

3.3.1.4 Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de longitud Rb1.20

Per aquest marcador, Yandell i Dryja (1989b) van obtenir un haplotip heterozigot en el 95% dels individus estudiats. Altres autors han aconseguit informativitat en el 80% de les famílies analitzades utilitzant aquest marcador, i un 65% d'heterozigositat en individus no emparentats (Onadim *et al*, 1992a). Dels 31 individus analitzats, 23 van resultar heterozigots (74,2%).

La figura 13 mostra els resultats obtinguts a l'utilitzar aquest marcador.

A la **família G**, l'al·lel mutat de RB1 s'hereta juntament amb l'al·lel 3 del marcador, de procedència paterna. En aquesta família es van observar 4 al·lells diferents (fig 14, pàg 82).

A la **família Q**, que va presentar 3 al·lells diferents, la predisposició al Rb cosegrega amb l'al·lel 3 matern.

A la **família S**, la malaltia s'hereta amb l'al·lel 3, d'origen matern. Es van observar 3 al·lells (fig 14, pàg 82).

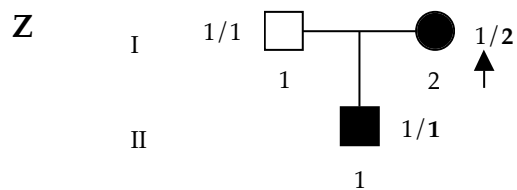
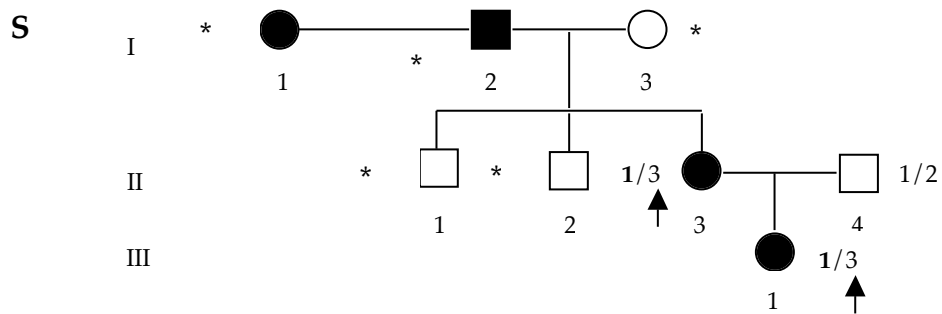
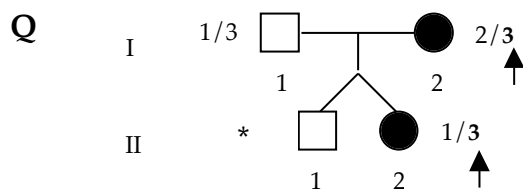
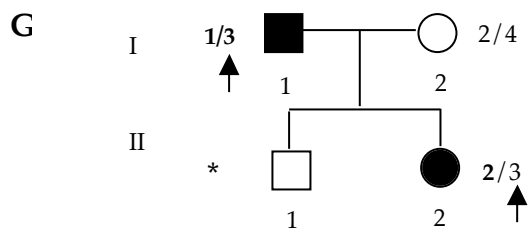
A la **família Z**, que va presentar únicament dos al·lells, la predisposició al Rb s'hereta lligada a l'al·lel 1 d'origen matern.

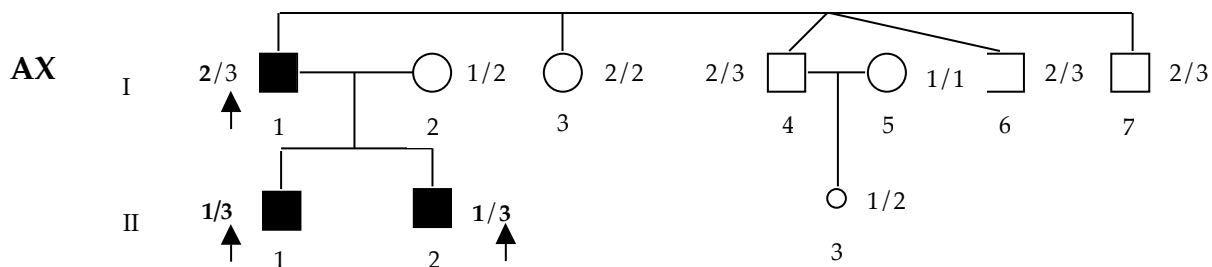
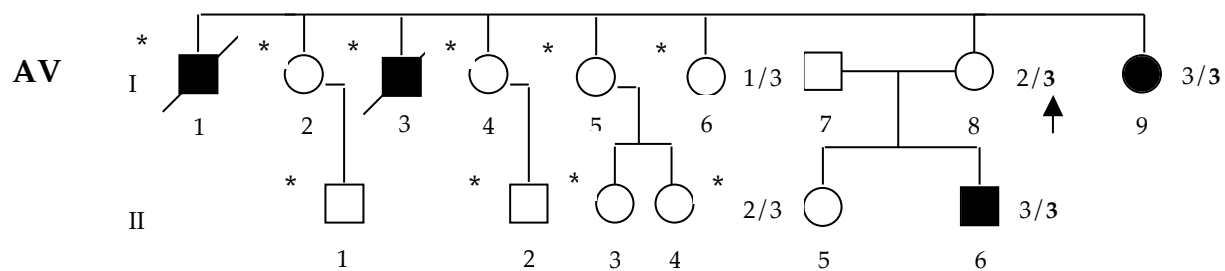
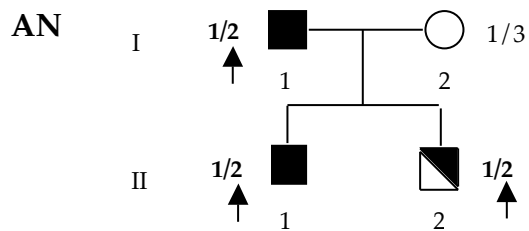
A la **família AN**, dels 3 al·lells observats, és el 2 del marcador, de procedència paterna, el que cosegrega amb el mutat de RB1 (fig 14, pàg 82).

A la **família AV**, que va presentar 3 al·lells, la predisposició al Rb s'hereta lligada al 3, de procedència materna.

A la **família AX**, entre els tres al·lells observats, l'al·lel mutat de RB1 segrega amb l'al·lel 3 del marcador, de procedència paterna.

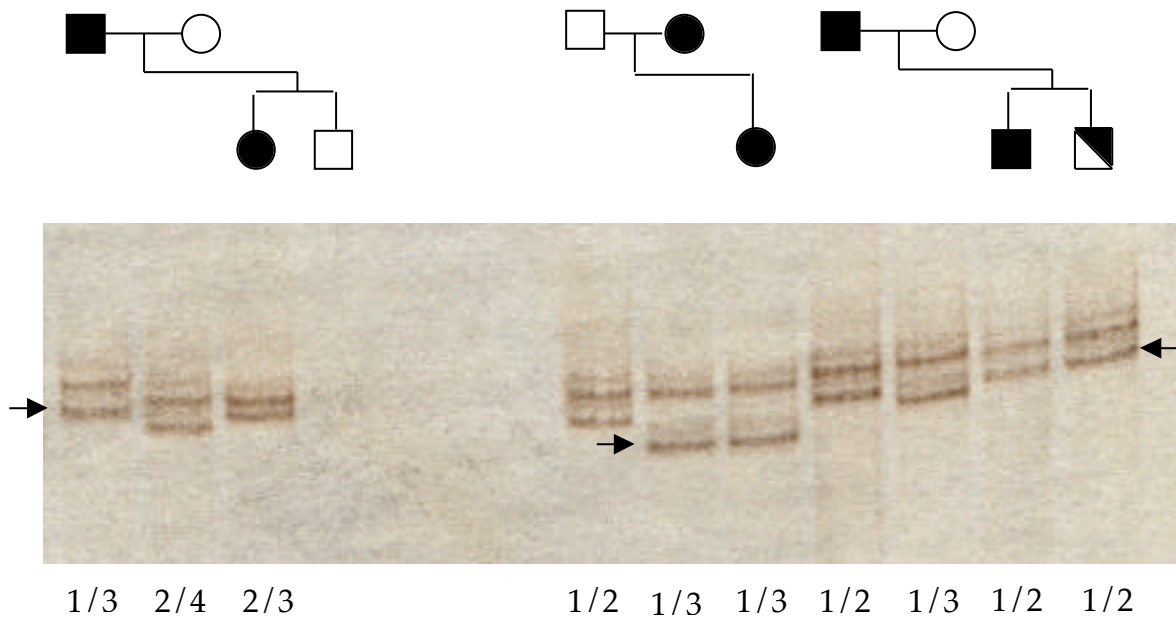
Fig. 13: marcador polimòrfic Rb1.20





* No determinat

Fig 14: anàlisi de lligament de les famílies G, S i AN utilitzant el marcador Rb1.20



Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.

