



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **301774**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 N 15/12, C 12 Q 1/68

Patentstyret

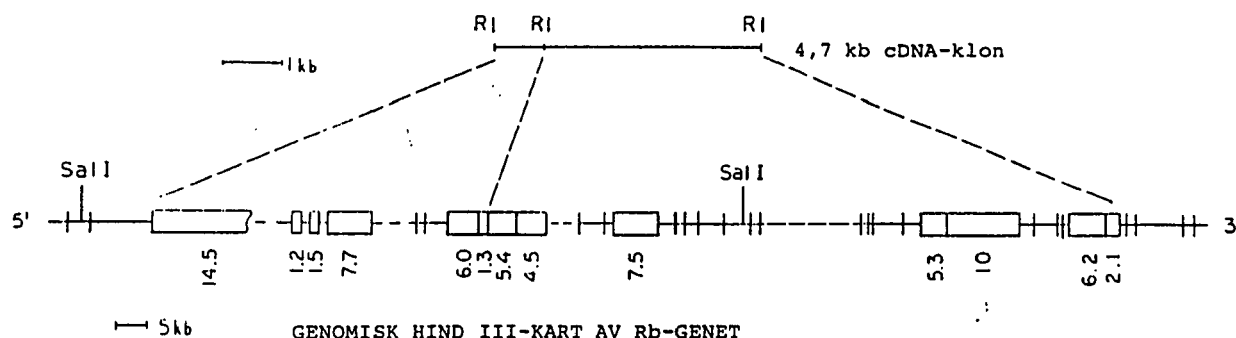
(21) Søknadsnr	885712	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	22.12.88	søknadsnummer	27.05.88, PCT/US88/01809
(24) Løpedag	27.05.88	(85) Videreføringsdag	22.12.88
(41) Alm. tilgj.	22.12.88	(30) Prioritet	29.05.87, GB, 8712646
(45) Meddelt dato	08.12.97		

(73) Patenthaver	Canji Inc, 3030 Science Park Road, Suite 302, San Diego, CA 92121, US
(72) Oppfinner	Yuen-Kai T. Fung, Los Angeles, CA, US Anne Tang, Los Angeles, CA, US William F. Benedict, Glendale, CA, US A. Linn Murphree, Los Angeles, CA, US
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **cDNA kodende for en del av Rb-proteinet, fremgangsmåte for detektering av predisposisjon overfor utvikling av retinoblastom og diagnostisk in vitro analysesett**

(56) Anførte publikasjoner Hum. Genet. (1986), 74, 249-255
Cancer Genet. Cytogen, (1984), 13, 283-295
Nature (1986), 323:6098, s. 643-646
Science (1987), vol 235, no 4794, side 1394-1399

(57) Sammendrag Fremgangsmåte og kit for detektering av predisposisjonen overfor retinoblastom. En fremgangsmåte for detektering av en defekt i retinoblastomgenet i retinoblastom, osteosarkom, fibrosarkom, melanom, bløt vevssarkom, små-cellesvulster og brystsvulster. Fremgangsmåten innbefatter hybridisering av en retinoblastomgenprobe til DNA ekstrahert fra målvevet deretter bestemmning av bindingen av proben til DNA'et. Målvevet kan være svulst- eller ikke-svulstvev fra et foster til et voksent menneske. Den innbefatter også DNA-prober på 4.6, 3.8 og 0.9 kb.



Foreliggende oppfinnelse vedrører cDNA kodende for en del av Rb-proteinet, fremgangsmåte for detektering av predisposisjon og utvikling av retinoblastom (ondartet svulst i øyets netthinne) og diagnostisk in vitro analysesett for å detektere predisposisjonen for retinoblastom. Eksempler på disse svulstene er ondartet knokkelsvulst (ostiosarkom), ondartet bindevevssvulst (fibrosarkom), bløt vevssvulst (soft issue sarkom), små-celle ondartet svulst (small-cell karsinom), malanom (svulst med utvikling av brunt/svart fargestoff) og brystsvulster.

Retinoblastom (Rb)-genet er prototypen for en klasse av recessive humane kreftgener hvori tap av aktivitet i begge normale alleler er antatt å være assosiert med tumorigenesis. Retinoblastom (Rb) oppstår i både arvelige og ikke arvelige former og det er den mest vanlige barnekreftformen som innbefatter øyet. Sporadiske bilaterale tilfeller er alltid arvelige, mens omtrent 85% av de sporadiske unilaterale tilfellene ikke er arvelige. På basis av statistisk analyse av kliniske data, er det foreslått at utvikling av retinoblastom krever at to mutasjoner oppstår. I de arvelige tilfellene, hvor kimcellelinjemutasjonen er tilstede i alle cellene, er en annen tilfeldig somatisk mutasjon i en målretinoblast postulert å være vesentlig for tumorigenesis.

Den opprinnelige antagelse angående beskaffenheten av det første mutasjonstilfellet kom fra cytogenetiske studier av lymfocytter eller fibroblaster fra pasienter med retinoblastom. En liten undergruppe av disse pasientene viste seg å ha en delesjon i den kromosomale regionen 13q14. De opprinnelige svulstcytogenetiske data impliserte også kromosom 13 som mål for det andre mutasjonstilfellet. Tap eller delvis delesjon av kromosom 13, innbefattende 13q14 ble ofte funnet i retinoblastomet fra pasienter med to tilsynelatende normale konstitusjonelle kromosom 13s.

Flere bevis på at det andre tilfellet også innbefattet det Rb-mottakelighets-lokuset i 13q14-regionen kom fra restriksjonsfragmentlengde-polymorfisme (RFLP) studiet. Ved en sammenligning av de normale konstitusjonelle og svulstgenotypene, definert ved RFLP'er på kromosom 13, ble det vist at reduksjonen til hemizygositet eller homozygositet for hele eller en del av et allel i kromosom 13 er et vanlig tilfelle ved utvikling av retinoblastom. På lignende måte, i osteosarkom, en konokkelsvulst som ofte oppstår som en primær ondartethet i tillegg i pasienter med arvelig retinoblastom, har utvikling av homozygositet eller hemizygositet i kromosom 13 blitt observert. Alle tilgjengelige data foreslår at tapet av aktivitet i begge normale alleler ved RB-lokus er kodehendelsen i utvikling av svulsten. Det er derimot inntil nå ikke vært mulig å bevise denne hypotesen med sikkerhet og å anvende denne viten for å detektere svulster som har et defekt RB-gen og å bestemme tendensen for utvikling av restinoblastom.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgende cDNA kodende for en del av Rb-proteinet, kjennetegnet ved at cDNA har en lengde opp til 4,6 Kb med en sekvens som har følgende formel:

5'	10	20	30	40
CCCCCAAAA	ACGCCCCCA	CCGCCCCCGC	TGCCCCCGCG	
50	60	70	80	
GAACCCCCCG	CACCGCCGCC	GCCGCCCCCT	CCTGAGGAGA	
90	100	110	120	
ACCCAGAGCA	GGACAGCGGC	CCGGAGGACC	TGCCTCTCGT	
130	140	150	160	
CAGGCTTGAG	TTTGAAGAAA	CAGAAGAACC	TGATTTTACT	
170	180	190	200	
GCAATTATGTC	AGAAATTAAA	GATACCAGAT	CATGTCAGAG	
210	220	230	240	
AGAGAGCTTG	GTTAACTTGG	GAGAAAGTTT	CATCTGTGGA	
250	260	270	280	
TGGAGTATTG	GGAGGTTATA	TTCAAAGAA	AAAGGAAGTG	
290	300	310	320	
TGGGGAATCT	GTATCTTTAT	TGCAGCAGTT	GACCTAGATG	
330	340	350	360	
AGATGTCGTT	CACTTTTACT	GTCTACAGA	AAAACATAGA	
370	380	390	400	

AATCACTGTC	CATAAATTCT	TTAACTTACT	AAAAGAAATT
410	420	430	440
GATACCAGTA	CCAAAGTTGA	TAATGCTATG	TCAAGACTGT
450	460	470	480
TGAAGAAGTA	TGATGTATTG	TTTGCACTCT	TCAGCAAATT
490	500	510	520
GGAAAGGACA	TGTGAAGTTA	TATATTTGAC	ACAACCCAGC
530	540	550	560
AGTTTCGATAT	CTACTGAAAT	AAATTCCTGA	TTGGTGCTAA
570	580	590	600
AAGTTTCTTG	GATCACTTTT	TTATTAGCTA	AAGGGGAAGT
610	620	630	640
ATTACAAATG	GAAGATGATC	TGGTGATTTC	ATTTCAATTA
650	660	670	680
ATGCTATGTG	TCCTTGACTA	TTTTATTAAA	CTCTCAOCTC
690	700	710	720
CCATGTTGCT	CACCCAGGCG	TATAAACAG	CTGTTATACC
730	740	750	760
CATTAAATGT	TCACCTCGAA	AACCCAGBHC	GGGTCAGAAC
770	780	790	800
AGGAGTGCAC	GGATAGCAAA	ACAACTAGAA	AATGATACA
810	820	830	840
GAATTATTGA	AATTCCTCTGT	AAAGAACATG	AATGTAAATAT
850	860	870	880
AGATGAGGTG	AAAAATGTTT	ATTTCAAAAA	TTTTATACCT
890	900	910	920
TTTATGAATT	CTCTTGGAAT	TGTAACATCT	AATGGACTTC
930	940	950	960
CAGCGGTTGA	AAATCTTTCT	AAACGATACG	AAGAAATTTA
970	980	990	1000
TCTTAAAAAT	AAAGATCTAG	ATGCAAGATT	ATTTTTGCAT
1010	1020	1030	1040
CATGATAAAA	CTCTTCAGAC	TGATTCTATA	GACAGTTTTG
1050	1060	1070	1080
AAACACAGAG	AACACCACGA	AAAAGTAACC	TTGATGAAGA
1090	1100	1110	1120
GGTGAATGTA	ATTCTCTCAC	ACACTCCAGT	TAGGACTGTT
1130	1140	1150	1160
ATGAACACTA	TCCAACAATT	AATGATGATT	TTAAATTCAG
1170	1180	1190	1200
CAAGTGATCA	ACCTTCAGAA	AATCTGATTT	CCTATTTTAA
1210	1220	1230	1240
CAACTGCACA	GTGAATCCAA	AAGAAAGTAT	ACTGAAAAGA
1250	1260	1270	1280
GTGAAGGATA	TAGGATACAT	CTTTAAAGAG	AAATTTGCTA
1290	1300	1310	1320
AAGCTGTGGA	CAGGGTTGTG	TCGAAATTGG	ATCACAGCGA
1330	1340	1350	1360
TACAAACTTG	GAGTTCGCTT	GTATTACCGA	GTAATGGAAT
1370	1380	1390	1400
CCATGCTTAA	ATCAGAAGAA	GAACGATTAT	CCATTCAAAA
1410	1420	1430	1440
TTTTAGCAAA	CTTCTGAATG	ACAACATTTT	TCATATGTCT
1450	1460	1470	1480
TTATTGCGGT	GCGCTCTTGA	GTTTGTAATG	GCCACATATA
1490	1500	1510	1520

