

6. APÈNDIX: PACIENTS I METODOLOGIA

Pacients

Famílies de FQ

L'estudi molecular de FQ recull 780 famílies i un total de 3.525 mostres analitzades. Abans de l'estudi molecular 115 afectats havien mort. En 57 famílies, no es va disposar de mostra per òbit dels 73 afectats. En aquests casos l'anàlisi es realitzà directament als pares i/o germans.

Les mostres estudiades queden distribuïdes en 784 afectats de FQ, 1.356 pares, 598 germans, 272 tiets, 150 cosins/nebots, 194 fetus i 171 membres de la població general relacionats amb el grup familiar.

Entre els pares, un 2% va manifestar diferent grau de consanguinitat, sent la majoria cosins de primer grau.

Pacients amb altres fenotips

Així mateix, la memòria inclou els estudis realitzats en pacients ABCD (n = 163), AUCD (n = 61), PC (n = 68) i BQ (n = 59). Relacionades amb els pacients ABCD s'han analitzat 37 dones de la població general.

En conjunt la memòria compta amb 3.913 mostres analitzades.

Metodologia

La recollida de mostres ha tingut lloc en el període 1988-2003, i òbviament la metodologia a sofert canvis continuats dirigits a simplificar l'estudi. La descripció exhaustiva de cadascuna de les tècniques emprades no es considera necessària, atès que es troben a l'abast dels laboratoris amb experiència en l'anàlisi molecular i que en molts casos es tracta d'equips comercials. En conseqüència, únicament s'ha fet una breu descripció.

1. Extracció de DNA

Per l'anàlisi mutacional s'ha extret DNA genòmic a partir de sang perifèrica, vellositats corials i líquid amniòtic. Per mostres de sang perifèrica s'utilitza l'equip de Promega, *Wizard® Genomic DNA purification kit*. Per les mostres de diagnòstic prenatal s'han utilitzat els protocols fenol-cloroform (Kunkel et al. 1977) i precipitació de sals (Miller et al. 1988).

2. PCR

La seqüència genòmica de *CFTR* és a l'abast en diferents bases de dades (GenBanc, CFMDB, etc.). Les regions codificants del gen i annexes no presenten cap característica especial per la seva amplificació en termocicladors, per tant, les condicions de PCR són les habituals, excepte protocols específics descrits.

Habitualment, s'ha utilitzat una *Taq*-polimerasa corrent (Roche) amb excepció de les mostres de líquid amniòtic, que degut a la quantitat reduïda de mostra requereix una *Taq*-polimerasa de major rendiment. Per aquestes mostres utilitzem la *Taq* DNA polimerasa TripleMaster / GC rich (Eppendorf).

3. Anàlisi de mutacions freqüents

D'ençà la caracterització del gen *CFTR*, l'anàlisi directa de mutacions ha comprès progressivament les mutacions més prevalents a la nostra població, mitjançant amplificació per PCR de l'exó específic seguida, generalment, de digestió enzimàtica. A partir de 1998, es va produir un salt qualitatiu important amb els equips comercials

que permeten l'anàlisi simultània de les mutacions freqüents, en nombre que pot oscil·lar de 12 a 31.

El nostre grup ha incorporat l'equip *Applied Biosystems CF System* que detecta 31 mutacions: F508del, Y122X, R553X, G542X, R117H, R560T, N1303K, R347H, 621+1G>T, R334W, R347P, 1717-1G>A, 711+1G>T, A455E, 1898+1G>A, R1162X, Q493X, 3849+4A>G, I507del, V520F, 3849+10kbC>T, G85E, S549R, 1078delT, 2789+5G>A, S549N, 2183AA>G, W1282X, G551D, 3659delC, 3905insT. El procediment inclou una PCR múltiple seguida d'una lligació on els productes de PCR s'uneixen a les sondes. Per cada fragment amplificat, una de les sondes és comuna i té incorporat el marcatge fluorescent (en grups de tres fluorescències), les altres dues són específiques per les seqüències normal i mutada i tenen afegida una cua més o menys llarga de pentaetilenòxid. Així doncs, cada producte de PCR és reconegut per una fluorescència i tamany específics.