3.3.1.5 Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de longitud VNTR16

Dels 13 individus estudiats, 11 van resultar heterozigots (84,6%).

La figura 15 mostra els resultats obtinguts a l'utilitzar aquest marcador.

A la **família Q**, la predisposició a la malaltia s'hereta conjuntament amb l'al·lel 1, de procedència materna. Es van caracteritzar tres al·lells diferents.

A la **família S**, que va presentar 4 al·lells diferents, l'al·lel mutat de RB1 cosegrega amb el 2, de procedència materna (fig 16, pàg 84).

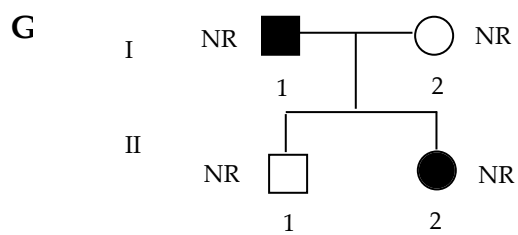
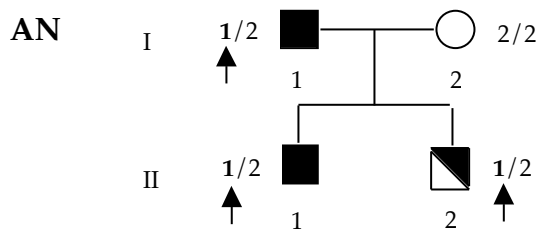
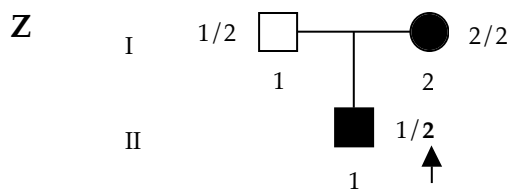
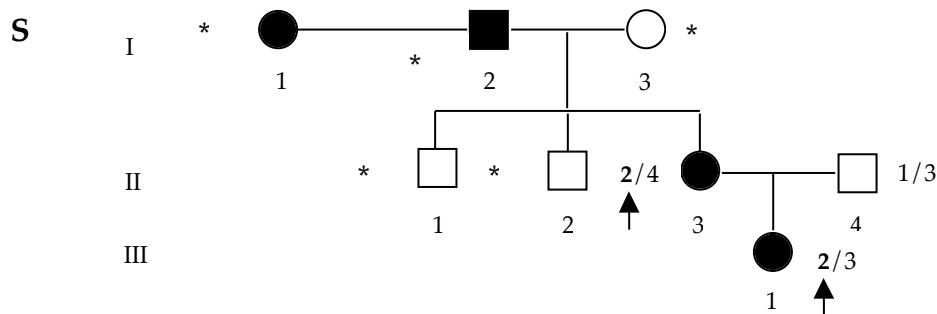
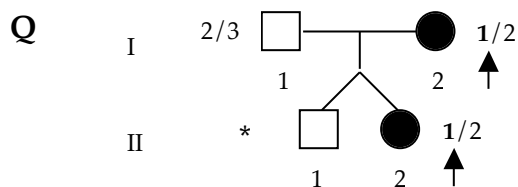
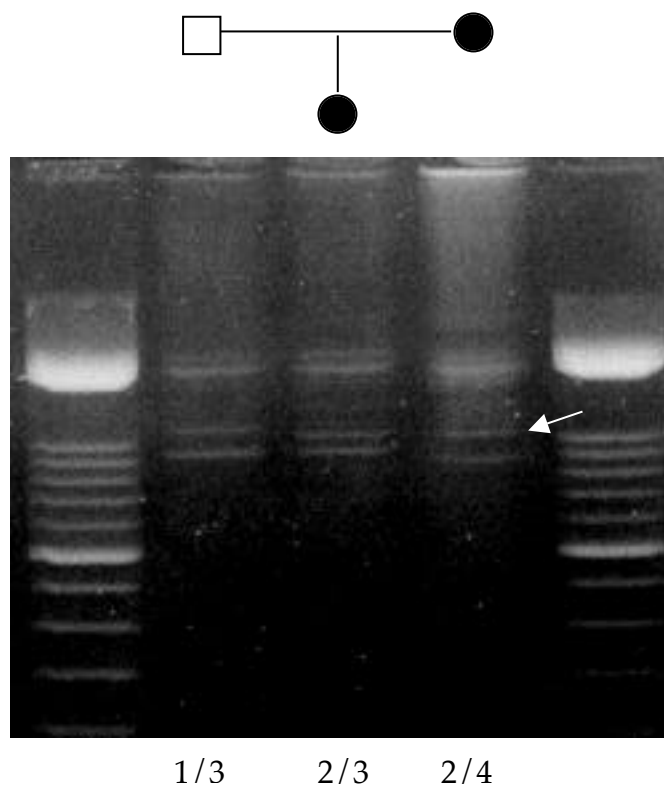


Fig. 15: Marcador polimòrfic VNTR16



* No determinat

Fig 16: anàlisi de lligament de la família S utilitzant el marcador VNTR16

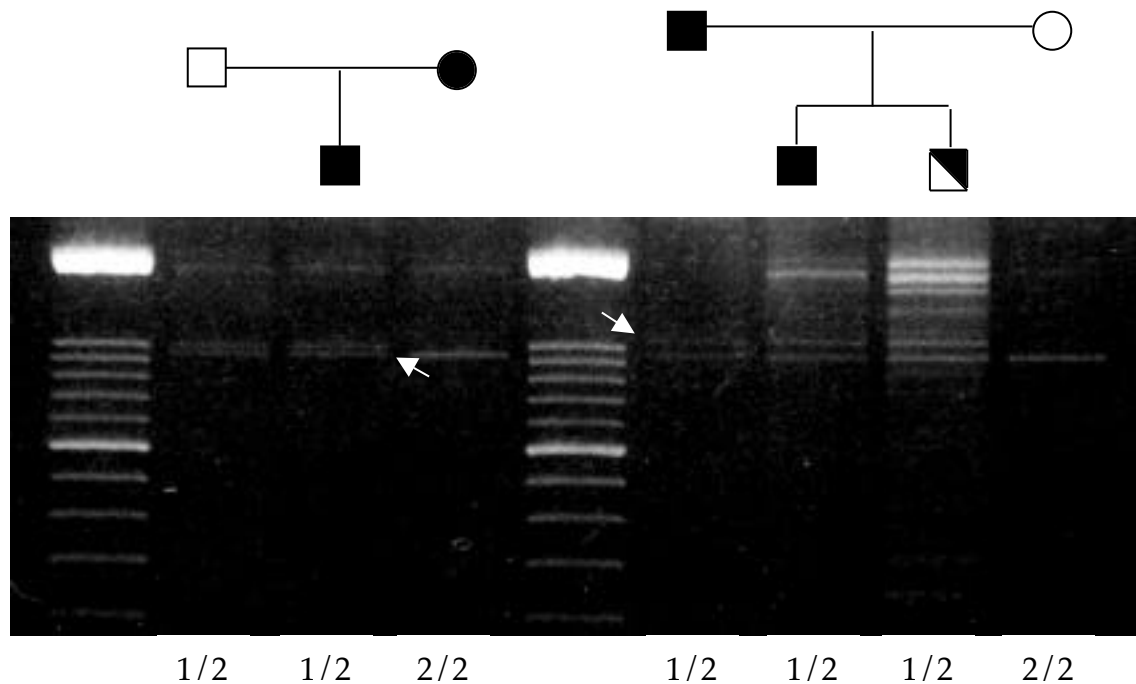


Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.

