalització i extensió van ser de 95°C i 72°C respectivament.

Les seqüències dels encebadors utilitzats per la detecció dels polimorfismes són les que s'especifiquen a continuació:

**Bam HI:**

MD1 (5'-CAG GAC AGC GGC CCG GAG-3')

MD2 (5'-CTG CAG ACG CTC CGC CGT-3')

**Xba I:**

MD11 (5'-TTC CAA TGA AGA ACA AAT GG-3')

MD12 (5'-GCA ATT GCA CAA TCC AAG TT-3')

**Tth 111I:**

MD21 (5'-ACC TTC CTA GCA CTT AGA CA-3')

MD22 (5'-AAG GGC AAG AAA CCA ATA GA-3')

**Rb 1.20:**

310 (5'-AAG TAA GAA AAT CAA GCA CTT-3')

B103 (5'-AAT TAA CAA GGT GTG GTG GT-3')

**VNTR 16:**

RBD12 (5'-CCT AAC GTA TGG CCA AGT TTC C-3')

RBD13 (5'-GCT AAA CCA TTC ATG AGG GAT-3')

**2.3.6.4 Condicions de detecció dels diferents polimorfismes.**

A la taula 5 s'especifiquen les condicions de detecció dels 5 marcadors polimòrfics estudiats.

Taula 5: condicions per la detecció dels polimorfismes

	<b>BamHI</b>	<b>XbaI</b>	<b>Tth 111 I</b>	<b>Rb1.20</b>	<b>VNTR16</b>
<b>FA (pb)</b>	180	945	1351	250-300	650-1800
<b>detecció</b>	agarosa 2%	agarosa 2%	agarosa 2%	agarosa 2%	agarosa bpf 1,5%
<b>MPM</b>	X174/Hinf I	X174/Hae III	X174/Hae III	X174/Hinf I	/HindIII/EcoRI, Ladder XIV
<b>digestió</b>	20u Bam HI 37°C 12-16h	20u Xba I 37°C 12-16h	20u Tth 111I 65°C 12-16h	20u Bst NI 60°C 3h	-
<b>FD (pb)</b>	180 ó 130+50	955 ó 630+315	1182+169 ó 634+548+169	158-208+92	-
<b>detecció</b>	agarosa 2%	agarosa 2%	agarosa 2%	acrilamida 8%	-
<b>MPM</b>	X174/Hinf I	X174/Hae III	X174/Hae III	X174/Hinf I	-

FA: mida fragment amplificat; MPM: marcador pes molecular; FD: fragment digerit; bpf: baix punt de fusió (65 °C).

Quan es va utilitzar agarosa per a la detecció, el bromur d'etidi es va afegir a la solució, prèviament a la gelificació, en una concentració final de 0,5 µg/ml. Els gels d'acrilamida es van tenyir amb bromur d'etidi (10 min en solució de 0,5 µg/ml) o amb nitrat de plata (veure protocol pag 56).

### **2.3.7 Anàlisi de mutacions per digestió amb enzims de restricció**

Després de modificar la metodologia descrita per Blanquet i col·laboradors (1994) per a la detecció de mutacions en els exons 8 i 18, es van estudiar 46 mostres de SP d'individus afectes i els seus familiars, així com 9 mostres tumorals (taula 12, pg 66), mitjançant PCR i digestió amb enzims de restricció.

#### **2.3.7.1 Detecció de mutacions a l'exó 8.**

Es va utilitzar la tècnica de PCR per amplificar el fragment que pot contenir la mutació descrita per Blanquet i col·laboradors (1994), consistent en una transició de C a T en la posició 45 de l'exó 8. Aquesta transició canvia el codó 255 de CGA (Arg) a TGA (*stop*).

Es detalla a continuació la seqüència de l'exó 8, amb part dels introns adjacents (McGee *et al*, 1989). Les regions en color blau corresponen a les seqüències a on hibriden els encebadors utilitzats en la PCR. Es destaquen en color verd l'inici i el final de la regió codificant.