5

10

15

20

25

30

35

GCAGAAGTAC
1530GTCTTTCCCA
1570TTTGATTTTT
1610AAGGCAACTT
1650ATGTGAACAT
1690GATTCACCTT
1730GAGAAGGACC
1770TAATCTTCCT
1810TATCTTTCTC
1850CTACGCGTGT
1890AACCTCAGCC
1930TCTCTTTCAC
1970ATCTCCGGCT
2010GCACCCAGAA
2050CACACCCCTGC
2090ATTTGGACCA
2130CAAAGTGAAG
2170ACAGCATACA
2210TCAAACGTGT
2250TATAGTGTTC
2290ACAAATATTT
2330TGCACCAATA
2370CCTAGTTCAC
2410TTTCACCCCT
2450GCCAACACCA
2490GTATCAATTG
2530AGAAAATAAA
2570CTAAAGAAGT
2610ATCTCAGAAT
1540TGGATTCTGA
1580ACAAAGTGAT
1620GACAAGAGAA
1660CGAATCATGG
1700TATTTGATCT
1740AACTGATCAC
1780CTCCAGAATA
1820CTGTAAGATC
1860AAATTCTACT
1900TTCCAGACCC
1940TGTTTTATAA
1980AAATACACTT
2020TTAGAACATA
2060AGAATGAGTA
2100AATTATGATG
2140AATATAGACC
2180AGGATCTTCC
2220TTTGATCAAA
2260TATAACTCGG
2300TGCAGTATGC
2340CCTCACATTC
2380CCTTACGGAT
2420GAAGAGTCCA
2460ACAAAAATGA
2500GTGAATCATT
2540TCAGATGGTA
2580GCTGAAGGAA
2620CTTGATTCAG
1550ATGTGCTTAA
1590CGAAAGTTTT
1630ATGATAAAC
1670AATCCTTTGC
1710TATTAAACAA
1750CTTGAATCTG
1790ATCACACTGC
1830TCCAAAGAAA
1870GCAAATGCAG
1910AGAAGCCATT
1950AAAAGTGTAT
1990TGTGAACGCC
2030TCATCTGGAC
2070TGAACTCATG
2110TGTTCCATGT
2150TTAAATTCAA
2190TCATGCTGTT
2230GAAGAGGAGT
2270TCTTCATGCA
2310TTCCACCAGG
2350CTCGAAGCCC
2390TCCTGGAGGG
2430TATAAAATTT
2470CTCCAAGATC
2510CGGGACTTCT
2550TGTAACAGCG
2590GCAACCCCTC
2630GAACAGATTT
1560TTTAAAAACC
1600ATCAAAGCAG
1640ATTTAGAAGC
1680ATGCTCTCTA
1720TCAAAGGACC
1760CTTGCTCTCT
1800AGCAGATATG
1840AAAGGTTCAA
1880AGACACAAGC
1920GAAATCTACC
1960CGGCTAGCCT
2000TTCTGTCTGA
2040CGTTTTCCAG
2080AGAGACAGGC
2120ATGGCATATG
2160AATCATTGTA
2200CAGGAGACAT
2240ATGATTCTAT
2280GAGACTGAAA
2320CCCCCTACCT
2360TTACAAGTTT
2400AACATCTATA
2440CAGAAGGTCT
2480AAGAATCTTA
2520GAGAAGTTCC
2560ACCGTGTGCT
2600TAAACCACTG
2640

AAAAA	ACTAC	GCTTT	GATAT	TGAAG	GATCA	GATGA	AGCAG
2650		2660		2670		2680	
ATGGA	AGTAA	ACATC	TCCCA	GGAGA	GTCCA	AATTT	CAGCA
2690		2700		2710		2720	
GAAAC	TGGCA	GAAAT	GACTT	CTACT	CGAAC	ACGAAT	GCAAA
2730		2740		2750		2760	
AAGCA	AAAAA	TGAAT	GATAG	CATGG	ATACC	TCAAAC	AAAGG
2770		2780		2790		2800	
AAGAG	AAATG	AGGAT	CTCAG	GACCT	TGGTG	GACACT	GTGT
2810		2820		2830		2840	
GCACCT	CTGG	ATTCAT	TGTG	TCTCA	CAGAT	GTGACT	GTAT
2850		2860		2870		2880	
AACTTT	TCCCA	GGTTC	TGTTT	ATGGC	CACAT	TTAATAT	CTTT
2890		2900		2910		2920	
CAGCTC	TTTTT	TGTGG	ATATA	AAATG	TGCAG	ATGCAAT	TTGT
2930		2940		2950		2960	
TTGGGT	GATT	CCTAA	GCCAC	TTGAA	TGTT	AGTCAT	TGTT
2970		2980		2990		3000	
ATTTAT	ACAA	GATTG	AAAT	CTTGT	GTAAA	TCCTG	CCATT
3010		3020		3030		3040	
TAAAA	AGTTG	TAGCA	GATTG	TTTCT	CTTC	CAAAGT	AAAAA
3050		3060		3070		3080	
TTGCTG	TGCT	TTATG	GATAG	TAAGA	ATGGC	CCTAGA	GTGG
3090		3100		3110		3120	
GAGTC	CTGAT	AACCC	AGGCC	TGTCT	GACTA	CTTTG	CCCTC
3130		3140		3150		3160	
TTTTG	TAGCA	TATAG	GTGAT	GTTTG	CTCTT	GTTTT	TATTA
3170		3180		3190		3200	
ATTTAT	TATGT	ATATTT	TTTTT	AATTT	AACAT	GAACAC	CCCTT
3210		3220		3230		3240	
AGAAA	ATGTG	TCCTAT	CTAT	CTTCC	AAATG	GAATTT	GATTT
3250		3260		3270		3280	
GACTG	CCCAT	TCACCA	AAAT	TATCT	GTAC	TCTTCT	GTCAA
3290		3300		3310		3320	
AAATG	GATAT	TATTAG	AAAT	TAGAAA	AAAAA	TTACTA	ATTTT
3330		3340		3350		3360	
TACAC	ATTAG	ATTTAT	TTTTT	ACTAT	TGGAA	TCTGAT	ATATC
3370		3380		3390		3400	
TGTGT	GCTTG	TTTTAT	AAAAA	TTTTG	CTTTT	AATTA	AAATA
3410		3420		3430		3440	
AAGCT	GGAAG	CAAAG	TATAA	CCATAT	GATA	CTATCA	TACT
3450		3460		3470		3480	
ACTGA	AAACAG	ATTTCA	TACC	TCAGA	ATGTA	AAAGA	ACTTA
3490		3500		3510		3520	
CTGAT	TATTT	TCTTC	ATCCA	ACTTA	TGTTT	TTAAAT	GTAGG
3530		3540		3550		3560	
ATTAT	TGATA	GTACT	CTTGG	TTTTT	TATACC	ATTCAG	ATCA
3570		3580		3590		3600	
CTGA	ATTAT	AAAGT	ACCCA	TCTAG	TACTT	GAAAA	AGTAA
3610		3620		3630		3640	
AGTGT	TCTGC	CAGAT	CTTAG	GTATAG	AGGA	CCCTA	ACACA
3650		3660		3670		3680	
GTATAT	TCCCA	AGTGC	ACTTT	CTAAT	GT TTC	TGGGT	CTCTGA
3690		3700		3710		3720	
AGAA	TTAAGA	TACAA	TTAA	TTTTA	CTCCA	TAAAC	AGACT
3730		3740		3750		3760	

	GTTAATTATA 3770	GGAGCCTTAA 3780	TTTTTTTTTC 3790	ATAGAGATTT 3800
	GTCTAATTGC 3810	ATCTCAAAT 3820	TATTCTGCCC 3830	TCCTTAATTT 3840
	GGGAAGGTTT 3850	GTGTTTTCTC 3860	TGGAATGGTA 3870	CATGCTCTCC 3880
5	ATGTATCTTT 3890	TGAACTGGCA 3900	ATTGCTATT 3910	TATCTTTTAT 3920
	TTTTTTAAGT 3930	CAGTATGGTC 3940	TAACACTGGC 3950	ATGTTCAAAG 3960
	CCACATTATT 3970	TCTAGTCCAA 3980	AATTACAAGT 3990	AATCAAGGGT 4000
	CATTATGGGT 4010	TAGGCATTAA 4020	TGTTTCTATC 4030	TGATTTTGTG 4040
10	CAAAAGCTTC 4050	AAATTAAAC 4060	AGCTGCATTA 4070	GAAAAAGAGG 4080
	CGCTTCTCCC 4090	CTCCCCTACA 4100	CCTAAAGGTG 4110	TATTTAAACT 4120
	ATCTGTGTGA 4130	TTAACTTATT 4140	TAGAGATGCT 4150	GTAACCTAAA 4160
	ATAGGGGATA 4170	TTTAAGGTAG 4180	CTTCAGCTAG 4190	CTTTTAGGAA 4200
15	AATCACTTTG 4210	CCTAACTCAG 4220	AATTATTTTT 4230	AAAAGGAAT 4240
	CTGGTCTTGT 4250	TAGAAACAA 4260	AATTTTATT 4270	TGTGCTCAGT 4280
	TAAGTTTCAA 4290	ACTTACTATT 4300	TTGACAGTGA 4310	TTTTGATAAC 4320
	AATGACACTA 4330	GAAACTTGA 4340	CTCCATTCA 4350	TCATTGTTTC 4360
20	TGCATGAATA 4370	TCATACAAAT 4380	CAGTATGTTT 4390	TTAGGTCAAG 4400
	GCCTTACTAT 4410	TTCTGGGTCT 4420	TTTGCTACTA 4430	AGTTCACATT 4440
	AGAATTAGTG 4450	CCAGAATTTT 4460	AGGAACTTCA 4470	GAGATCGTGT 4480
	ATTGAGATTT 4490	CTTAAATAAT 4500	GCTTCAGATA 4510	TTATTGCTTT 4520
25	ATTGCTTTTT 4530	TGTATTGGTT 4540	AAAAGTGTAC 4550	ATTTAAATTT 4560
	GCTATGTTAC 4570	TATTTTCTAC 4580	AATTAATAGT	TTGTCTATTT
	TAAAATAAAT	TAGTTGTTAG	3'	

og fragmenter og derivater derav kodende for minst en del av
 30 retinoblastomgenet, og at minst en del av nevnte cDNA er
 hybridiserbar til 5'-enden av retinoblastomgenet.

Det er også beskrevet en fremgangsmåte for detektering av en
 predisposisjon overfor utvikling av retinoblastoma, kjenne-
 35 tegnet ved at følgende trinn utføres:

- a) hybridiserer in vitro en merket retinoblastomgenprobe som omfatter et cDNA ifølge krav 1, 2 eller 3 til DNA ekstrahert fra et målvev; og
- b) bestemmer bindingen av proben til nevnte DNA.

5

Målvevet er ikke-svulstvev og kan være fetalt vev, og likeledes, postnatalt til voksent vev.