A la **família Z**, que va presentar únicament 2 al·lells diferents, la predisposició al Rb va lligada a l'al·lel **2**, procedent de la mare, homozigota 2/2 (fig 17).

A la **família AN**, amb 2 al·lells diferents, la predisposició s'hereta amb l'al·lel **1**, de procedència paterna (fig 17).

Fig 17: anàlisi de lligament de les famílies Z i AN utilitzant el marcador VNTR16



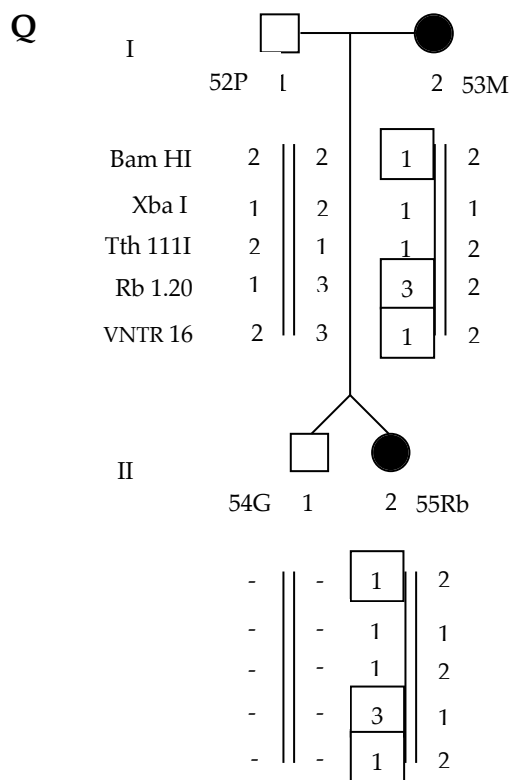
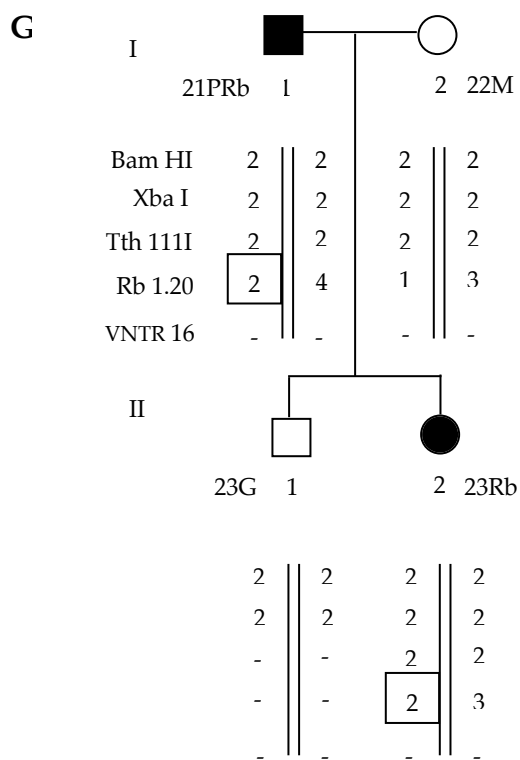
Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.

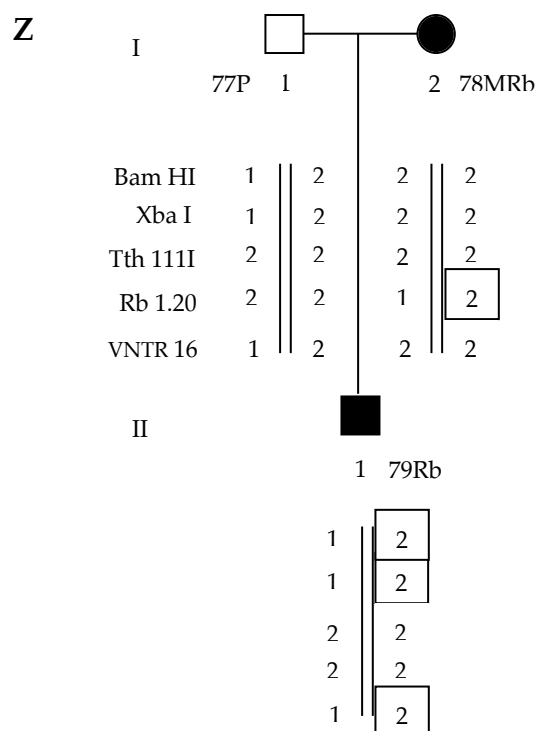
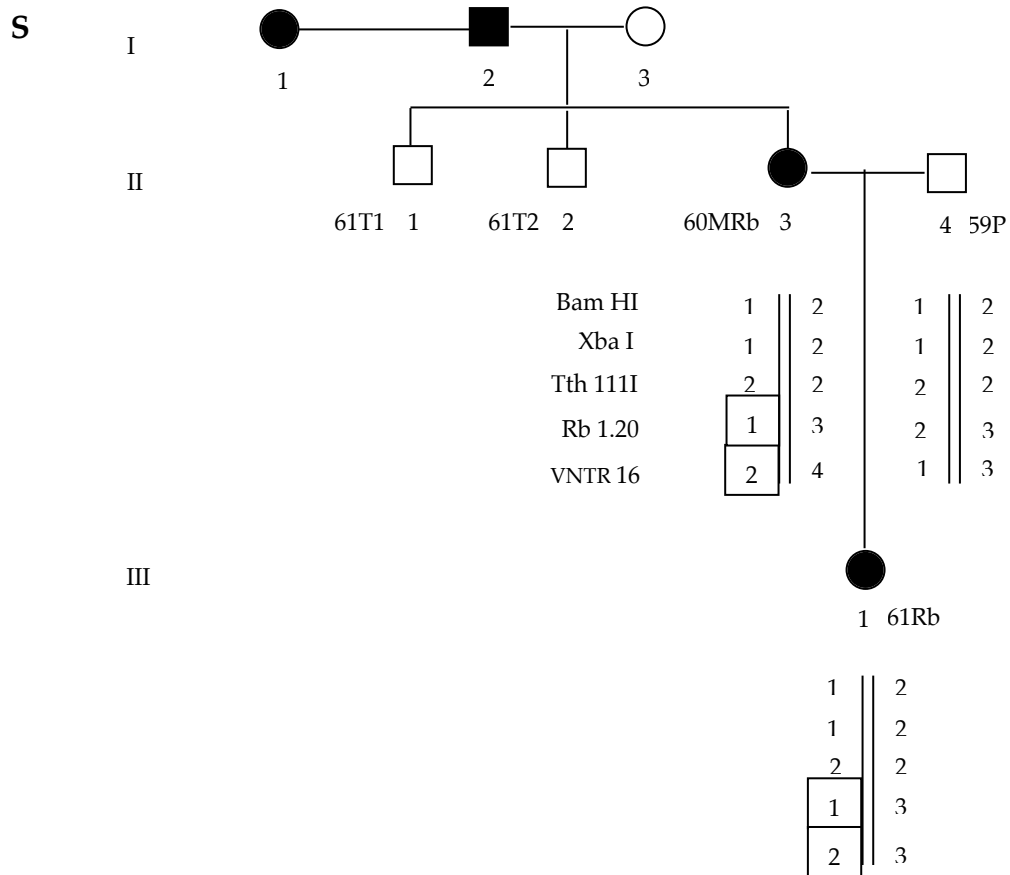
La figura 18 mostra, per cada família, el resultat de la utilització dels cinc marcadors.