L'enzim HphI reconeix i talla seqüències GGTGA. La seqüència salvatge de l'exó 8 del gen RB conté una diana per l'enzim HphI, que s'indica amb color vermell. Amb vermell i subratllada s'indica la regió a on, una transició de C a T provocaria la substitució al codó 255 d'una Arginina (CGA) per un *stop* (TGA). Aquest canvi implicaria, a més, l'aparició d'una nova diana per l'enzim de restricció HphI, fet que facilita la detecció d'aquesta mutació.

Seqüència de l'exó 8 del gen RB1, i de part dels introns adjacents:

```

ATATTAGTAC   ATAATTTGTA   GTAGATATGG   ATGAAATTGT
TATCCTTCTA ATGAACCTA   ATAAGTAAAA   GTAGTAGAAT
GTTACCAAGA   TTATTTTGA   CCTAAGTTAT   AGTTAGAATA
CTTCATTATT   TTATATGATG   GATGTACAAT   TGTTCTTATC
TAATTTACCA   CTTTACAGA     AACAGCTGTT   ATACCCATTA
ATGGTTCACC   TCGAACACCC   AGGCGAGGTC   AGAACAGGAG
TGCACGGATA   GCAAAACAAC   TAGAAAATGA   TACAAGAATT
ATTGAAGTTC   TCTGTAAAGA   ACATGAATGT   AATATAGATG
AGGTAAATTTA   ACTTCATGAT   TTCTTTAAAA   CAGTTAAAGT
AGATTTAGAT   GTAAGTTCCTC   CCTAACATA    TTACTTCTT
TTGTTATGAG CATGTTTTTT   TTGTAATTAG   TGCTAACTCT
TTTGCAGTAG CAAAATATTT

```

En un volum final de 50 µl, una concentració de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, i amb 2,5 u de l'enzim Taq polimerasa, es va realitzar una reacció d'amplificació de 35 cicles, amb una temperatura d'hibridació de 52°C.

Es van obtenir fragments de 371 pb, detectats per electroforesi en gels d'agarosa al 2% o de poliacrilamida al 6%, tenyits amb bromur d'etidi. El marcador utilitzat va ser el X174/Hinfl.

Alíquotes de 20 µl del producte d'amplificació es van digerir amb 7,5 u de l'enzim HphI, incubant a 37°C durant 12-16 h.

El producte de la digestió es va detectar per electroforesi en gels de poliacrilamida al 6%, tenyits amb bromur d'etidi. En els individus que no presentaven la transició de C a T s'observaven dos fragments de 158 i 213 pb. En els individus mutats es detectaven fragments de 158, 36 i 177 pb.

### 2.3.7.2 Detecció de mutacions a l'exó 18

Es va amplificar mitjançant PCR el fragment que pot contenir la mutació descrita per Blanquet i col·laboradors (1994), consistent en una transició de C a T al codó 578 que, com en el cas anterior, passava de codificar una Arginina (CGA) a codificar un *stop* (TGA).

Es detalla la seqüència de l'exó 18 i de part dels introns adjacents descrita per McGee i col·laboradors (1989), i igualment es destaquen les regions d'hibridació dels encebadors utilitzats en la PCR, i l'inici i el final de la regió codificant. En vermell s'indica la seqüència a on una transició de C a T de la Citosina marcada en negreta provocaria l'aparició d'una diana de restricció per l'enzim DdeI, que reconeix i talla seqüències C/TNAG. Aquesta transició tindria com a conseqüència la síntesi d'una proteïna truncada, per l'aparició d'un *stop* prematur, en lloc d'una Arginina, en el codó 579.

Seqüència de l'exó 18 del gen RB1, i de part dels introns adjacents:

```

CAATTGGGAA   TTTCGAAGTA   GAGAAAAATA   TTTCATTCTG
ACTTTTAAAT TGCCACTGTC   AATTGTGCCT   AAAATTCATA
GTACTTCCA   TGTCAAACAA   TATGATTTTG   ATATGTACCT
GGGAAAATTA   TGCTTACTAA   TGTGGTTTTA   ATTTCATCAT
GTTTCATATA GGATTCACCT   TTATTTGATC   TTATTAAACA
ATCAAAGGAC CGAGAAGGAC   CAACTGATCA   CCTTGAATCT
GCTTGTCCCTC TTAATCTTCC   TCTCCAGAAT   AATCACACTG
CAGCAGATAT GTAAGCAAAA   TATATGTTAT   GTTGACCATC
AAACTGCAAA   TAGATTTTAA   GCATAAGTGC   AATGTAACAT
TCTATAAAGA AACTGTAGGG AATAGAATTT   TGAATAAGAA
TAGTTTCTGT TTTTAAGAAA TTAGTAATAA

```

Les condicions d'amplificació van ser les mateixes que les utilitzades per l'exó 8.