10

I andre utforminger kan fremgangsmåten bli anvendt for detektering av svulster som inneholder en retinoblastomgendefekt. Denne fremgangsmåten kan for eksempel bli anvendt for å detektere denne effekten i ondartet knokkelsvulst, ondartet bindevevssvulst, bløtvevssvulst, små-celle ondartet svulst, melanom og brystsvulster.

15

Det er også beskrevet et diagnostisk in vitro analysesett for å detektere predisposisjon for retinoblastoma kjennetegnet ved at det omfatter:

20

minst et cDNA ifølge kravene 1, 2 eller 3 spesifikt for retinoblastomgenet, hvori nevnte cDNA er effektivt når det blir hybridisert med DNA fra en målcelle for å indikere tilstedeværelse eller fravær av retinoblastomgen, i det nevnte cDNA koder for en del av Rb proteinet.

25

Den foreliggende oppfinnelse er nyttig til deteksjon av en mengde svulster som har en defekt i retinoblastomgenet.

30

Andre hensikter, trekk og fordeler vil komme klart frem fra følgende beskrivelse av de fortiden foretrukne fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, gitt som en redegjørelse når den blir sett i sammenheng med velagte tegninger.

Kort beskrivelse av tegningene.

35

Oppfinnelsen forstås lettere etter lesing av følgende beskrivelse og ved referanse til de vedlagte tegningene som danner en del derav:

Fig. 1A er et restriksjonskart av Rb-lokuset ved H3-8-regionen. EcoR1, Hind III, Bgl II, Xba I og Sac I restriksjonsfragmentene fra det genomiske DNA'et til en normal human fibroblast (WSI) ble klonet inn i seter i Charon 21A, CH17 eller λ gtWES\B. Restriksjonskart av Rb-lokuset ved H3-8-regionen. En EcoR1 7.7 kb klon ble isolert fra et genomisk bibliotek konstruert ved fullstendig fordøying av det genomiske DNA'et til en normal human fibroblast WSI med EcoR1 og klonet inn i EcoR1-setet i bakteriofag lambdavektor Charon 21A. Restriksjonsfragmentet som var fri for gjentakende sekvens tilveiebrakt nære ved endene av denne klonen ble deretter anvendt som prober for å skrine et genomisk bibliotek av Hind III-fragmentet fra WSI. På lignende måte ble overlappende kloner undersøkt fra genomiske bibliotek konstruert fra fullstendig fordøyd WSI-genomisk DNA med Bgl II eller Sac I. Restriksjonsenzymseter er indikert som følger: R, EcoR1; S, Sac I; P, PstI; B, Bgl II; H, Hind III; Sp, Sph I.

Fig. 1B er en Northern-blot-analyse av udødeliggjorte humane fetale netthinneceller. Polyadenylert RNA ble isolert fra de humane fetale netthinnecellelinjene Ad5/HER B90 og Ad12/HER 8.24 udødeliggjort ved transfeksjon med DNA fra adenovirus 5 og adenovirus 12 respektivt. 10 μ g av hvert isolert RNA ble separert ved en 1% agarosegelelektroforese i 2.2 M formaldehyd og overført til genskrinmembranet. ^{32} P merkede komplementære RNA'er ble syntetisert i henhold til standard fremgangsmåter ved anvendelse av Bam H I linearisert pG4-4 og pESD, en subklon av en 1.3 kb human esterase cDNA-klon. Tilfeldige primerprober ble syntetisert ved anvendelse av en standard fremgangsmåte. Hybridiseringen ble utført ved 42°C i 50% formamid, 3xSSC, 1x Denhardt, 0.1 M Hepes pH 7.4, 0.05% SDS. Vasking ble utført med 2xSSC ved romtemperatur i 20 minutter etterfulgt av 0.1xSSC, 0.1% SDS ved 65°C to ganger i en time hver gang. 4.7 kb transkriptet ble detektert med pG4-4-proben og 1.3 kb med pESD-proben.

Fig. 2A er et restriksjonskart av 4.6 kb cDNA'et til Rb-genet. 4.6 kb cDNA-klonen ble isolert fra et cDNA-bibliotek. Restriksjonsenzymsetene er indikert som følger: R1, EcoR 1; Hp, Hpa I; EV, EcoR V; Pv, Pvu II; Bg, Bgl II; Nd, Nde I; Nc, Nco I; Ps, Pst I; H III, Hind III.

Fig. 2B viser den lineære rekkefølgen av Hind III-restriksjonsfragmentene detektert med de forskjellige cDNA-probene. Hver av boksene representerer et diskret Hind III-fragment, og størrelsen (kb) er indikert ved tallet i boksen.

Fig. 3A er en Southern-blot-analyse av Hind III-genomisk DNA fra normale celler, retinoblastom og deres konstitusjonelle celler som er blitt hybridisert til pGH2, som er en subklon av Eco R1 0.9 kb-fragmentet ved 5'-enden av cDNA-klonen.

Fig. 3B er en Southern-blot-analyse av Hind III-genomisk DNA fra normale celler, retinoblastom og deres konstitusjonelle celler hybridisert til en liten pG 3.8 m, som er en subklon av Eco R1 3.8 kb-fragmentet til cDNA-klonen.

I både fig. 3A og 3B, innbefatter fil 1 normale kontroll-humane fibroblaster; 2, LA-RB128B (svulst); 3, LA-RB128B-F (fibroblast); 4, LA-RB165 (svulst); 5, LA-RB165-F (fibroblast); 6, LA-RB74 (svulst); 7, LA-RB74-F (fibroblast); 8, LA-RB151 (svulst); 9, LA-RB151-F (fibroblast); 10, OHS-50 (ondartet knokkelsvulst); 11, LA-RB73 (svulst); 12, LA-RB125 (svulst); 13, LA-RB112 (svulst); 14, LA-RB157 (svulst); 15, OSV (osteosarkom); 16, LA-RB94 (svulst); 17, LA-RB70 (svulst); 18, Y-79 (svulst); 19, LA-RB69A (svulst); 20, LA-RB69A-F (fibroblast); 21, LA-RB99 (svulst); 22, RB120F (fibroblast som har en balansert translokasjon 46,XX,t [10, 13] [q22; q14]).

Fig. 4 er en Northern-blot-analyse av polyadenylert RNA fra normal human fibroblast, normal og udødeliggjort human netthinneceller, retinoblastom og deres fibroblaster. Fil 1,

poly A-RNA; 2, normale humane fetale netthinne-
 celler); 3, Ad5/HER A (adenovirus 5 udødeliggjorte humane netthinne-
 celler); 4, LA-RB128B; 5, LA-RB165; 6, LA-RB74; 7, OHS-50;
 8, LA-RB73; 9, LA-RB157; 10, OSV; 11, LA-RB94; 12, LA-
 5 RB70; 13, Y-79, 14, LA-RB69A; 15, LA-RB69A-F (fibroblast);
 16, LA-RB133; 17, LA-RB110; 18, LA-RB160; 19, WS 1
 (fibroblast); 20, LA-RB99.

Fig. 5 viser Hind III-restriksjonskartet til Rb-genomisk
 10 lokus.

Fig. 6. Southern-blot-analyse av Hind III fordøyd genomisk
 DNA fra human brystsvulst filene A, BT-549 (infiltrerende
 gangsvulst, humanbrystsvulster); B, T-47D (bryst, gang-
 15 svulst, lungehinneeffusjon); C, DU4475 (metastatisk hul-
 knute, bryst--human); D, MDA-MB-175-VII (bryst, gangsvulst,
 human); E, MDA-MB-468 (human, bryst, adenokarsinom (svulst
 med utgangspunkt i kjertelceller)); F, HS0578T (gangsvulst,
 bryst, human); G, ZR-5-30 (brystsvulst, human); H, BT-483
 20 (gangsvulst, bryst, human); I, MDA-MB-415 (adenosvulst,
 bryst, human); J, MDA-MB-453 (brystsvulst, human); K, MDA-
 MB157 (brystsvulst, human).

Fig. 7. Southern-blot-analyse av Hind III fordøyd genomisk
 25 DNA fra humane brystsvulster og et fibrosarkom. Filene A-K
 er det samme som fig. 6 og filene L, MRMDA 231; M, SW613;
 N, MCF-7 (bryst, svulst, human); O, HS913T (fibrosarkom);
 P, MDAMB 461; Q, MDAMB 436.

Fig. 8 er en skjematisk representasjon av en oppsummering av
 30 de strukturelle avvik detektert i fire humane svulster. Rb =
 retinoblastom, OS = osteosarkom, HMT = human brystsvulst og
 FS = fibrosarkom.

Fig. 9A. Skjematisk representasjon av retinoblastomgen-
 35 genomiske lokuser. Restriksjonsenzymsete for Hind III er
 vist ovenfor og de for EcoR1 er vist nedenfor linje 5'3'.

Skraverte bokser representerer exon-innholdende Hind III fragmenter. De store pilene peker på enzymsetene eller områder som viser restriksjonsfragmentlengdepoly morfisme. VNTR, variable antall tandemgjentakelser. Stiplede linjer
5 representerer regioner som ikke er fullstendig karakterisert.

Fig. 9B. Overlappende bakterielle fagkloner som restriksjonsenzymkarter i fig. 2A er avledet fra.

10 Fig. 9C. Posisjoner og størrelser til de forskjellige subklonene til Rb-genomiske lokus-DNA-fragmentene fra de bakterielle fagklonene ble subklonet inn i PGEM plasmidvektorer.

15 Fig. 10. En hypotetisk del av det Rb-genomiske lokuset. Det skraverte området representerer exoner. En del av nukleotidsekvensene som dekker exon-intron-grensene er vist ovenfor og nedenfor. Av diagnostiske grunner, vil et par av DNA-oligonukleotider a og b bli syntetisert i henhold til 5'-3'-
20 sekvenser i intronet.

Fig. 11. Anvendelse av RNase-beskyttelsesanalyse for diagnose av mutasjoner i en hypotetisk region av Rb-genonet. (i) DNA'et fra en normal person eller fra pasientvev er
25 amplifisert ved anvendelse av primerparet av a og b som flankerer exonet; (ii) det amplifiserte DNA'et er denaturert og blandet med radioaktivt merket ribonukleotidprobe som i dette tilfellet er lenger enn det amplifiserte DNA'et; (iii) de blandede nukleinsyrene blir sammensmeltet og blir deretter
30 fordøyd med RNAase A. Enkeltstående del av RNA-proben ble fordøyd, men ikke det dobbelttrådede RNA-DNA-hybridet; (iv) det dobbelttrådede hybridet blir denaturert til enkelttrådet RNA og DNA som deretter blir separert ved elektroforese i en gel; (v) gelen blir utsatt for røntgenfilm for å bestemme
35 størrelsen på RNA-molekylet. DNA-kildene er som følge: A, normal person; B, svulstvev som har en delesjon eller enkeltbasemutasjon inne i regionen flankert av oligonukleotid

primer a og b; C, konstitusjonelle celler fra pasient i B;
D, svulstvev som har en delesjon som innbefatter a og/eller
5 b; E, konstitusjonelle celler fra pasient i D.