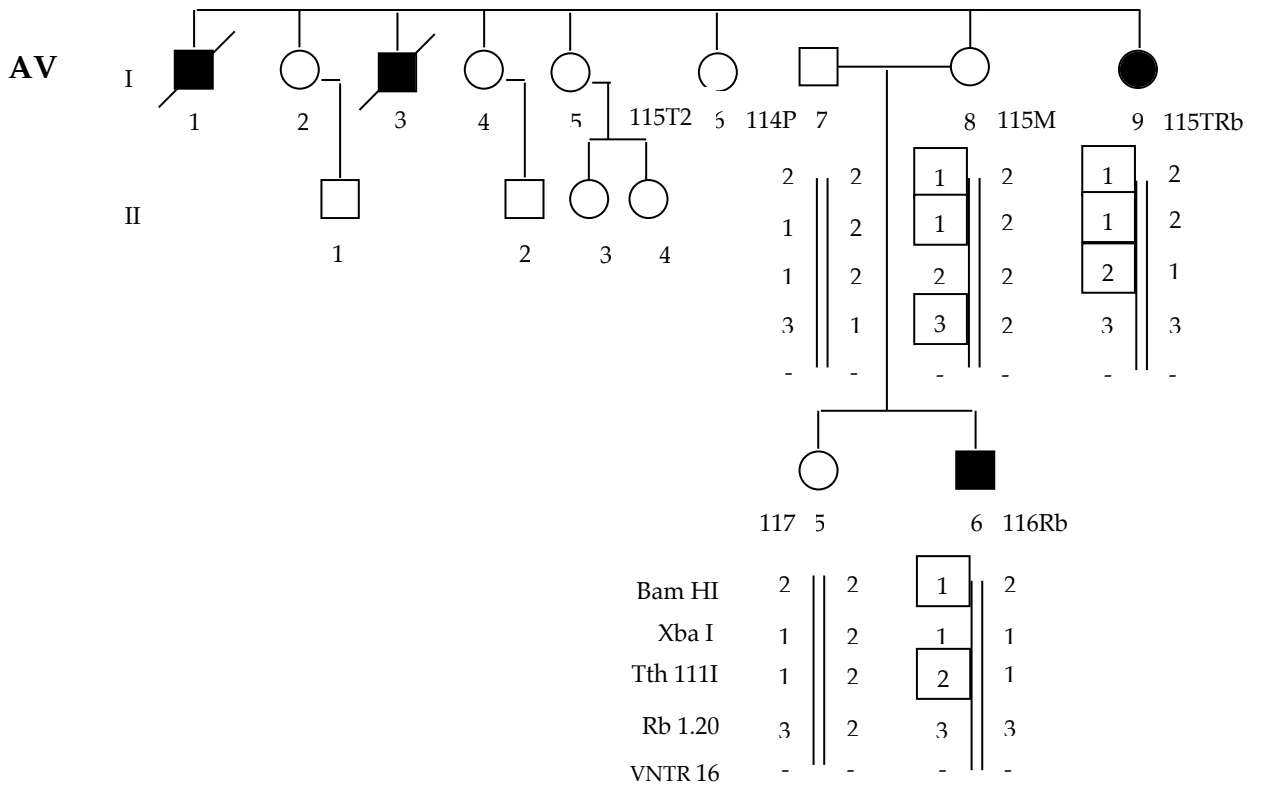
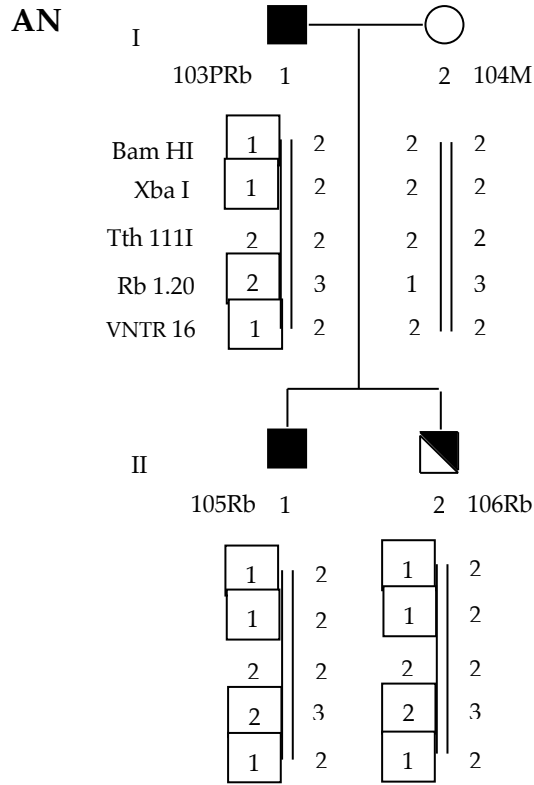
3.3.2. ANÀLISI DE MUTACIONS PER DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ I POSTERIOR SEQÜENCIACIÓ

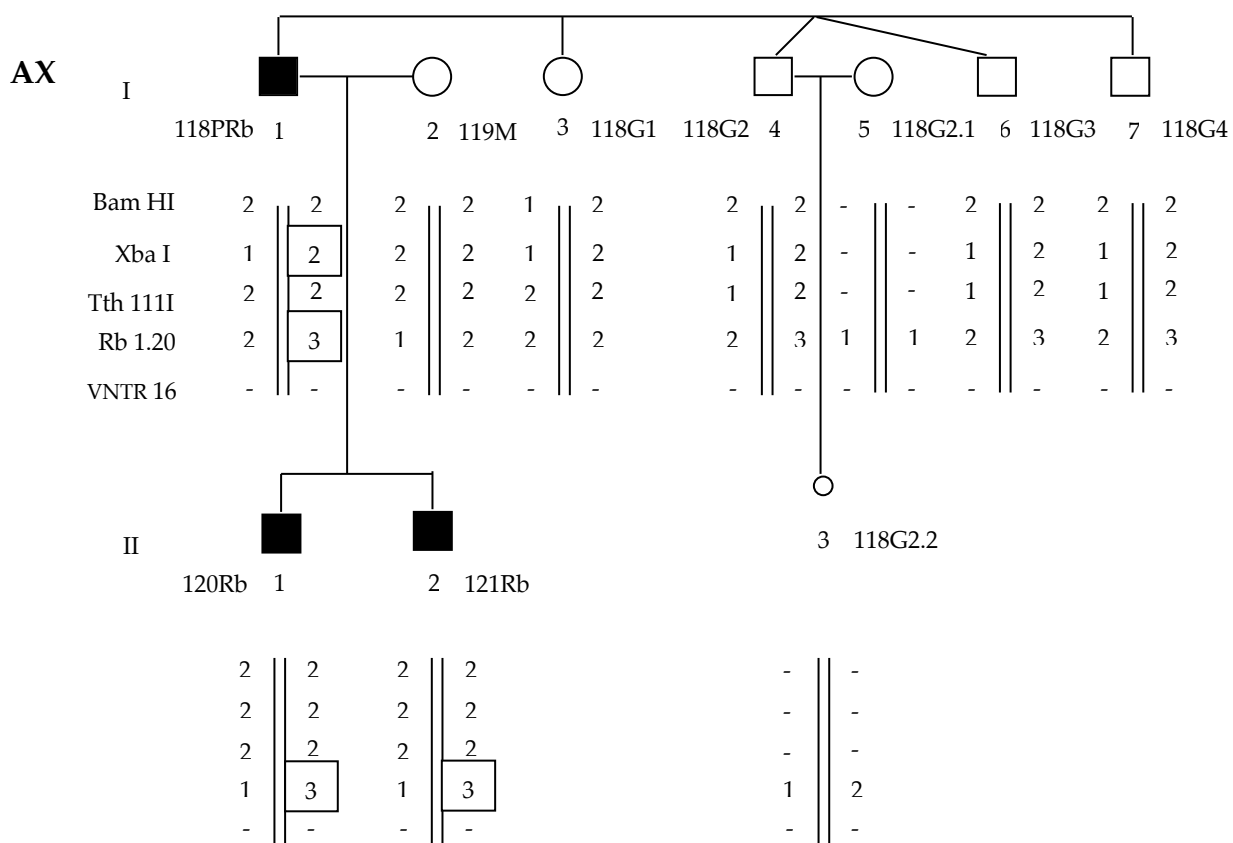
Dels 60 individus afectes dels que es va obtenir mostra per l'estudi molecular (taula 2, pàg 30) van ser analitzats un total de 40 (taula 12, pàg 66), dels quals 26 eren individus amb Rb UL o BL, sense antecedents familiars de la malaltia, i 14 pacients afectes pertanyents a famílies amb al menys dos individus afectes, en una o més generacions. També van ser estudiats 6 individus normals, familiars d'afectes, i 9 mostres de teixit tumoral, en paral·lel a l'estudi de la mostra de SP corresponent.