Es van obtenir fragments de 344 pb, detectats en agarosa al 2% o acrilamida al 6%. El marcador utilitzat va ser el X174/Hinfl.

Alíquotes de 20 µl del producte d'amplificació es van digerir amb 6 u de l'enzim DdeI, incubant a 37 °C durant 12-16 h. Després de digerir, els individus amb seqüència normal, presentaven un únic fragment de 344 pb. En els individus amb la transició s'observaven dos fragments, de 173 i 171 pb. El producte de digestió es va detectar per electroforesi en gels de poliàcrilamida al 6%, tenyits amb bromur d'etidi.

## 2.3.8 Cribatge de mutacions per SSCP i posterior seqüenciació

La tècnica de SSCP (Orita *et al*, 1989) es basa en el fet que les molècules de DNA de cadena senzilla formen estructures secundàries que depenen de la seva seqüència, en condicions no desnaturalitzants. Així, molècules que diferissin en una única base haurien de formar estructures diferents, i això faria que migressin de forma distingible en un gel de poliacrilamida no desnaturalitzant.

Els fragments a analitzar utilitzant aquesta tècnica s'obtenen de reaccions d'amplificació per PCR. Per detectar la migració de fragments en els gels de SSCP és possible, entre d'altres mètodes, tenyir amb nitrat de plata, o bé fer un marcatge radioactiu durant la reacció d'amplificació, que es posa de manifest mitjançant autoradiografia del gel.

Es van analitzar amb el mètode de SSCP els exons 2, 15, 16, 19, 20 i 23 del gen RB1, així com part dels introns adjacents (taula 12, pàg 66).

### 2.3.8.1 Condicions d'amplificació

Les condicions d'amplificació de fragments per PCR utilitzades són una modificació de les descrites a la literatura (Hogg *et al* 1992, Blanquet *et al* 1995). Entre les modificacions més destacables hi ha les referents a les polimerases utilitzades, donat que els productes d'amplificació que s'han d'analitzar pel mètode de SSCP han de ser molt específics. Els fragments amb migració alterada han de ser seqüenciats, per la qual cosa la reacció d'amplificació ha de ser també d'alta fidelitat. En els casos de reaccions problemàtiques per les característiques de la seqüència a amplificar, o per la dificultat d'obtenir amplificacions específiques, les condicions de treball es van adaptar a la utilització d'enzims diferents a la Taq polimerasa.

Els exons 2, 15, 16 i 20 van ser amplificats segons les condicions descrites a la taula 6.

Taula 6: barreja per les reaccions d'amplificació fredes

	<b>exó 2</b>	<b>exons 15-16</b>	<b>exó 20</b>
<b>vol. tampó 10X</b>	5 µl	5 µl	5 µl
<b>[encebadors]</b>	1 µM	50 pmols	10 pmols
<b>[nucleòtids]</b>	200 µM	200 µM	200 µM
<b>[MgCl<sub>2</sub>]</b>	1,5 mM	-	1,5 mM
<b>quantitat DNA</b>	100 ng	100 ng	500 ng
<b>quantitat polimerasa</b>	2,5u TaqGold	1,25u Pfu	2,5u Taq
<b>volum final</b>	50 µl	50 µl	50 µl

Els exons 19, 20 i 23 es van amplificar utilitzant <sup>33</sup>P pel marcatge radioactiu, segons les condicions descrites a la taula 7.