Tegningene er nødvendigvis ikke i riktig skala og visse trekk
av oppfinnelsen er blitt overdrevet i skala eller vist i
10 skjematisk form for sammenfatting og klarhet.

En fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse er en
fremgangsmåte for detektering av predisposisjon overfor
utvikling av retinoblastom, innbefattende trinnene av
15 hybridisering av en retinoblastomgenprobe til DNA ekstrahert
fra målvevet og bestemmelse av binding av proben til DNA'et.
Bindingen kan bli målt ved hjelp av forskjellige fremgangs-
måter, innbefattende bestemmelse av mengden av probe som
hybridiseres, bestemmelse av strukturelle forandringer,
20 restriksjonsfragmentlengdepolymerase og amplifisering av
den bundede proben ved PCR-metoden og måling av produktet.

I en foretrukket fremstilling, er proben merket og hybridi-
seringen blir målt ved bestemmelse av mengden av markør i det
25 hybridiserte molekylet. Fagmannen oppdager lett at en mengde
molekylære biologiske fremgangsmåter er tilgjengelige for å
måle selve hybridiseringen eller produktet av hybridi-
seringen.

30 Forskjellige svulster har vist seg å ha en strukturell effekt
i retinoblastomgenet. Dette er sett i retinoblastom selv, og
også i andre svulstforstyrrelser så som osteosarkom, fibro-
sarkom, bløt vevssvulst, små-cellelungesvulst, melanomcelle-
linjer og brystsvulst. Svulstene som inneholder retino-
35 blastomgendefekten kan bli detektert ved en fremgangsmåte som
innbefatter følgende trinn; hybridisering av en retino-

blastomgenprobe til DNA ekstrahert fra et målvev; og ved bestemming av bindingen av proben til nevnte DNA. F.eks., i retinoblastom mangler selve svulsten Rb-genet i begge kromosomene, mens de konstitusjonelle cellene mangler kanskje bare et Rb-gen. Det er dermed klart at tilgjengeligheten av en Rb-genprobe tilveiebringer muligheten av å detektere individer som er disponert for dannelse av en retinoblastom-svulst.

Målvevet er en prøve som blir tilveiebrakt fra individene som skal bli detektert og hvorfra DNA blir ekstrahert. Det er ikke noen begrensning på type av vev som kan bli samlet og analysert. F.eks. kan vevene være svulst, blod, fibroblaster, hud eller andre normale vev, og kan bli tatt fra fetalt til voksent vev.

En annen fremstilling innbefatter fremgangsmåte for detektering av kromosomalt DNA som kode for minst en del av det humane retinoblastomgenet, innbefattende denaturering av totalt kromosomalt DNA for å tilveiebringe enkelt-strådet DNA; kontakting mellom nevnte enkelt-trådet DNA med en retinoblastomgenprobe; og identifisering av den hybridiserte DNA-proben for å detektere kromosomalt DNA som minst inneholder en del av det humane retinoblastomgenet.

En annen utforming innbefatter et diagnostisk kit for deteksjon av en predisposisjon overfor retinoblastom, innbefattende minst en cDNA-probe spesifikk for retinoblastomgenet, hvori nevnte cDNA-probe er effektiv når den blir hybridisert med cDNA fra en målcelle for å indikere nærvær eller fravær av retinoblastomgenet. En annen utforming kan innbefatte minst en kontrollcelle for å bestemme spesifisiteten og reaktiviteten. Andre utforminger av kit kan innbefatte en pakning og instruksjoner.

Fagmannen vil lett oppdage at en mengde merkede markører kan bli anvendt med hvilke som helst av retinoblastomprobene.

Disse markørene kan være radioaktive, fluoreserende eller enzymatiske. Fagmannen vil også oppdage at andre fremgangsmåter som ikke innbefatter anvendelse av en merket probe kan bli anvendt for å bestemme hybridiseringen. F.eks. undersøking av restriksjonsfragmentlengdepolymerfisme, amplifikasjon ved PCR-metoden, RNAase A spalting og den allelspesifikke oligonukleotidprobingmetoden.

Beskrivelse av Rb-lokus

Det Rb-genomiske lokuset er minst 200 kb langt. Et restriksjonskart av det genomiske lokuset er vist i fig. 9. De stiplede linjene representerer regioner som ikke er fullstendig karakteriserte. Den gjenværende delen av det genomiske lokuset ble isolert fra humane genomiske biblioteker konstruert i bakteriofagene λ EMBL3 og λ fiks. Forholdet mellom disse fagklonene og det genomiske lokuset er vist i fig. 9. Det er minst 20 exoner i det genomiske lokuset. Disse exonene er beliggende i 12 Hind II restriksjonsfragmenter som vist i fig. 9. Restriksjonsfragmentet som inneholder exonene er blitt subklonet inn i plasmidvektor PGEM4 og PGEM2. Posisjonene til Hind III-setene er vist ovenfor linje 5'-3' og Eco R1-setene er vist nedenfor denne. De skraverte boksene representerer exon-innholdende Hind III DNA-fragmentet. Fragmentene er innbefattet i 4.6 kb cDNA-proben for retinoblastomgenet. Hybridisering av Hind III eller Eco R1 fordøyd DNA til en merket Rb cDNA-klon viser de forskjellige Hind III DNA-fragmentene representert ved de skraverte boksene. Store strukturelle forandringer innbefattet i disse fragmentene blir detektert.

Ribonuklease A (RNAase A) spaltningsfremgangsmåte - En liten delesjon som innbefatter veldig få nukleotider og en mutasjon ved en enkelt base vil vanligvis ikke være detekterbart ved Southern-blot-analyse. Disse forandringene kan bli detektert ved ribonuklease A (RNAase A) spaltningsanalysen.

Siden strukturelle defekter i exonene til det Rb-genomiske lokuset er de mest sansynlige årsakene for inaktivering, er den opprinnelige diagnostikken fokusert på disse regionene. Som vist i fig. 9, representerer hver av de skraverte boksene et exon-innholdende Hind III DNA-fragment. Det er en eller flere exoner i hvert av disse fragmentene. Det totale antall exoner er sannsynligvis større enn tyve.

For å anvende RNAase A-spaltningssanalysen, blir par av DNA oligonukleotider syntetisert, fig. 10. Disse parene kan enten være deler av exonet eller fra den flankerende regionen rundt hvert exon. For å analysere en DNA-prøve for en mutasjon i en exon, blir en liten mengde DNA-prøve blandet med de to oligonukleotidene a og b. Blandingen blir utsatt for polymerasekjedereaksjon (PCR) ved anvendelse av genAmpTM DNA-amplifikasjonssystemet fra Perkin-Elmer Cetus. Denne fremgangsmåten tillater selektiv amplifikasjon av DNA'et flankert av to oligonukleotider. Det amplifiserte DNA'et ble denaturert og deretter hybridisert til en enkelt tråd som er radioaktivt merket ribonukleotid syntetisert fra en subklon fra det Rb-genomiske lokuset som inneholder denne region. Det hybridiserte materialet ble deretter utsatt for fordøyelse med RNAase A. En reaksjon bestående av DNA amplifisert fra en normal person ble kjørt som en kontroll. Det fordøyde produktet blir fraksjonert ved gelelektroforese og størrelsen på det radioaktive ribonukleotidet blir detektert ved utsetting for røntgenfilm. Nukleotidsekvensen til den radioaktive RNA-probe korresponderende til det amplifiserte DNA'et fra en normal person er beskyttet fra å bli fordøyd med RNAase A. Størrelsen på beskyttet RNA-fragment F₀, fig. 11, blir anvendt som standard.

For svulst-DNA-prøver, kan delesjoner som oppstår innenfor regionen flankert av de to oligonukleotidene resultere i fordøyning av hybridet som resulterer i to mindre fragmenter F₁ og F₂, fig. 11B. I de konstitusjonelle cellene kan de to fragmentene også bli detektert hvis mutasjonen har oppstått i

en av RB-allelene, fig. 11C. For svulst-DNA-prøver med delesjoner som innbefatter en eller begge oligonukleotidene a og b, er ingen DNA-amplifikasjon mulig. Derfor er RNA-proben ikke beskyttet, fig. 11D. Når man anvender konstitusjonelle celler kan det være et problem. I slike tilfeller vil man måtte lete etter et annet par oligonukleotid-primere som flankerer den deleterte regionen. Når en mutasjon kan bli detektert i Rb-genet ved hjelp av disse fremgangsmåtene, er det mulig å anvende den samme deteksjonsfremgangsmåten på de nærliggende slektningene til forsøkspersonen. I de tilfeller hvor en familiehistorie er kjent, kan segregering av kromosomene som inneholder det muterte allelet bli identifisert ved anvendelse av enzymer og prober i Rb-genet som kan detektere RFLP'er

Bindingsstudier ved anvendelse av restriksjonsfragmentlengdepolymorfisme (RFLP'er) - Det er minst fire regioner i det RB-genomiske lokuset som viser hyppig polymorfisme med et gitt enzym. Disse er Kpn 1 i region 1, og Hind III i region 2, TthIII 1 i region 4 og et antall enzymer i region 3. Region 3 er en VNTR (variabel antall tandem rapporter) region, RSal-enzymene ser ut til å være spesielt nyttige for detektering av polymorfisme. DNA-fragmenter dannet av disse enzymene kan vise størrelsepolymorfisme når de blir hybridisert til DNA-proben fra den indikerte regionen. Segregering av et gitt Rb-allel, som definert ved disse RFLP'er, kan dermed bli sammenlignet med segregering og utbredelse av retinoblastom i en familie.

Beskrivelse av Rb cDNA og genomiske DNA-kloner.

Hovedstrategien for kloning innbefatter kromosomal vandring (walking) ved anvendelse av prober i region 13q14.1, lokuset til Rb-genet. Tilfeldige prober fri for sterkt repeterende sekvenser ble isolert fra kromosom 13 spesifikke bibliotek, LL 13NS01. For å identifisere de klonene som hørte til 13q14.1-regionen, ble to hamster-humane hybridcellelinjer (3B6 og 2D12) anvendt. Hver av disse cellelinjene inneholdt

et kromosom 13 med en delesjon innbefattende 13q14.1-regionen. Cellehybrid 3B6 ble fremstilt ved anvendelse av cellestramme 32T som har en kromosomal delesjon fra 13q14.1 til 13q14.3 mens 2D12 inneholder et 13-kromosom med en delesjon fra 13q13.11 til 13q22.3. Kloner inneholdende DNA-innskudd innenfor kromosomalregion 13q14.1 til 13q13.3 ble identifisert ved fravær av hybridisering til DNA til 3B6 og 2D12 ved anvendelse av innskuddene som prober. To andre prober, H2-42 og H3-8 kan bli tilveiebrakt ved hjelp av en lignende strategi. I tillegg, siden både EsD og Rb-loci er i 13q14.1, isolerte vi også en EsD cDNA-klon i full lengde for å anvende som en probe.