Fig.18: resultats de la utilització dels diferents marcadors a cada família









De dalt a baix, s'indiquen els haplotips obtinguts pels marcadors Bam HI, Xba I, Tth 111I, Rb 1.20 i VNTR16

- marcador no estudiat

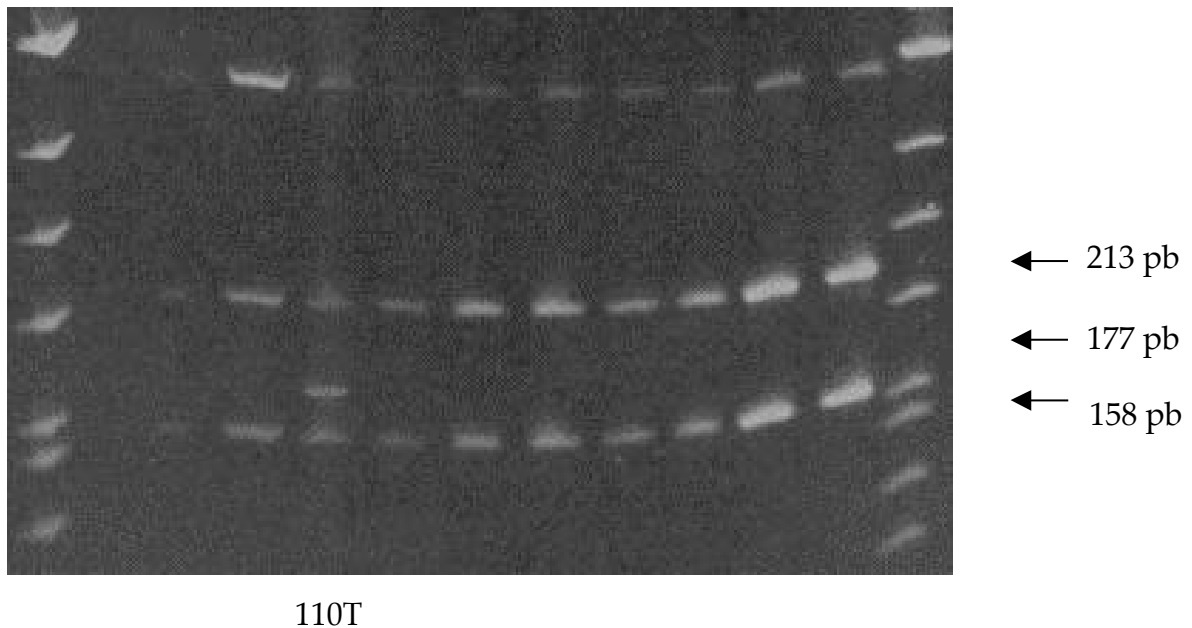
Recuadrats s'indiquen els al·lells als que va lligada la malaltia a cada família

3.3.2.1 Detecció de mutacions a l'exó 8

No es va detectar la transició de C a T en cap de les mostres de SP estudiades. Totes van mostrar un patró electroforètic de dues bandes, de 158 i 213 pb, producte de la digestió amb l'enzim HphI de la diana present en la seqüència salvatge.

Totes les mostres tumorals estudiades van resultar en un patró normal de dos bandes, excepte la mostra tumoral 110T (fig 19), del pacient 110Rb, que va presentar bandes de 213, 177, 158 i 36 pb, que evidenciaren la presència de la mutació, aparentment en heterozigosi. Aquest canvi no es va detectar en la mostra de SP del mateix individu, afecte de Rb UL d'aparició destacablement tardana, i sense antecedents familiars.

Fig 19: electroforesi exó 8. L'individu amb la mutació presenta fragments de 213, 177, i 158 pb, el de 36 pb es perd.

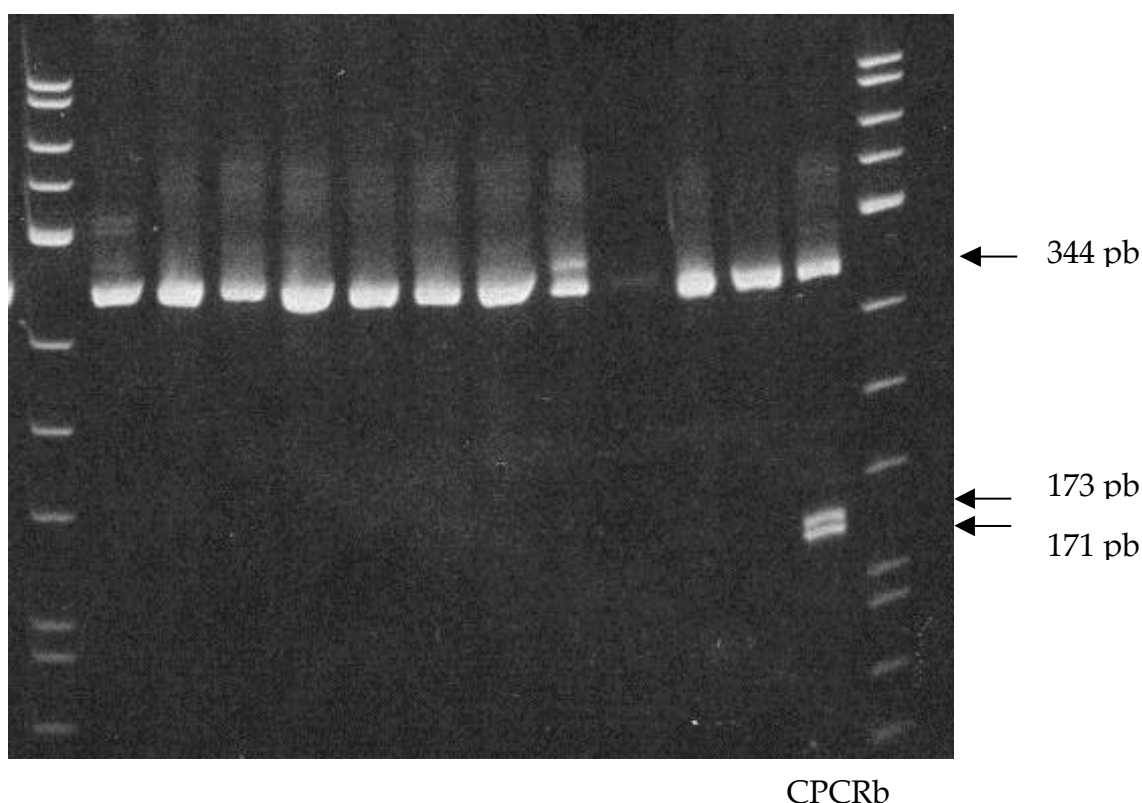


3.3.2.2 Detecció de mutacions a l'exó 18

Es va obtenir un patró electroforètic normal, consistent en una única banda de 344pb en totes les mostres estudiades excepte en la de CPCRb, que va presentar a més a més dues bandes de 171 i 173pb, producte de la digestió amb l'enzim DdeI, que reconeix una diana creada pel canvi de C a T. El patró de bandes

concorda amb la presència de la mutació en heterozigosi (fig 20). L'estudi es va realitzar en SP d'un nen afecte de Rb BL, sense antecedents familiars de la malaltia.