Taula 7: barreja per les reaccions d'amplificació dels exons 19, 20, i 23, marcant amb <sup>33</sup>P

	<b>exons 19, 20, 23</b>
<b>vol. tampó 10X</b>	5 µl
<b>[encebadors]</b>	10 pmols
<b>[nucleòtids] freds</b> <b>dCTP, dGTP, dTTP</b>	200 µM
<b>[dATP]</b>	100 µM
<b>[dATP <sup>33</sup>P]</b>	6 µM
<b>[MgCl<sub>2</sub>]</b>	1,5 mM
<b>quantitat DNA</b>	500 ng
<b>quantitat Taq pol</b>	2,5u
<b>volum final</b>	50 µl



Les seqüències dels encebadors utilitzades són les que s'especifiquen a continuació:

**Exó 2**

5X2 (5'-GTT CTT TTT CAC AGT AGT GTT ATG TG-3')

3X2 (5'-CGT GCC CGG CCT CAA ACA TTT TTA A-3')

**Exons 15-16**

5X15 (5'-ATTCAATGCTGACACAAATAAGGTT-3')

3X16 (5'-TTCTCCTTAACCTCACACTATCC-3')

**Exó 19**

19U (5'-AGGCAGTAATCCCCAGGAAAAGCCA-3')

19L (5'-CACAGAGATATTAAGTGACTTGCCC-3')

**Exó 20**

20U (5'-TTCTCTGGGGGAAAGAAAAGAGTGG-3')

20L (5'-AGTTAACAAGTAAGTAGGGAGGAGA-3')

**Exó 23**

23U (5'-TCTAATGTAATGGGTCCACCAAAC-3')

23L (5'-CATCTTGCGTTGCTTAAGTCGTAAA-3')

En tots els casos els encebadors utilitzats van permetre l'amplificació de l'exó complet, i de part dels introns adjacents.

Les condicions en que es van realitzar les diferents reaccions d'amplificació dels sis exons s'especifiquen a la taula 8.

Taula 8: condicions reaccions de PCR pels diferents exons. \*Temperatura corresponent a reacció marcada amb  $^{33}\text{P}$ , la reacció freda es va fer a  $62^\circ\text{C}$

	exó 2	exons 15-16	exó 19	exó 20	exó 23
<i>hot start</i>	95°C 10min	95°C 2min	95°C 5min	94°C 5min	94°C 5min
<i>annealing</i>	60°C 30 s	55°C 30 s	58°C 1min	58°C* 1min	58°C 1min
<b>nbre cicles</b>	30	30	35	35	35

En tots els casos les temperatures de desnaturalització i extensió van ser de  $95^\circ\text{C}$  i  $72^\circ\text{C}$  respectivament.

Finalitzades les reaccions d'amplificació, es va procedir en tots els casos a la comprovació del seu resultat. La anàlisi de SSCP es veu directament afectada per la mida dels fragments analitzats (Sheffield *et al*, 1993) i és recomanable que sempre que sigui possible que aquesta mida no superi els 300 pb. Donat que es pretenia analitzar fragments corresponents a exons complets i part dels introns adjacents, els fragments que vam obtenir van ser massa grans per la seva anàlisi directa. Es va procedir a digerir-los amb l'enzim de restricció apropiat a cada cas.

Les diferents condicions de detecció dels productes d'amplificació, i de digestió dels mateixos s'especifiquen per a cada exó.

### 2.3.8.2 Condicions de detecció i digestió

**Exó 2:** es van obtenir fragments de 409 pb, detectats en gels d'agarosa al 2%. El marcador de pes molecular utilitzat va ser el X174/Hinfi. Alíquotes de 15  $\mu\text{l}$  del producte van ser digerides amb 7,5 u de l'enzim HpaI incubant a  $37^\circ\text{C}$  durant 12-16 h. Els productes de la digestió, de 214 i 191 pb es van detectar en gels de poliacrilamida al 6% tenyits amb bromur d'etidi, utilitzant com marcadors de pes el X174/Hinfi o el X174/HaeIII.

**Exons 15-16:** es van amplificar conjuntament, obtenint-se fragments de 361 pb detectats en agarosa al 2%, amb el marcador X174/Hinfi. Els fragments es van digerir barrejant 15  $\mu\text{l}$  del producte d'amplificació amb 10 u de l'enzim NdeI i incubant la barreja durant 12-16 h a  $37^\circ\text{C}$ . Es van obtenir fragments de 209 i 152 pb, detectats en agarosa al 2%.