Hver av disse probene som var lokalisert til 13q14.1 ble anvendt som et utgangspunkt for bidireksjonell vandring. Et stort antall kloner ble isolert ved anvendelse av disse forskjellige probene. Det var interessant at en av disse probene, H3-8, viste seg å mangle flere fag og kosmidbiblioteker, antageligvis fordi den er i et område som lett blir deletert og ble dermed anvendt for å detektere kortere restriksjonsfragmenter. Fig. 1A viste et restriksjonskart av denne regionen tilveiebrakt ved overlappende kloner av forskjellige restriksjonsfragmenter. Innskuddsstørrelsen av hver klon som ble tilveiebrakt ble verifisert ved hybridisering av klonen til genomiske blot.

Det var overraskende at en probe, PG4-4 ble isolert, som var beliggende veldig nær H3-8 og som hybridiserte til en hamstersekvens. Denne sekvenskonserveringen mellom menneske og hamster tydet på at PG4-4 inneholder kloningssekvensen til et gen. Hybridisering av PG4-4 til et mRNA-blot av flere udødeliggjorte humane fetale netthinne cellelinjer viste et 4.6 kilobase (kb) mRNA, fig. 1B. Ved anvendelse av PG4-4 som en probe, ble flere cDNA-kloner isolert. Den lengste var på 4.6 kb. Fig. 2A viser et restriksjonskart av denne cDNA-klonen. Polariteten til klonene som vist i figuren ble bestemt ved hybridisering av tråd-spesifikke prober til mRNA-

blot. Exonsekvensen i PG4-4 var beliggende mellom HpaI og Eco RV-setene nær 5'-enden til cDNA. Nukleotidsekvensen til en 4.6 kb-probe er vist i tabell 1.

5

10

15

20

25

30

35

Tabell 1

	5'				
	10	20	30	40	
5	CCCCCAAAA	ACGGCCGCCA	CCGCCGCCGC	TGCCGCCGCG	
	50	60	70	80	
	GAACCCCCGG	CACCGCCGCC	GCCGCCCCCT	CCTGAGGAGA	
	90	100	110	120	
	ACCCAGAGCA	GGACAGCGGC	CCGGAGGACC	TGCCTCTCGT	
	130	140	150	160	
	CAGGCTTGAG	TTTGAAGAAA	CAGAAGAACC	TGATTTTACT	
10	170	180	190	200	
	GCATTATGTC	AGAAATTAAA	GATACCAGAT	CATGTCAGAG	
	210	220	230	240	
	AGAGAGCTTG	GTAACTTGG	GAGAAAGTTT	CATCTGTGGA	
	250	260	270	280	
	TGGAGTATTG	GGAGGTTATA	TTCAAAGAA	AAAGGAACTG	
	290	300	310	320	
	TGGGGAATCT	GTATCTTTAT	TGCAGCAGTT	GACCTAGATG	
15	330	340	350	360	
	AGATGTCGTT	CACTTTTACT	GTGCTACAGA	AAAACATAGA	
	370	380	390	400	
	AATCAGTGTC	CATAAATTCT	TTAACTTACT	AAAAGAAATT	
	410	420	430	440	
	GATACCAGTA	CCAAAGTTGA	TAATGCTATG	TCAAGACTGT	
	450	460	470	480	
	TGAAGAAGTA	TGATGTATTG	TTTGCACTCT	TCAGCAAATT	
20	490	500	510	520	
	GGAAAGGACA	TGTGAACTTA	TATATTTGAC	ACAACCCAGC	
	530	540	550	560	
	AGTTTCGATAT	CTACTGAAAT	AAATTCTGCA	TTGGTGCTAA	
	570	580	590	600	
	AAGTTTCTTG	GATCACTTTT	TTATTAGCTA	AAGGGGAAGT	
	610	620	630	640	
	ATTACAAATG	GAAGATGATC	TGGTGATTTC	ATTTCAAGTA	
25	650	660	670	680	
	ATGCTATGTG	TCCTTGACTA	TTTTATTAAA	CTCTCACCTC	
	690	700	710	720	
	CCATGTTGCT	CACCCAGGCG	TATAAAACAG	CTGTTATACC	
	730	740	750	760	
	CATTAATGGT	TCACCTCGAA	AACCCAGHC	GGGTCAGAAC	
	770	780	790	800	
	AGGAGTGCAC	GGATAGCAAA	ACAAC TAGAA	AATGATACAA	
30	810	820	830	840	
	GAATTATTGA	AATTCTCTGT	AAAGAACATG	AATGTAATAT	
	850	860	870	880	
	AGATGAGGTG	AAAAATGTTT	ATTTCAAAAA	TTTTATACCT	
	890	900	910	920	
	TTTATGAATT	CTCTTGACT	TGTAACATCT	AATGGACTTC	
	930	940	950	960	
	CAGCGGTTGA	AAATCTTTCT	AAACGATACG	AAGAAATTTA	
35					

	970	980	990	1000
	TCTTAAAAAT	AAAGATCTAG	ATGCAAGATT	ATTTTTCAT
	1010	1020	1030	1040
5	CATGATAAAA	CTCTTCAGAC	TGATTCTATA	GACAGTTTTG
	1050	1060	1070	1080
	AAACACAGAG	AACACCACGA	AAAAGTAACC	TTGATGAAGA
	1090	1100	1110	1120
	GGTGAATGTA	ATTCCTCCAC	ACACTCCAGT	TAGGACTGTT
	1130	1140	1150	1160
	ATGAACACTA	TCCAACAATT	AATGATGATT	TTAAATTGAG
	1170	1180	1190	1200
10	CAAGTGATCA	ACCTTCAGAA	AATCTGATTT	CCTATTTTAA
	1210	1220	1230	1240
	CAACTGCACA	GTGAATCCAA	AAGAAAGTAT	ACTGAAAAGA
	1250	1260	1270	1280
	GTGAAGGATA	TAGGATACAT	CTTTAAAGAG	AAATTTGCTA
	1290	1300	1310	1320
	AAGCTGTGGA	CAGGGTTGTG	TCGAAATTGG	ATCACAGCGA
	1330	1340	1350	1360
15	TACAACTTG	GAGTTCGCTT	GTATTACCGA	GTAATGGAAT
	1370	1380	1390	1400
	CCATGCTTAA	ATCAGAAGAA	GAACGATTAT	CCATTCAAAA
	1410	1420	1430	1440
	TTTTAGCAAA	CTTCTGAATG	ACAACATTTT	TCATATGTCT
	1450	1460	1470	1480
	TTATTGGCGT	GCGCTCTTGA	GGTTGTAATG	GCCACATATA
	1490	1500	1510	1520
20	GCAGAAGTAC	ATCTCAGAAT	CTTGATTCAG	GAACAGATTT
	1530	1540	1550	1560
	GTCTTTCCCA	TGGATTCTGA	ATGTGCTTAA	TTTAAAAGCC
	1570	1580	1590	1600
	TTTGATTTTT	ACAAAGTGAT	CGAAAGTTTT	ATCAAAGCAG
	1610	1620	1630	1640
	AAGGCAACTT	GACAAGAGAA	ATGATAAAAC	ATTTAGAACG
	1650	1660	1670	1680
25	ATGTGAACAT	CGAATCATGG	AATCCTTTGC	ATGGCTCTCA
	1690	1700	1710	1720
	GATTCACCTT	TATTTGATCT	TATTAAACAA	TCAAAGGACC
	1730	1740	1750	1760
	GAGAAGGACC	AACTGATCAC	CTTGAATCTG	CTTGTCTCT
	1770	1780	1790	1800
	TAATCTTCCT	CTCCAGAATA	ATCACACTGC	AGCAGATATG
	1810	1820	1830	1840
30	TATCTTTCTC	CTGTAAGATC	TCCAAAGAAA	AAAGGTTCAA
	1850	1860	1870	1880
	CTACGCGTGT	AAATTCTACT	GCAAATGCAG	AGACACAAGC
	1890	1900	1910	1920
	AACCTCAGCC	TTCCAGACCC	AGAAGCCATT	GAAATCTACC
	1930	1940	1950	1960
	TCTCTTTCAC	TGTTTTATAA	AAAAGTGTAT	CGGCTAGCCT
	1970	1980	1990	2000
35	ATCTCCGGCT	AAATACACTT	TGTGAACGCC	TTCTGTCTGA

	2010	2020	2030	2040
	GCACCCAGAA	TTAGAACATA	TCATCTGGAC	CCTTTTCCAG
	2050	2060	2070	2080
5	CACACCCTGC	AGAATGAGTA	TGAACTCATG	AGAGACAGGC
	2090	2100	2110	2120
	ATTTGGACCA	AATTATGATG	TGTTCCATGT	ATGGCATATG
	2130	2140	2150	2160
	CAAAGTGAAG	AATATAGACC	TTAAATTCAA	AATCATTGTA
	2170	2180	2190	2200
	ACAGCATACA	AGGATCTTCC	TCATGCTGTT	CAGGAGACAT
	2210	2220	2230	2240
10	TCAAACGTGT	TTTGATCAAA	GAAGAGGAGT	ATGATTCTAT
	2250	2260	2270	2280
	TATAGTGTTT	TATAACTCGG	TCTTCATGCA	GAGACTGAAA
	2290	2300	2310	2320
	ACAAATATTT	TGCAGTATGC	TTCCACCAGG	CCCCCTACCT
	2330	2340	2350	2360
	TGCACCAATA	CCTCACATTC	CTCGAAGCCC	TTACAAGTTT
	2370	2380	2390	2400
15	CCTAGTTCAC	CCTTACGGAT	TCCTGGAGGG	AACATCTATA
	2410	2420	2430	2440
	TTTCACCCCT	GAAGAGTCCA	TATAAAATTT	CAGAAGGTCT
	2450	2460	2470	2480
	GCCAACACCA	ACAAAAATGA	CTCCAAGATC	AAGAATCTTA
	2490	2500	2510	2520
	GTATCAATTG	GTGAATCATT	CGGGACTTCT	GAGAAGTTCC
	2530	2540	2550	2560
20	AGAAAATAAA	TCAGATGGTA	TGTAACAGCG	ACCGTGTGCT
	2570	2580	2590	2600
	CTAAAGAAGT	GCTGAAGGAA	GCAACCCTCC	TAAACCACTG
	2610	2620	2630	2640
	AAAAAATAC	GCTTTGATAT	TGAAGGATCA	GATGAAGCAG
	2650	2660	2670	2680
	ATGGAAGTAA	ACATCTCCCA	GGAGAGTCCA	AATTTAGCA
	2690	2700	2710	2720
25	GAAACTGGCA	GAAATGACTT	CTACTCGAAC	ACGAATGCAA
	2730	2740	2750	2760
	AAGCAGAAAA	TGAATGATAG	CATGGATACC	TCAAACAAGG
	2770	2780	2790	2800
	AAGAGAAATG	AGGATCTCAG	GACCTTGGTG	GACACTGTGT
	2810	2820	2830	2840
	GCACCTCTGG	ATTCATTGTC	TCTCACAGAT	GTGACTGTAT
	2850	2860	2870	2880
30	AACTTTCCCA	GGTTCTGTTT	ATGGCCACAT	TTAATATCTT
	2890	2900	2910	2920
	CAGCTCTTTT	TGTGGATATA	AAATGTGCAG	ATGCAATTGT
	2930	2940	2950	2960
	TTGGGTGATT	CCTAAGCCAC	TTGAAATGTT	AGTCATTGTT
	2970	2980	2990	3000
	ATTTATACAA	GATTGAAAAT	CTTGTGTAAA	TCCTGCCATT
	3010	3020	3030	3040
35	TAAAAAGTTG	TAGCAGATTG	TTTCCTCTTC	CAAAGTAAAA