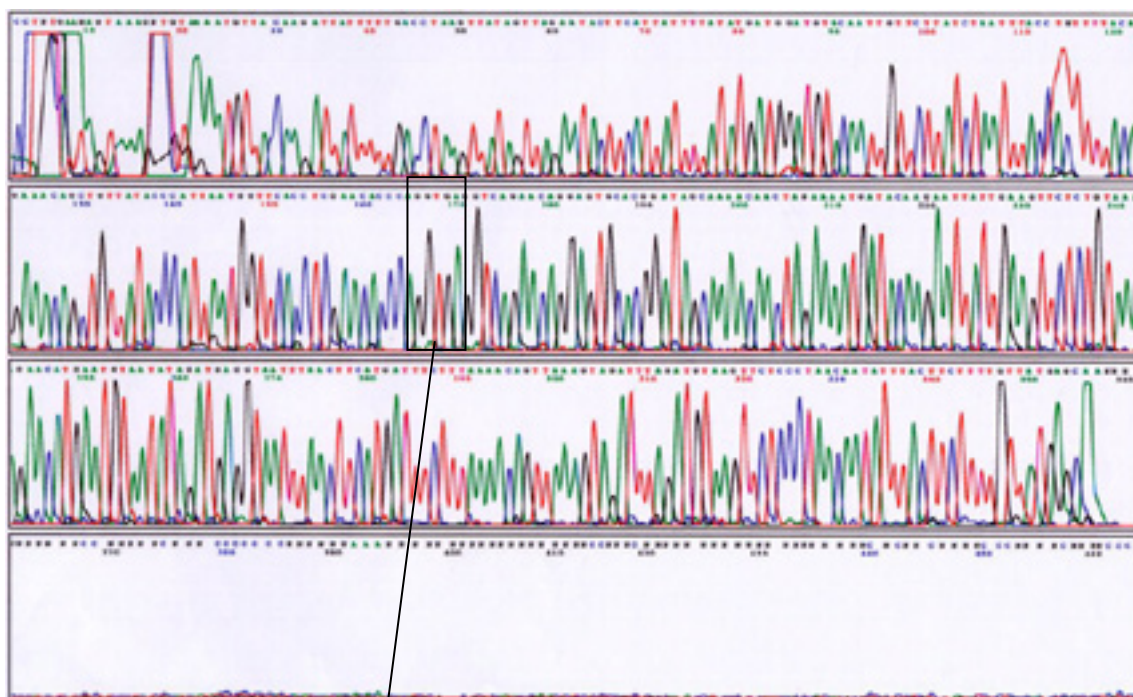
Fig 20: electroforesi exó 18. L'individu amb la mutació presenta fragments de 344, 173 i 171 pb



3.3.2.3 Seqüenciació

Les dues mutacions detectades per digestió amb enzims de restricció van ser confirmades mitjançant seqüenciació. Els cromatogrames obtinguts són compatibles amb una transició C a T a l'exó 8 en homozigosi a la mostra tumoral 110T (fig 21 i 22). La seqüenciació del fragment obtingut de SP va resultar normal (figs 23 i 24). Es va confirmar la presència d'una transició de C a T a l'exó 18 en SP del malalt CPCRb. La imatge obtinguda és compatible amb una mutació en heterozigosi (figs 25 i 26). Va ser seqüenciada com a control la mostra 33Rb, amb patró electroforètic normal (figs 27 i 28).

Fig. 21: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* de l'exó 8 de la mostra tumoral 110Rb. En detall la mutació



GGTGA

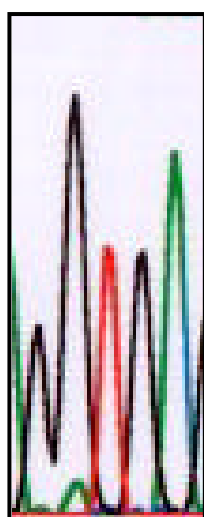


Fig. 22: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* de l'exó 8 de la mostra tumoral 110Rb. En detall la mutació

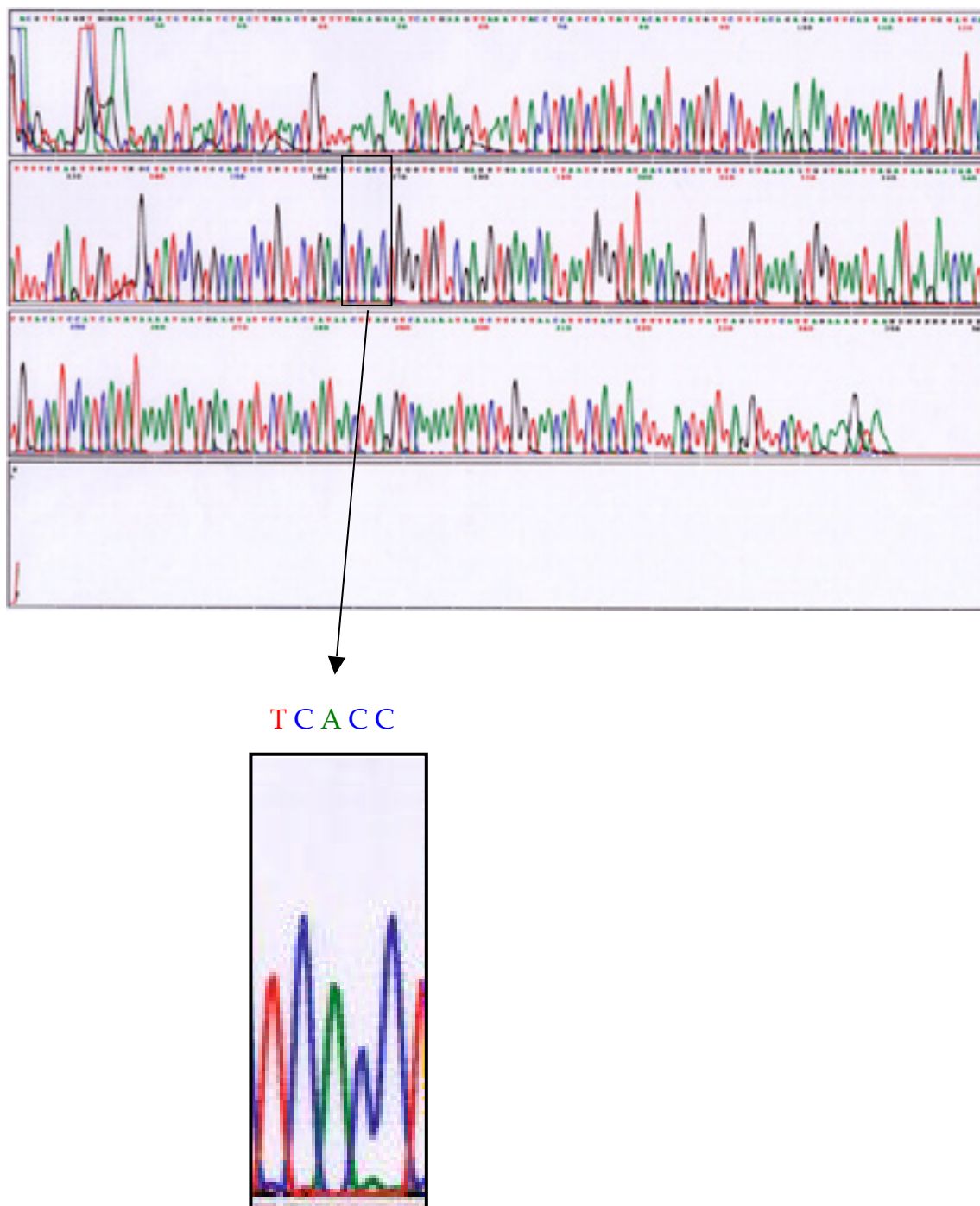


Fig. 23: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* de l'exó 8 de la mostra de SP 110Rb. En detall s'observa que no s'ha produït la transició