**Exó 19:** els fragments de 350 pb obtinguts, es van detectar en gels de policrilamida al 4% utilitzant el marcador de pes molecular pBR322/MspI. Van ser digerits en alíquotes de 10 µl, a les que s'afegien 2 µl d'espermidina 2 mM i 10 u de l'enzim HinfI. La barreja es va incubar a 37°C durant 12-16h. Com a producte de la digestió es van obtenir fragments de 176 i 309 pb.

**Exó 20:** es van obtenir fragments de 350 pb, detectats en gels de poliacrilamida al 4%. El marcador de pes molecular utilitzat va ser el pBR322/MspI. Alíquotes de 10 µl del producte van ser digerides amb 7,5 u de l'enzim HpaII, afegint 2 µl d'espermidina 2 mM i incubant a 37°C durant 12-16 h. Després de la digestió es van obtenir productes de 176 i 174 pb.

**Exó 23:** es van amplificar fragments de 420 pb que van ser detectats en poliacrilamida al 4%, amb el marcador pBR322/MspI. Es van digerir barrejant 10 µl del producte d'amplificació amb 2 µl d'espermidina i 10 u de l'enzim AluI. Es va incubar la barreja durant 12-16 h a 37°C, per obtenir fragments de 209 i 152 pb.

### 2.3.8.3 Preparació dels gels per l'anàlisi de SSCP

Els gels es van preparar a partir d'un derivat de l'acrilamida, utilitzant una solució de 12 ml MDE 2X, 3 ml TBE 10X, 375 µl persulfat amònic (PSA) 10%, 37.5 µl TEMED i H<sub>2</sub>O fins a 50 ml. La solució de PSA es va preparar fresca cada vegada o es va conservar a 4°C durant un màxim de 24 h.

La solució es va agitar suaument, evitant la formació de bombolles, i es va abocar entre dues plaques de vidre de 20 cm d'amplada per 45 cm de longitud, amb espaiadors de 0,4 mm de gruix. Es van utilitzar pintes amb capacitat per a 20 mostres.

Les plaques de vidre havien estat prèviament rentades amb sabó, aigua destil·lada, i etanol 100%.

La solució es va deixar polimeritzar durant al menys 1 h a TA.

Un cop polimeritzat el gel, es va retirar la pinta i es van muntar les plaques en la cubeta d'electroforesi, afegint també TBE 0,6X. L'extrem

superior del gel es va rentar amb aquest tampó, a pressió, per eliminar restes de solució no polimeritzada. La cubeta utilitzada està provista de placa d'alumini per evitar gradients de temperatura en la superfície del gel durant l'electroforesi.

5 µl de cada mostra es van barrejar amb 5 µl de tampó de càrrega (8 ml de formamida desionitzada, 0,2 ml EDTA 0,5 M, 10 mg xilene cyanol, 10 mg blau de bromofenol, fins a 10 ml de H<sub>2</sub>O tridestil·lada). Una vegada preparada la barreja les mostres es van desnaturalitzar a 94°C durant 10 min, i es van mantenir després en gel durant 10 min.

Com a controls es van utilitzar: una mostra no digerida i desnaturalitzada, una mostra no digerida i no desnaturalitzada, i una mostra digerida i no desnaturalitzada. La preparació dels controls es va fer seguint el mateix protocol utilitzat per la preparació de les mostres problema. En el cas dels controls no desnaturalitzats, el tampó de càrrega utilitzat no contenia formamida.

L'objectiu d'utilitzar aquestes mostres control va ser detectar la possible presència en les mostres problema de fragments no digerits o no desnaturalitzats, que podrien interferir en la interpretació del patró electroforètic, i ser falsament detectades com cadenes de migració anòmala. No va ser possible utilitzar controls positius, donat que desconeixem el tipus i la localització de les possibles variacions de seqüència. D'altra banda cabia esperar que la majoria de les mostres problema fossin normals, pel que aquestes mateixes mostres problema van actuar com a controls negatius.

#### **2.3.8.4 Condicions electroforètiques**

Abans de ser carregats, els gels es van sotmetre a un camp elèctric de 20 vats, durant 15 min. Posteriorment es va netejar novament la superfície superior dels gels amb tampó TBE i es van carregar les mostres.

Les electroforesis es van realitzar a 3 vats durant 12 h a TA (20-24°C).