	3050	3060	3070	3080
	TTGCTGTGCT	TTATGGATAG	TAAGAATGGC	CCTAGAGTGG
5	3090	3100	3110	3120
	GAGTCCTGAT	AACCCAGGCC	TGTCTGACTA	CTTTGCCTTC
	3130	3140	3150	3160
	TTTTGTAGCA	TATAGGTGAT	GTTTGCTCTT	GTTTTTATTA
	3170	3180	3190	3200
	ATTTATATGT	ATATTTTTTT	AATTTAACAT	GAACACCCTT
	3210	3220	3230	3240
10	AGAAAATGTG	TCCTATCTAT	CTTCCAAATG	GAATTTGATT
	3250	3260	3270	3280
	GACTGCCCAT	TCACCAAAAT	TATCCTGAAC	TCTTCTGCAA
	3290	3300	3310	3320
	AAATGGATAT	TATTAGAAAT	TAGAAAAAAA	TTACTAATTT
	3330	3340	3350	3360
	TACACATTAG	ATTTTATTTT	ACTATTGGAA	TCTGATATAC
	3370	3380	3390	3400
	TGTGTGCTTG	TTTTATAAAA	TTTTGCTTTT	AATTAAATAA
15	3410	3420	3430	3440
	AAGCTGGAAG	CAAAGTATAA	CCATATGATA	CTATCATACT
	3450	3460	3470	3480
	ACTGAAACAG	ATTCATACC	TCAGAATGTA	AAAGAACTTA
	3490	3500	3510	3520
	CTGATTATTT	TCTTCATCCA	ACTTATGTTT	TTAAATGAGG
	3530	3540	3550	3560
	ATTATTGATA	GTA CTCTTG	TTTTTATACC	ATTCAGATCA
20	3570	3580	3590	3600
	CTGAATTTAT	AAAGTACCCA	TCTAGTACTT	GAAAAAGTAA
	3610	3620	3630	3640
	AGTGTTCTGC	CAGATCTTAG	GTATAGAGGA	CCCTAACACA
	3650	3660	3670	3680
	GTATATCCCA	AGTGCACTTT	CTAATGTTTC	TGGGTCCTGA
	3690	3700	3710	3720
	AGAATTAAGA	TACAAATTAA	TTTTACTCCA	TAAACAGACT
25	3730	3740	3750	3760
	GTTAATTATA	GGAGCCTTAA	TTTTTTTTTTC	ATAGAGATTT
	3770	3780	3790	3800
	GTCTAATTGC	ATCTCAAAAT	TATTCTGCCC	TCCTTAATTT
	3810	3820	3830	3840
	GGGAAGGTTT	GTGTTTTCTC	TGGAATGGTA	CATGTCTTCC
	3850	3860	3870	3880
	ATGTATCTTT	TGAACTGGCA	ATTGTCTATT	TATCTTTTAT
30	3890	3900	3910	3920
	TTTTTTAAGT	CAGTATGGTC	TAACACTGGC	ATGTTCAAAG
	3930	3940	3950	3960
	CCACATTATT	TCTAGTCCAA	AATTACAAGT	AATCAAGGGT
	3970	3980	3990	4000
	CATTATGGGT	TAGGCATTAA	TGTTTCTATC	TGATTTTGTG
	4010	4020	4030	4040
	CAAAAGCTTC	AAATTAAAAC	AGCTGCATTA	GAAAAAGAGG
35	4050	4060	4070	4080
	CGCTTCTCCC	CTCCCCTACA	CCTAAAGGTG	TATTTAAACT

	4090	4100	4110	4120
	ATCTGTGTGA	TTAACTTATT	TAGAGATGCT	GTAACCTAAA
	4130	4140	4150	4160
5	ATAGGGGATA	TTTAAGGTAG	CTTCAGCTAG	CTTTTAGGAA
	4170	4180	4190	4200
	AATCACTTTG	CCTAACTCAG	AATTATTTTT	AAAAAGAAAT
	4210	4220	4230	4240
	CTGGTCTTGT	TAGAAAACAA	AATTTTATTT	TGTGCTCAGT
	4250	4260	4270	4280
	TAAGTTTCAA	ACTTACTATT	TTGACAGTTA	TTTGTATAAC
	4290	4300	4310	4320
10	AATGACACTA	GAAAACCTGA	CTCCATTTC	TCATTGTTTC
	4330	4340	4350	4360
	TGCATGAATA	TCATACAAAT	CAGTTAGTTT	TTAGGTCAAG
	4370	4380	4390	4400
	GCCTTACTAT	TTCTGGGTCT	TTTGCTACTA	AGTTCACATT
	4410	4420	4430	4440
	AGAATTAGTG	CCAGAATTTT	AGGAACTTCA	GAGATCGTGT
	4450	4460	4470	4480
15	ATTGAGATTT	CTTAAATAAT	GCTTCAGATA	TTATTGCTTT
	4490	4500	4510	4520
	ATTGCTTTTT	TGTATTGGTT	AAAACGTGAC	ATTTAAAATT
	4530	4540	4550	4560
	GCTATGTTAC	TATTTTCTAC	AATTAATAGT	TTGTCTATTT
	4570	4580		
	TAAAATAAAT	TAGTTGTTAG	3'	

20

25

Denne cDNA-proben består av minst 20 exoner. Dermed kan mangfoldige mindre prober (fragmenter) bli fremstilt fra denne store proben. En fagmann vil videre oppdage at derivater av denne proben, f.eks., degenererte sekvenser eller sekvenser med noen få forandringer i enkelte basepar kan også anvendes som effektive prober.

30

En del av 5'-enden av Rb-genet mangler i fra den genomiske klonen. Denne delen som innbefattet promoteren og en del av det første exonet er vist i tabell 2.

35

Tabell 2

	5'						
	10	20	30	40			
	CCGCGAGGTG	ATTAGCAGAT	TATTCCTCTG	CGGGGCCCGA			
	50	60	70	80			
5	GAGTCTTCCC	TATCAGACCC	CGGGATAGGG	ATGAGGCCCA			
	90	100	110	120			
	GCAGTCACCC	ACCAGACTCT	TTGTATAGCC	CGTTAAGTGG			
	130	140	150	160			
	ACCCGGCCGT	GAGGGGGTGG	TTCTGGGTAA	AAGACGTCCG			
	170	180	190	200			
	GGCCGCGCCG	GATGCCTCCT	GGAAGGCGCC	TGGACCCACG			
	210	220	230	240			
10	CCAGGTTTCC	CACTTTAATT	CCTCATGACT	TAGCGTCCCA			
	250	260	270	280			
	GCCCGCGCAC	CGACCAGCGC	CCCAGTTCCC	CACAGACGCC			
	290	300	310	320			
	GGCGGGCCCG	GGAGCCTCGG	ACGTGAGCGG	CGGGCGGAAG			
	330	340	350	360			
	TGACGTTTTC	CCGCGGTTGG	ACGCGGCGCT	CAGTTGCCGG			
	370	380	390	400			
15	GCGGGGGAGG	GCGCGTCCGG	TTTTTCTCAG	GGGACGTTGA			
	410	420	430	440			
	AATTATTTTT	GTAACGGGAG	TCGGGAGAGG	ACGGGGCGTG			
	450	460	470	480			
	CCCCGACGTG	CGCGCGCGCG	TCCTCCCCGG	CGCTCCTCAC			
	490	500	510	520			
	AGCCTTCGCT	CGGTCCCCGG	CCGCGGAACC	GGTATGCCGC			
	526						
20	CCAAAA	3'					

I den genomiske klonen er tabell 1 og 2 kontinuerlig slik at
 25 base 1 i tabell 1 vil være base 527 i tabell 2.

Disse resultatene viser en GC-rik region mellom ytterpunktet
 5'-enden og HpaI-setet. Hybridisering av Southern-blot til
 en probe fremstilt fra denne GC-rike regionen tilveiebrakte
 30 konstant et uklart mønster.

De Rb-tilgjengelige probene tilveiebrakte en måte hvorpå man
 kunne identifisere om det er strukturelle forandringer i Rb-
 genet i en gitt svulsttype eller undergruppe innenfor en gitt
 35 svulsttype. Det er derfor mulig at visse svulster vil
 reagere forskjellig overfor terapi basert på om det er en
 defekt i Rb-genet eller ikke. Siden det er sannsynlig at

funksjonelt tap av Rb-genet er kritisk for utvikling av svulster, kan det være mulig å behandle disse svulstene ved å sette dette genet eller genproduktet tilbake i cellene.

5 Southern-blot-analyse - DNA blir ekstrahert fra målvev, f.eks. svulst, blod, fibroblast eller andre normale vev. DNA'et blir separat fordøyd med forskjellige restriksjons-
10 enzymer. Restriksjonsenzymfragmentene blir separert i en agarosegel ved elektroforese, denaturert og deretter overført til et nitrocellulosefilter. Merkede cDNA-prober av Rb-genet
15 blir hybridisert til DNA-fragmentet på filteret. I den foretrukkede fremgangsmåten er markøren radioaktiv og filteret blir eksponert på røntgenfilmer.

15 Hvis cDNA-klonen er det antatte Rb-genet, bør den detektere strukturelle avvik i DNA'et til visse retinoblastomer, innbefattende de med synlige delesjoner i 13q14.1-regionen. For å analysere strukturen av genomisk DNA fra retinoblastomer, ble en restriksjonsendonuklease-undersøkelse
20 anvendt for å finne enzymer som vil danne godt separerte restriksjonsfragmenter som er detekterbare med en cDNA-probe. HindIII dannet godt separerte restriksjonsfragmenter i normalt humant DNA som kunne bli detektert ved hjelp av subklonene av 4.73 kb cDNA-klonen. Rekkefølgen av de
25 genomiske HindIII-restriksjonsfragmentene detekterbare med en cDNA-probe er vist i fig. 2B.

Siden en cDNA-probe ble anvendt, vil bare strukturelle avvik i de exon-innholdende restriksjonsfragmentene være detekterbare.
30 Strukturelle avvik i restriksjonsfragmentene som inneholder et veldig lite exon blir muligens ikke detektert. Dette er også tilfellet ved punktmutasjoner eller ekstremt små delesjoner i exonet eller i "spleisegrenseområdene". Til tross for disse begrensningene observeres strukturelle
35 avvik, innbefattende en del eller hele Rb-genet. Disse forskjellige formene for strukturelle forandringer er oppsummert i tabell 3.

