

APLICACION DEL METODO DE SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) EN LA DIAGNOSIS GENICA Y LA IDENTIFICACION DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA FIBROSIS QUISTICA.

Miguel Chillón, Virginia Nunes y Xavier Estivill.

Unitat de Genètica Molecular, Institut de Recerca Oncològica (IRO), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona.

Actualmente se conocen más de 150 mutaciones responsables de fibrosis quística (FQ), que permiten caracterizar el 75% de los cromosomas de la población española. Realizar un diagnóstico genético significa poder llegar hasta 150 análisis corriendo el riesgo de no llegar a conocer la mutación responsable para alguno de los cromosomas afectados. La técnica de los SSCPs permite detectar en una solo análisis cualquier cambio que se produzca en un exón o fragmento determinado de ADN, sea este cambio debido a una mutación ya descrita o bien a una nueva mutación. Esto supone un considerable ahorro de tiempo y poder realizar al mismo tiempo análisis genéticos y búsqueda de nuevas mutaciones.

Introducción La Fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva grave más frecuente en la población de raza blanca con una incidencia de 1/2000 y una frecuencia de 1/25, siendo la incidencia de la enfermedad tanto en Catalunya como en el resto de España de 1/3000.

La gran cantidad de mutaciones existentes, más de 150, suponen un inconveniente para analizar un individuo determinado, ya que para cada muestra hemos de hacer un análisis para cada mutación conocida, hasta que encontremos cual es la responsable en cada caso.

La aplicación de la técnica de los SSCPs permite analizar en un solo análisis cualquier cambio que ocurra en un fragmento determinado de ADN. Esta técnica se basa en la diferente velocidad electroforética, en geles de acrilamida no denaturantes, que presentan las cadenas simples de ADN. La velocidad electroforética depende de la resistencia que sufre una cadena simple de ADN en el gel por la conformación o plegamiento que adopta, siendo el plegamiento dependiente de la secuencia de nucleótidos de la simple cadena. Cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos, sea por substitución, delección o inserción de nucleótidos provocará un plegamiento o conformación diferente presentando una distinta movilidad electroforética que nos permitirá detectar el cambio.

Cada mutación presenta una movilidad electroforética determinada lo que nos permite, con la utilización de controles, saber que en el exón o fragmento de ADN analizado, poder identificarla.

Material y Metodos Realizamos una PCR con el fragmento a analizar utilizando un nucleótido marcado ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) en la reacción. La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 10 μl , manteniendo las proporciones de los reactivos, así como las condiciones de amplificación que utilizamos normalmente para este fragmento.

El producto de reacción se diluye 1:50, se carga en un gel de poliacrilamida al 6%, con 10% de glicerol y se deja correr dependiendo del fragmento (300 pares de bases 24 horas) a 10 Watos. Se deja exponer durante 12-24 horas.

En caso de detectar alguna banda anómala que no presente un patrón conocido con los controles de mutaciones, se corta la banda directamente del gel de acrilamida y se amplifica por PCR de nuevo, secuenciándose el producto de la PCR directamente, bien por secuenciación manual o por secuenciación automática mediante deoxynucleótidos marcados por fluorescencia.

Resultados La utilización de este método permite realizar al mismo tiempo la búsqueda de nuevas mutaciones y analizar rápidamente los exones del gen de FQ, facilitando el trabajo y ahorrando una gran cantidad de tiempo. Así, nos ha sido posible realizar:

- Identificación de nuevas mutaciones:
 - . siete nuevas mutaciones (E92K y A120T en el exón 4, R334W en el exón 7, 1609delCA en el exón 10, 2869insG en el exón 15, y R1162X y 3667del4 en el exón 19).
 - . dos nuevos polimorfismos (1001+12 C o T en el intrón 6b y 1898+152 T o A en el intrón 12).
 - . cuatro variantes de secuencia (873 C o T en el exón 6a, 1773 A o T en el exón 11, 3030 G o A en el exón 15 y 4521 (G o A en el exón 24).
- Análisis de los exónes 4, 7, 10, 11, 12, 15, 19 y 20 del gen de la FQ lo que permite detectar cerca del 40% de las mutaciones responsables de FQ, presentes en el 70% de los cromosomas de nuestra población en sólo 8 análisis. Se logra así una mayor rapidez en la identificación de las mutaciones causantes de FQ en un individuo determinado.

Discusión La aplicación de la técnica de SSCP supone un avance en el análisis de mutaciones de fragmentos determinados de ADN, ya que permite observar cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos sin necesidad de tener que utilizar ningún equipo especial. Existen otras técnicas que permiten analizar las posibles mutaciones o cambios en la secuencia de un fragmento de ADN, como la técnica de Electroforesis en Geles de Gradiente Desnaturalizante (DGGE), o la técnica de heteroduplex, o la del RNA-cleavage, pero necesitan de equipos especiales, o bien como la de heteroduplex, presentan una sensibilidad menor.

El siguiente paso en el análisis genético de la FQ es terminar de poner a punto las condiciones de SSCPs para el resto de los 27 exones del gen, y en una etapa posterior poder realizar el análisis de SSCP sobre el cDNA obtenido a partir del RNA de biopsia nasal de afectos para la enfermedad, lo que significaría reducir aún más el número de análisis y pasar a realizar un máximo de 5 o 6 análisis por individuo afecto. Al mismo tiempo se debe seguir con la búsqueda de nuevas mutaciones de manera que podamos llegar a conocer la totalidad de las mutaciones causantes de la enfermedad pudiendo realizar así análisis directo de la enfermedad y ofrecer detección de portadores en la población y diagnóstico prenatal con una fiabilidad del 100%.

Bibliografía

1. M. Chillón, V. Nunes y X. Estivill (1991) *Nucleic Acid Research* 19, 22, 6343.
2. P. Gasparini, V. Nunes, A. Savoia, M. Chillón et al. (1991) *Genomics* 10, 193-200.
3. M. Chillón, A. Palacio, V. Nunes, T. Casals, J. Giménez and X. Estivill (1992). *Human Mutation* (in press).
4. M. Chillón, A. Palacio, V. Nunes, X. Estivill. (1992) *Human Genetics* (in press).