### **2.3.8.5 Detecció per tinció amb nitrat de plata**

La detecció dels gels de SSCP en els que es van analitzar els exons 2, 15, 16 i 20 es va fer mitjançant tinció amb nitrat de plata, segons el protocol següent.

Els gels es van fixar en una solució d'etanol al 10%, durant un temps mínim de 10 min, i després en solució de metanol al 10% i àcid acètic al 10%, durant 15 min.

Posteriorment es van oxidar en solució d'àcid nítric al 1% durant 30 seg. Un temps curt d'oxidació va ser crític per a obtenir gels sense coloració de fons.

Els gels es van rentar dues vegades en aigua destil·lada.

La tinció es va fer en solució de nitrat de plata (2,02g/L) durant 20 min.

Per revelar, es va utilitzar solució de carbonat sòdic (29,6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 540 µl de formaldehid, c.s.p 1L). Els gels es van mantenir en aquesta solució fins observar la intensitat desitjada de les bandes.

El revelat es va aturar en solució d'àcid acètic al 10% durant un temps mínim de 5 min.

Tot el procés es va realitzar a TA i en agitació.

Els gels es van dipositar sobre paper Watman de 3 mm, i es van assecar a TA.

### **2.3.8.6 Detecció del marcatge radioactiu**

La detecció dels gels de SSCP en els que es van analitzar els exons 19, 20 i 23 marcats amb <sup>33</sup>P es va fer mitjançant autoradiografia.

Després de l'electroforesi, els gels es van assecar, sobre paper Watman de 4 mm, al buit i a 85°C, durant 1 h 30 min.

Un cop secs es van introduir en caixetí amb pantalla amplificadora a on van ser exposats films Kodak Biomax (35X43 cm) durant 48 h a TA. El revelat es va fer de forma automatitzada, utilitzant l'aparell revelador Agfa-Gevaert.

### 2.3.8.7 Valoració dels patrons de bandes

Es va definir un patró electroforètic característic per a cadascun dels exons analitzats. Es van considerar com mostres amb possibles alteracions de seqüència aquelles que presentaven un nombre de bandes diferent, o que, conservant el nombre de bandes, presentaven una o varies amb migració endarrerida o avançada respecte a la resta de mostres.

Les mostres amb migració alterada van ser seqüenciades, per tal de poder confirmar i caracteritzar les variacions.

### 2.3.8.8 Seqüenciació

Les mostres que havien de ser seqüenciades es van amplificar novament mitjançant PCR, amb els encebadors específics en cada cas. Dels 50 µl de reacció, 5 µl van ser utilitzats per comprovar la qualitat de l'amplificació en gel d'agarosa al 2% tenyit amb bromur d'etidi. Es va valorar la qualitat del producte en termes d'intensitat i especificitat de les bandes observades. Van ser necessaris un mínim de 30 ng del producte de PCR per realitzar la seqüenciació.

Una vegada obtingut un producte de PCR de qualitat, es va netejar per eliminar restes d'encebadors i de tampó de reacció, emprant el *kit* QIAquick PCR purification kit. El protocol seguit va ser el proporcionat pel fabricant. Quan el producte de PCR presentava fragments d'amplificació inespecífica es van separar els fragments mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, i es va retallar la banda corresponent al fragment desitjat. Per purificar els productes d'amplificació en blocs d'agarosa es va utilitzar el *kit* QIAquick Gel Extraction Kit, seguint el protocol suggerit pel fabricant.

El marcatge dels fragments es va realitzar amb 4 fluorocroms incorporats en els nucleòtids, utilitzant el kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit. Les reaccions d'amplificació es van realitzar a una temperatura d'hibridació de 50°C. El producte de la reacció es va separar per electroforesi en un gel de poliacrilamida/urea. Per la seqüenciació es va utilitzar un seqüenciador automàtic ABI 373 A Stretch. La seqüenciació automàtica de DNA desenvolupada per Applied Biosystems utilitza la metodologia de Sanger (Sanger *et al*, 1977), amb la polimerasa

termoestable Thermo Sequenase , que permet una reacció de seqüenciació cíclica. Es van seqüenciar les dues cadenes de cada fragment per evitar les incerteses.

La interpretació dels resultats es va fer a partir dels cromatogrames obtinguts, comparant les seqüències dels diferents individus entre elles, i amb les publicades a la literatura.