Tabell 3

	Svulst	Sykdoms- form	Stukturell forandring i Rb-genet	Ekspresjon av Rb-genet på mRNA- nivå
5	LA-RB128B	delesjon	homozygotisk total delesjon	fraværende
	LA-RB165	unilateral	homozygotisk 3' delesjon	fraværende
10	LA-RB74	bilateral	homozygotisk indre delesjon	unormal
	LA-RB151	bilateral	homozygotisk indre delesjon	ND+
15	OHS-50	bilateral*	homozygotisk indre delesjon	unormal
	LA-RB125	unilateral	indre delesjon av 1 allel	ND
	LA-RB99	unilateral	indre delesjon av 1 allel	unormal
20	LA-RB112	unilateral	total delesjon av 1 allel	ND
	LA-RB157	bilateral	total delesjon av 1 allel	fraværende
25	OSV	primær oste- sarkom	total delesjon av 1 allel	unormal
	LA-RB69A	bilateral	ingen detekterbare	fraværende
	LA-RB73	bilateral	ingen detekterbare	fraværende
	LA-RB110	bilateral	ingen detekterbare	fraværende
	LA-RB133	bilateral	ingen detekterbare	fraværende
30	LA-RB160	unilateral	ingen detekterbare	fraværende
	LA-RB94	unilateral	ingen detekterbare	unormal
	LA-RB70	unilateral	ingen detekterbare	redusert
	Y-79	bilateral	ingen detekterbare	unormal
35	* Osteosarkom (ondartet knokkelsvulst) i pasienter med bilateral retinoblastom			
	+ ikke bestemt			

Eksempel 1

DNA fra førti tilfeller av retinoblastompasienter og fra fibroblaster fra samme pasient ble undersøkt ved Southern-
5 blot-analyse. For å gjøre denne analysen lettere, ble 0.9 kb og 3.8 kb EcoR1-fragmentene subklonet inn i vektor PGEM-4, fig. 2A. Southern-blot av genomisk DNA isolert fra retinoblastomene fordøyd med forskjellige restriksjonsendonukleaser ble hybridisert til prober laget fra disse to subklonene, PG
10 H2 (EcoR1 0,9 kb) og PG 3.8M (EcoR1 3,8 kb). Polyadenylert RNA fra flere retinoblastomer ble også analysert med disse probene.

En av mekanismene hvorpå de to Rb-allelene blir inaktivert
15 på, er ved total eller delvis delesjon av begge Rb-allelene. Et eksempel på total delesjon av begge alleler er tilveiebrakt ved svulsten, LA-RB128B, fra en pasient med bilateral retinoblastom. Cytogenetisk analyse av fibroblaster fra dette individet ved anvendelse av høy resolusjonsbånddannelse
20 viste en synlig delesjon i et 13-kromosom fra 13q14.1 til 13q14.3. Det gjenværende 13-kromosomet så ut til å være normalt. I samsvar med disse observasjonene, indikerte intensitetene av Rb-restriksjonsfragmentene nærvær av bare et enkelt kopi av et tilsynelatende intakt Rb-lokus i fibroblastene, fil 3 i både fig. 3A og 3B. RFLP-studier ved
25 anvendelse av kromosom 13-prober ovenfor og nedenfor 13q14.1-regionen viste at begge kromosom 13 s var tilstede i svulsten. Begge alleler til Rb-lukuset manglet derimot, fig. 3A og 3B, fil 2. I denne pasienten innbefattet både den første og
30 andre mutasjonstilfelle delesjon av et Rb-allel. Som ventet kunne ingen Rb-transkripter bli oppdaget i svulsten, fig. 4, fil 4.

LA-RB165, representerer et eksempel på en delvis delesjon.
35 Denne svulsten ble tilveiebrakt fra en pasient med unilateral sykdom. Som vist i fig. 3B fil 4, mangler HindIII 9,8 kb, 6.2 kb, og 2.1 kb-fragmentene. Intensitetene til de gjen-

værende Rb-fragmentene indikerer eksistensen av bare et enkelt kopi av det avvikende Rb-lokuset. Denne svulsten er dermed et allel av Rb-genet totalt deletert og det andre har en delesjon ved 3'-enden. Som vist i fig. 3A og B filene 5, er to kopier av tilsynelatende intakte Rb-loci tilstede i fibroblastene. Dette tyder på at to forskjellige mutasjons-tilfeller oppsto i den somatiske cellen (dvs. målretinoblasten), og dette er et resultat som er forenelig med den unilaterale (ikke-arvelige) statusen til denne retinoblastom-pasienten. Ikke noe Rb-transkript ble detektert i denne svulsten, fig. 4, fil 5.

Pga. at en korrelasjon mellom strukturelle delesjoner og inaktivering av Rb-genet i sin helhet er i samsvar med anvisningen av Rb-genet til denne regionen, utelukker ikke homozygotisk total delesjon eller vanlig 3'-delesjoner muligheten av at Rb-genet er nedstrøms for denne regionene. Et definitivt bevis for autenticiteten av Rb-genet ville enten være eksistensen av en 5'-delesjon eller homozygotisk indre delesjon i andre svulster. To retinoblastomer og et osteosarkom hadde slike delesjoner.

Det første eksempelet, svulst LA-RB74, kom fra en pasient med bilateral retinoblastom. Som vist i fig. 3B, fil 6, mangler Hind III-restriksjonsfragmentet 7.5 kb. En kopi av et nytt 4.1 kb-bånd kunne bli detektert. I denne svulsten, er Rb-transkriptet redusert i størrelse til 4.4 kb, som er i samsvar med delesjonen av et exon som er tilstede i det manglende 7.5 kb HindIII-fragmentet, fig. 4, fil 6. Restriksjonsmønsteret til fibroblastene fra den samme pasienten er vist i fig. 3B, fil 7. Tilstedeværelse av et kopi av hver av det normale 7.5 og det avvikende 4.1 kb Hind III-fragmentet indikerer at denne pasienten hadde en killelinjedelesjon i denne regionen.

Et annet eksempel på en homozygotisk indre delesjon kan sees i svulst LA-RB151, som også er fra en pasient med bilateral

retinoblastom. RFLP-studier viste at kromosom 13-probene både over og nedenfor Rb-lokuset var heterozygotiske i fibroblastceller og ble homozygotiske i svulstceller. I svulsten manglet begge kopiene av 9.8 kb Hind III og to kopier av et nytt 8.0 kb HindIII-fragment var tilstede, fig. 3B, fil 8. Utifra intensiteten på 9.8 kb HindIII-fragmentet i fibroblastene, fig. 3B, fil 9, konkluderer vi med at bare et enkelt kopi av 9.8 kb HindIII-fragmentet var tilstede i fibroblastene.

Et tredje eksempel på en homozygotisk indre delesjon ble funnet i osteosarkom, OHS. Denne svulsten ble tilveiebrakt fra en pasient som hadde et tidligere retinoblastomtilfelle. Som fig. 3B, fil 10, viser mangler 7.5 kb HindIII-fragmentet. Den lille mengden bakgrunnshybridisering til 7.5 kb-fragmentet kommer antageligvis fra noen få forurensende normale celler. Det er interessant at mens både OHS og LA-RB74 har en delesjon av 7.5 kb HindIII-fragmentet og avkortede transkripter, er Rb-gentranskriptet i OHS redusert til 3.9 kb, fig. 4, fil 7, som er mindre enn det for LA-RB74, fig. 4, fil 6.

Svulst LA-RB125 er fra en pasient med unilateral sporadisk retinoblastom. Som vist i fig. 3B, fil 12, er bare en enkelt kopi av 7.5 kb HindIII-fragmentet tilstede, i motsetning til to kopier av resten av Rb-genet. Et av Rb-allelene inneholder sannsynligvis en indre delesjon i 7.5 kb-regionen.

LA-RB99 er fra et unilateralt tilfelle av retinoblastom hvori en indre delesjon innbefattende HindIII 9.8 kb-fragmentet kan bli detektert i et av Rb-allelene, fig. 3B, fil 21. Et nytt fragment også på 7.5 kb blir istedenfor dannet. To transkripter med forskjellig størrelse, et 7.0 kb og et med normal størrelse på 4.7 kb kan bli detektert i svulsten, fig. 4, fil 20. I begge disse tilfellene kunne bare en abnormalitet bli detektert i et av kromosomene 13s.

Tre svulster med total delesjon av et av Rb-allelene er vist i filene 13, 14 og 15 i fig. 3A og 3B. LA-RB112, fil 13, var fra en pasient med unilateral sporadisk sykdom, LA-RB157, fil 14, var fra et bilateralt tilfelle og OSV, fil 15, er et osteosarkom fra en pasient uten kjent retinoblastomtilfelle. I alle disse tilfellene forblir bare et enkelt, tilsynelatende normalt, Rb-lokus. Lite eller ikke noe Rb-transkript kan bli detektert i LA-RB157, fig. 4, fil 9. I OSV kan derimot en avkortet beskjed på 4.2 kb bli detektert, fig. 4, fil 10.

Tilstedeværelse av et stykke av en GC-rik region ved den ekstreme 5'-enden av cDNA'et vanskeliggjorde analysen av det genomiske lokuset. Hvis vi antar at 14.5 kb HindIII-fragmentet, fig. 2B, inneholder det første exonet av Rb-genet, har flere av retinoblastomtilfellene 5'-delesjoner. Hvis det derimot eksisterer enda et annet exon foran 14.5 kb Hind III-fragmentet, vil disse tilfellene representere flere eksempler på indre delesjoner.

Omtrent 60% av de førti retinoblastomene viser ingen tilsynelatende strukturelle forandringer i Rb-genet. Blant denne svulstgruppen, er forskjellige abnormaliteter observert i Rb-transkriptekspresjon. Ingen av de følgende fem svulstene uttrykker f.eks. et Rb-transkript; de bilaterale retinoblastomene LA-RB73, fig. 4, fil 8; LA-RB69A, fig. 4, fil 14; og LA-RB133, fig. 4, fil 16, hvori alle er homozygotiske for et kromosom 13; den bilaterale svulsten LA-RB110, fig. 4, fil 17, som er heterozygotisk for kromosom 13 polymorfe prober både over og nedenfor Rb-lokuset; og den unilaterale svulsten LA-RB160, fig. 4, fil 18, som er blitt homozygotisk for en kromosom 13 probe, 7D2, som også er beliggende i den kromosomale regionen 13q14.

I andre tilfeller detekteres også unormale transkripter. F.eks., det unilaterale tilfellet, LA-RB94 som er homozygotisk for kromosom 13, viser ingen strukturelle for-

andringer i sin helhet, fig. 3A og 3B, fil 16, men har en liten mengde av et tilsynelatende større Rb-transkript, fig. 4, fil 11. Dette er sannsynligvis forårsaket av tapet av et spleisegrenseområde, slik at et lite intron er innbefattet i det endelige transkriptet. LA-RB70, som heller ikke har noen tilsynelatende forandring i Rb DNA-lokuset, fig. 3A og 3B, fil 17, har en redusert mengde av et Rb-transkript i normal størrelse, fig. 4, fil 12. Til slutt, Y79, som er den fortiden mest anvendt retinoblastomcellen, har konsekvent vist en redusert mengde av et forkortet Rb-transkript på 4.2 kb, fig. 4B, fil 13, selv om ingen DNA-forandringer i sin helhet kan bli observert med probene som finnes nå, fig. 3A og 3B, fil 18. Sannsynligvis har en enda ikke-detektert delesjon oppstått i Rb-lokuset.