4. Anàlisi indirecte

Comprèn l'estudi de marcadors extragènics i intragènics. S'han protocolitzat per la seva capacitat informativa els microsatèl·lits de l'intró 8 (IVS8CA) i l'intró 17b (IVS17bTA). L'anàlisi de microsatèl·lits es realitza mitjançant PCR múltiple, per visualitzar els fragments, un encebador de cada parella es marcat amb isòtop radioactiu (Morrall et al. 1991, 1992a, 1992b) o fluorescència. El marcatge fluorescent ofereix menys risc i més fiabilitat i permet utilitzar l'equip de seqüenciació automàtica, La recollida de dades es fa en el programa 672 GeneScan™ i l'anàlisi en el programa Genotyper.

5. Tècniques de cribatge: DGGE i SSCP/HD

El cribatge comprèn l'anàlisi de les 27 regions codificants i annexes per aquelles mostres que no han estat totalment caracteritzades. S'han utilitzat dues tècniques de cribatge: L'anàlisi de la conformació de la cadena senzilla i heteroduplex (SSCP/HD) i l'electroforesi en gel de gradient desnaturalitzant (DGGE). Les tècniques de cribatge mostren una gran sensibilitat per la detecció de mutacions puntuals i es basen en que

qualsevol alteració que es produeix en la seqüència d'un fragment de DNA modifica la seva estructura i determina un canvi de la seva mobilitat, el qual es detectable en un camp elèctric. Per obtenir una bona sensibilitat (> 95%) amb aquestes tècniques es recomana que el tamany dels fragments no sigui superior a 500pb.

L'anàlisi en DGGE (Lerman et al. 1987) es basa en el punt de fusió del DNA de cadena doble. El punt de fusió depèn de la seqüència i es defineix com la temperatura a la qual la meitat del fragment es troba desnaturalitzat. Els canvis a la seqüència modifiquen la temperatura de fusió i la mobilitat electroforètica. El gradient del gel afavoreix la desnaturalització de les cadenes. L'incorporació d'una cua de GCs (~40 nucleòtids) a l'extrem 5' d'un dels encebadors permet millorar la sensibilitat. La cua de GCs aporta un increment del punt de fusió i assegura la detecció de qualsevol alteració al fragment analitzat. Un avantatge addicional de l'anàlisi en DGGE és que permet fer PCR múltiple de dos/tres exons. Onze exons s'amplifiquen en PCR múltiple: A (exons 11, 14b, 17b); B (exons 15, 20); C (exons 3, 12, 23); E (exons 5, 8, 18). A més s'analitzen de forma individual els exons 9, 14a i 21. Els fragments es visualitzen amb tinció de bromur d'etidi. Fanen i col·l. (1992) van descriure les condicions i els encebadors per l'anàlisi de *CFTR* en DGGE i Costes i col·l. (1993) van establir les condicions per l'anàlisi múltiple.

A l'anàlisi de SSCP/HD (Orita et al. 1989), el producte de PCR és desnaturalitzat permeten que les cadenes senzilles agafin una estructura secundària que dependrà del tamany i de la seqüència específica. Els heteroduplex es formen per l'anellament d'una cadena normal i una mutant. Per separar i visualitzar els fragments hem utilitzat el sistema Genephor (Amersham Pharmacia Biotech) amb gels de poliacrilamida al 12,5% i tinció amb nitrats de plata. Els tretze exons s'han analitzat un a un, excepte l'exó 13 que per la seva mida (>700pb) s'ha dividit en dos. S'han emprat, majoritàriament, els encebadors descrits per Zielenski i col·l. (1991).

6. Seqüenciació

Les tècniques de cribatge permeten detectar alteracions en la seqüència del DNA però no defineixen el tipus de mutació ni la posició. Per caracteritzar la mutació és necessari seqüenciar el fragment amb patró anòmal. Per seqüenciar s'ha obtingut un

nou producte de PCR i s'ha emprat el *BigDye Terminator Cycle Sequencing kit* (PE Applied Biosystems). Les mostres s'han analitzat en un seqüenciador automàtic.

7. Anàlisi directe de mutacions

Una vegada caracteritzada la mutació, es procura la seva detecció per PCR de l'exó corresponent i digestió enzimàtica, el que permet agilitar el diagnòstic als estudis familiars. No es considera necessari enumerar els protocols dissenyats per les 160 mutacions caracteritzades. L'electroforesi per separar els productes de PCR depèn del tamany, s'ha emprat agarosa al 1% si el fragment és prou gran, i gels de poliacrilamida (PAGE) al 6% - 8% (20 x 20 cm) pels fragments de mida petita (<100 pb). Per la visualització dels fragments en aquests tipus de gels s'ha emprat bromur d'etidi.