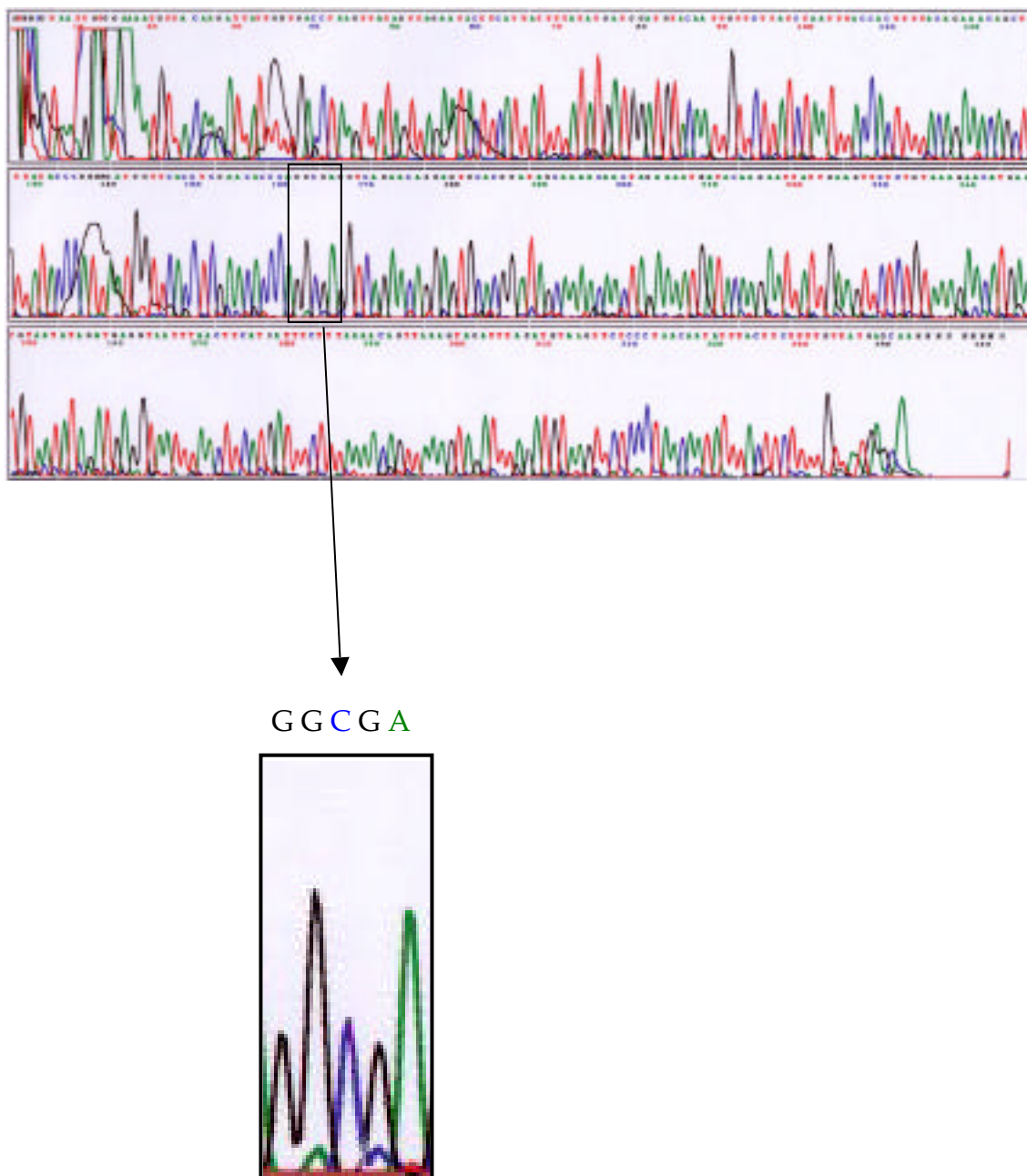
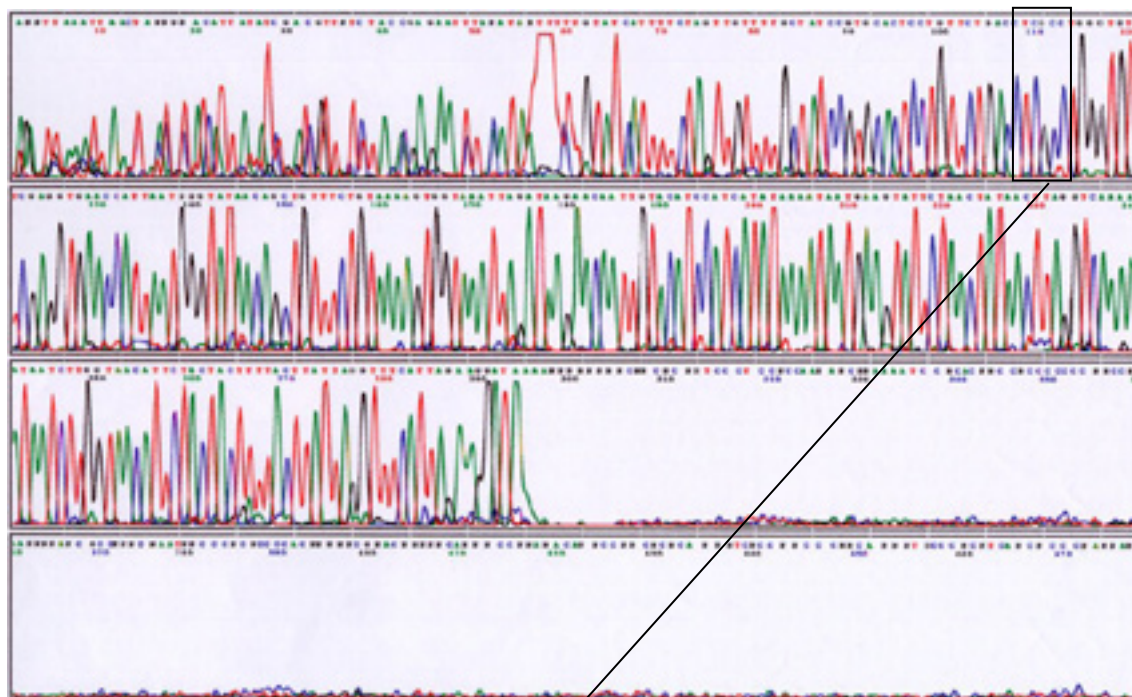


Fig. 24: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* de l'exó 8 de la mostra de SP 110Rb. En detall s'observa que no s'ha produït la transició



TCGCC

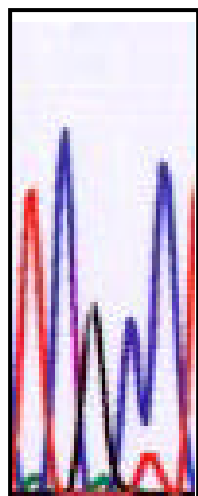


Fig. 25: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* de l'exó 18 de la mostra de SP PCRb. En detall la mutació

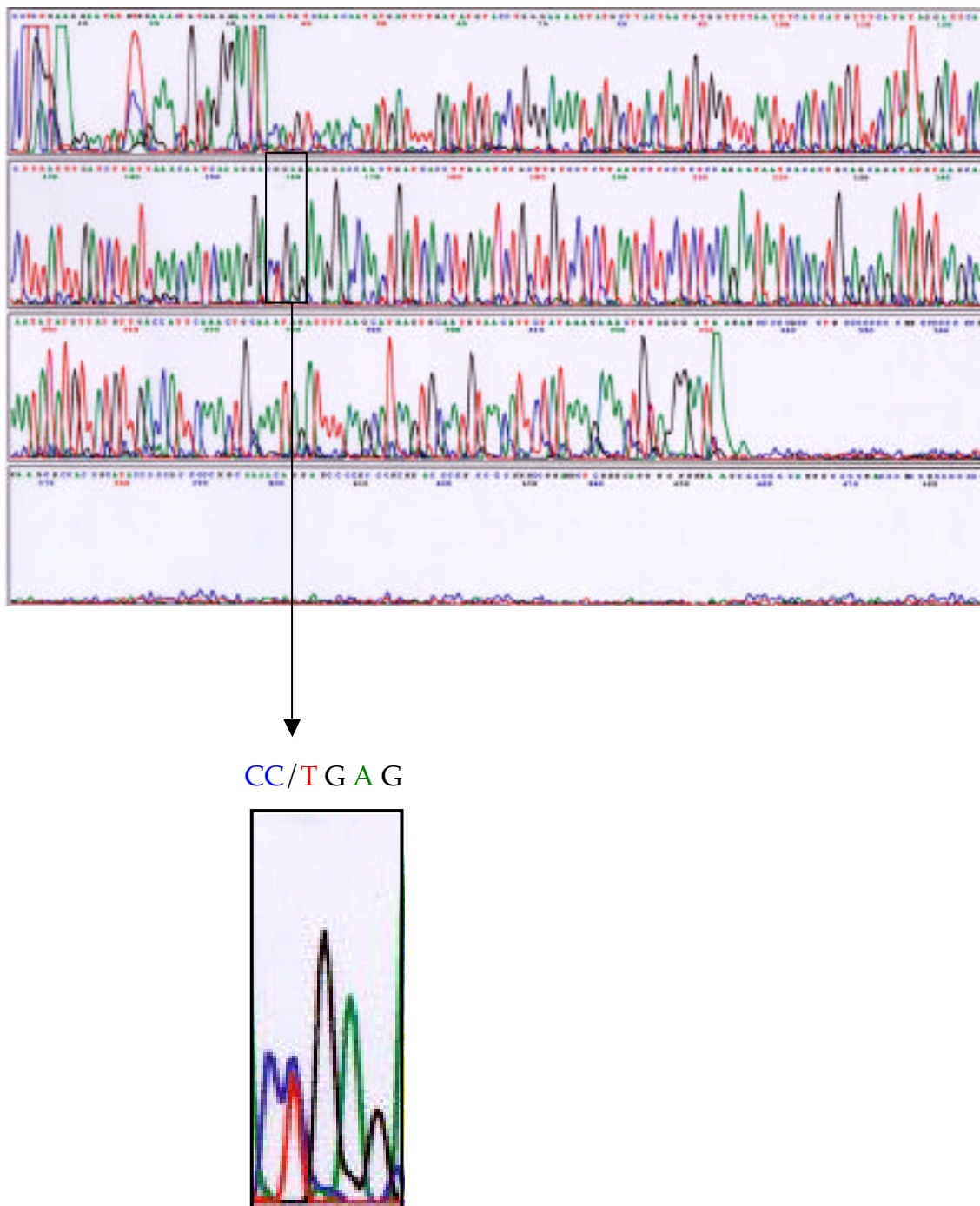
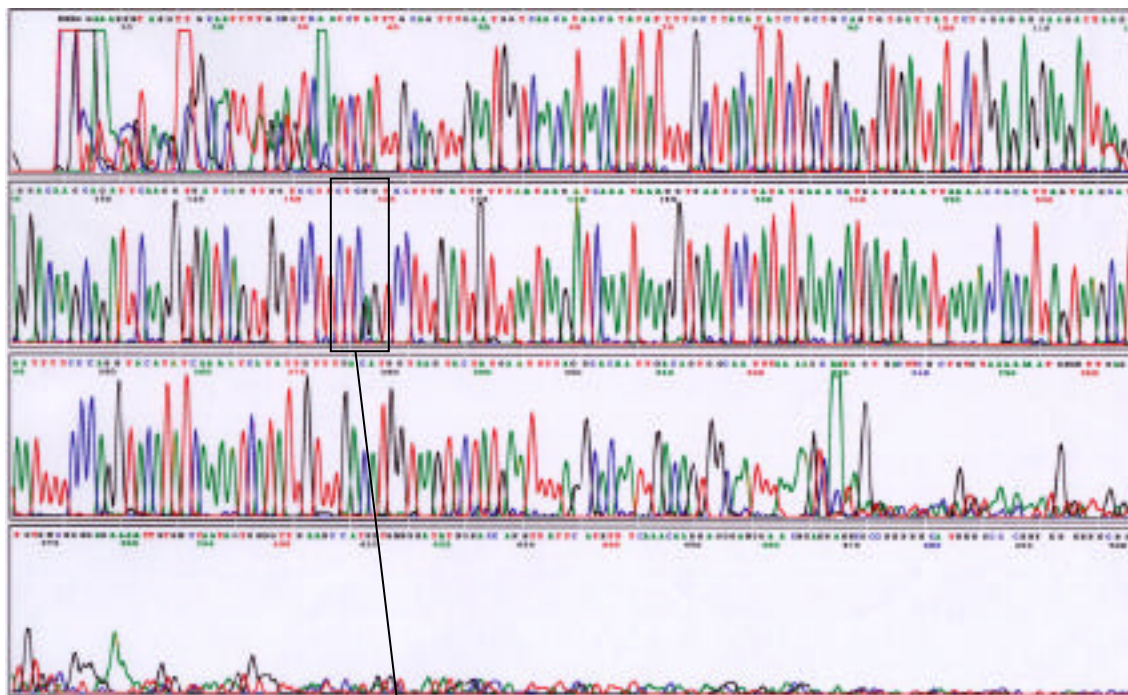


Fig. 26: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* de l'exó 18 de la mostra de SP CPCRb. En detall la mutació



CACG/AG

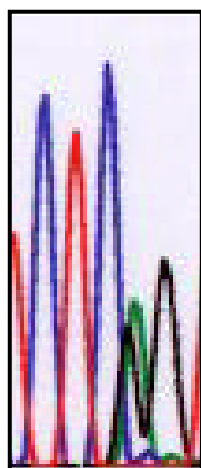


Fig. 27: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* de l'exó 18 de la mostra de SP 33Rb. En detall s'observa que no s'ha produït la transició

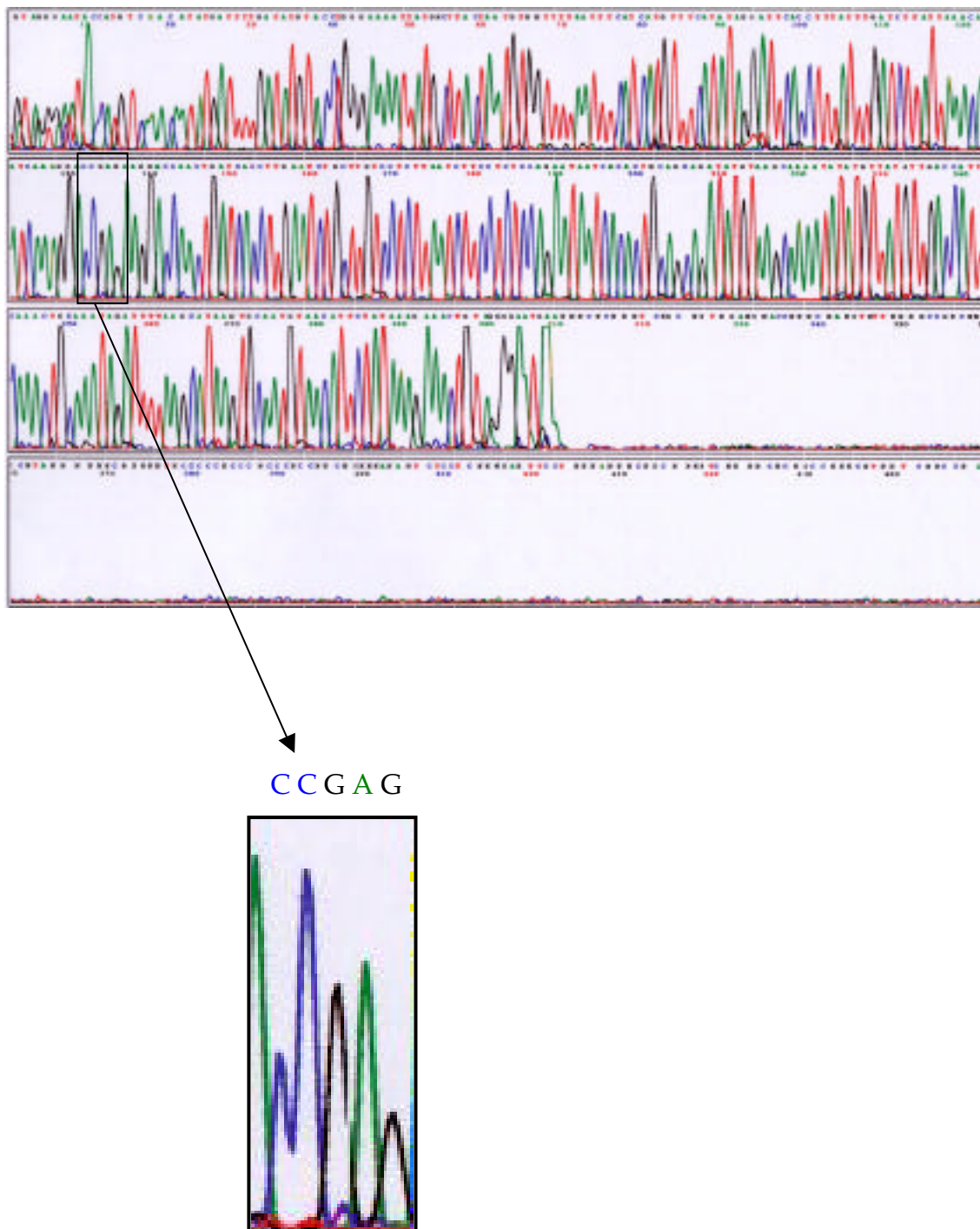


Fig. 28: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* de l'exó 18 de la mostra de SP 33Rb. En detall s'observa que no s'ha produït la transició