En homozygotisk indre delesjon og forkortet Rb-transkript ble også observert i et osteosarkom fra en pasient med en tidligere retinoblastomhistorie. Disse data er i samsvar med postulatet om at Rb-genet er ansvarlig for utvikling av både retinoblastom og osteosarkom. Observasjon som innbefatter at de fleste svulstene ikke uttrykker Rb-genet på RNA-nivå, tilveiebringer sterk støtte for den recessive naturen til Rb-genet og påstanden om at det er tapet av funksjonen av begge Rb-allelene som er ansvarlig for svulstutvikling.

I alle de indre delesjonstilfellene som ble undersøkt, involverte delesjonene alltid enten 7.5 eller 9.8 kb Hind III-fragmentene. Et kopi av Hind III 7.5-fragmentet var forandret i RB120F-fibroblastene, fig. 3B fil 22. Denne fibroblastcellelinjen var fra en pasient med bilateral retinoblastom, hvori en ballansert translokasjon innbefattende den kromosomale region 13q14 og 10q22 har blitt oppstått. Et nytt bånd på 6.5 kb ble istedenfor detektert. Om disse regionene av Rb-genlokuset inneholder spesielle strukturer, slik at de ville være predisponert for delesjon eller translokasjon, må enda bli undersøkt.

Disse dataene, LA-RB128B, LA-RB74 og LA-RB151 tilveiebrakte også en bekreftelse på Knudson's to-tilfelle hypotese. I bilaterale tilfeller, en mutasjon med Rb-lokuset som representerer det første tilfellet, ble lett detektert i fibroblastene, fig. 3B, filene 3, 7, og 9, og det andre tilfellet ble funnet i svulsten, fig. 3B, filene 2, 6 og 8. I det unilaterale tilfellet, LA-RB165, ble de to mutasjons-tilfellene, 3'-delesjon og totaldelesjon, bare oppdaget i svulsten, fig. 3B, fil 4, og ikke i fibroblasten, fig. 3B, fil 5.

Eksempel 2

Det er blitt observert at retinoblastomgenet er inaktivert på lignende måte i noen humane brystsvulster, human melanom, små-cellesvulster i lungen, bløt vevssarkom og fibrosarkom. Disse observasjonene tilveiebringer grunnlaget for deteksjonen av defekter i retinoblastomgenet i cellene til disse pasientene.

Det anvendte humane brystkarsinomcellelinjene ble tilveiebrakt fra American type culture collection. Teknikkene som ble anvendt var som tidligere beskrevet for retinoblastomsvulster.

Det genomiske Rb-lokuset, fig. 5, er fremstilt som exoner inneholdende Hind III og Sal I restriksjonsfragmenter. cDNA-klonene er delt inn i to porsjoner for syntese av prober. Fig. 6 viste Southern-blot-analyse av Hind III fordøyd genomisk DNA fra elve humane brystsvulster. Denne viser at fem av disse svulstene, A, C, E, G og K, viser strukturelle avvik i denne regionen. Fig. 7 viser en Southern-blot-analyse av Hind III fordøyd genomisk DNA fra seksten humane brystsvulstcellelinjer, innbefattende de elve prøvene vist i fig. 6, og en fibrosarkomcellelinje, fil 0.

Fig. 7 viser at flere strukturelle avvik kan sees. I tillegg viser både en human brystsvulstlinje, fil A, og fibro-

sarkomlinjen, fil 0, strukturelle avvik i denne delen av Rb-genloket.

En oppsummering av de strukturelle forandringene er vist i fig. 8. De exon-innholdende Hind III-fragmentene er vist øverst, mens de strukturelle forandringene er vist nedert. Indre delesjoner i 7.5 kb Hind III-fragmentregionen observeres i mange prøver.

Bortsett fra homozygotisk indre delesjon i dette området, innbefatter andre typer av forandringer homozygotisk indre delesjon, homozygotisk 3'-delesjon, amplifikasjon eller kombinasjon av disse ble også observert. Disse strukturelle avvik i humane brystsvulster ligner svært på de som finnes i retinoblastom. Ved anvendelse av Southern-blot-analyse, viste ni av de nitten humane brystsvulstene, et humant melanom, ATCC-cellelinje Sk-Mel-5, to osteosarkom og et fibrosarkom, strukturelle avvik. Prosentandelen av brystsvulstcellelinjer med strukturelle forandringer er derfor lik prosentandelen av retinoblastom.

Eksempel 3

Stilling av diagnose blir utført på svulsten og/eller de konstitusjonelle cellene. Hver gang svulstmaterialet er tilgjengelig, blir de først analysert for strukturelle defekter i Rb-genet ved hjelp av noen eller alle teknikkene som er beskrevet heri. Når mutasjonen er identifisert, blir diagnostikken fokusert på det muterte området og anvendt på de konstitusjonelle cellene. F.eks. mangler begge kopiene av Hind III 7.5 kb DNA-fragmentene fra svulst DNA'et til LA-RB74. Denne strukturelle defekten er blitt arvet i den konstitusjonelle cellen til pasienten, pga. at et kopi av Hind III 7.5 kb mangler disse celler. For derfor å diagnostisere predisposisjon overfor å utvikle retinoblastom og beslektede sykdommer i den nærmeste slektningen til forsøkspersonen, vil man fokusere på detektering av tilstedeværelse eller fravær av Hind III 7.5 kb DNA-fragmentet.

I fravær av svulstmateriale, blir deteksjon av Rb-strukturelle avvik utført på konstitusjonelle celler. I tillegg, der hvor det er en familiær forekomst av retinoblastom og/eller osteosarkom, blir arv av polymorfe Rb-alleler lett etter og sammenlignet med tilfellet av Rb-svulst i familien.

Det faktum at strukturelle forandringer innenfor Rb-lokuset lett kan bli detektert med den nye cDNA-klonen i omtrent 40% av retinoblastomene og likeledes i fibroblaster fra noen bilaterale pasienter, gjør at denne proben er svært nyttig i prenatal diagnostikk. Fagmannen oppdager fort at når hele det genomiske lokuset er analysert og flere prober og fremgangsmåter blir tilgjengelige, kan betraktelig flere abnormaliteter bli detektert.

Denne cDNA-probe bør med en gang være nyttig i prenatal diagnostikk i familier hvor en av foreldrene har en detekterbar strukturell abnormalitet i Rb-genet, så som de individene hvor svulstene LA-RB74, LA-RB151 og LA-RB128B eller fibroblastlinje RB120F er avledet fra. Hvis lignende forandringer ble funnet i føtale celler, ville dette være tegn på at fosteret arvet Rb-mottakelighetsgenet. Et slikt foster ville nesten med sikkerhet utvikle retinoblastom og ha mye høyere sannsynlighet for å ha andre ondartetheter, spesielt osteosarkom, i senere år hvis svangerskapet ikke ble avbrutt.

cDNA-proben kunne også gjøre det mulig å identifisere noen av de beregnede 15% av individer som har unilateral sporadisk Rb, men som beklagelig vis har den arvelige formen av sykdommen.

Det er også klart at Rb-genet spiller en rolle når det gjelder utvikling av de ovenfor nevnte svulstene. Anvendelse av cDNA-klonen til Rb-genet for deteksjon av gendefekter kan derfor bli utført med andre ondartetheter, innbefattende

humane brystsvulster, humane melanomer, osteosarkomer.
fibrosarkom, bløtt vevssarkom og små-cellelungesvulster.

5 Fagmannen vil lett kunne dra nytte av foreliggende opp-
finnelse å utføre hensikten og tilveiebringe fordelene som er
nevnt, og likeledes de som er iboende deri.

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

cDNA kodende for en del av Rb-proteinet, k a r a k t e r i -
 5 s e r t v e d a t cDNA har en lengde opp til 4,6 Kb med
 en sekvens som har følgende formel:

```

5'
      10      20      30      40
CCCCCAAAA  ACGGCCGCCA  CCGCCGCCGC  TGCCGCCGCG
      50      60      70      80
GAACCCCGG  CACCGCCGCC  GCCGCCCCCT  CCTGAGGAGA
10      90     100     110     120
ACCCAGAGCA  GGACAGCGGC  CCGGAGGACC  TGCCTCTCGT
      130     140     150     160
CAGGCTTGAG  TTTGAAGAAA  CAGAAGAACC  TGATTTTACT
      170     180     190     200
GCATTATGTC  AGAAATTAAA  GATACCAGAT  CATGTCAGAG
      210     220     230     240
AGAGAGCTTG  GTTAACTTGG  GAGAAAGTTT  CATCTGTGGA
15      250     260     270     280
TGGAGTATTG  GGAGGTTATA  TTCAAAGAA  AAAGGAACTG
      290     300     310     320
TGGGGAATCT  GTATCTTTAT  TGCAGCAGTT  GACCTAGATG
      330     340     350     360
AGATGTCGTT  CACTTTTACT  GTGCTACAGA  AAAACATAGA
      370     380     390     400
20      AATCAGTGTC  CATAAATTCT  TTAACCTTACT  AAAAGAAATT
      410     420     430     440
GATACCAGTA  CCAAAGTTGA  TAATGCTATG  TCAAGACTGT
      450     460     470     480
TGAAGAAGTA  TGATGTATTG  TTTGCACTCT  TCAGCAAATT
      490     500     510     520
GGAAAGGACA  TGTGAACTTA  TATATTTGAC  ACAACCCAGC
      530     540     550     560
25      AGTTCGATAT  CTA CTGAAAT  AAATTCTGCA  TTGGTGCTAA
      570     580     590     600
AAGTTTCTTG  GATCACTTTT  TTATTAGCTA  AAGGGGAAGT
      610     620     630     640
ATTACAAATG  GAAGATGATC  TGGTGATTTC  ATTTCAAGTA
      650     660     670     680
ATGCTATGTG  TCCTTGACTA  TTTTATTAAA  CTCTCACCTC
      690     700     710     720
30      CCATGTTGCT  CACCCAGGCG  TATAAACAG  CTGTTATACC
      730     740     750     760
CATTAAATGGT  TCACCTCGAA  AACCCAGHC  GGGTCAGAAC
      770     780     790     800
AGGAGTGCAC  GGATAGCAAA  ACAACTAGAA  AATGATACA
      810     820     830     840
GAATTATTGA  AATTCTCTGT  AAAGAACATG  AATGTAATAT
      850     860     870     880
35

```

	AGATGAGGTG	AAAAATGTTT	ATTTCAAAA	TTTTATACCT
	890	900	910	920
	TTTATGAATT	CTCTTGGA	TGTAACATCT	AATGGACTTC
	930	940	950	960
	CAGCGGTTGA	AAATCTTTCT	AAACGATACG	AAGAAATTTA
	970	980	990	1000
5	TCTTAAAAAT	AAAGATCTAG	ATGCAAGATT	ATTTTTGCAT
	1010	1020	1030	1040
	CATGATAAAA	CTCTTCAGAC	TGATTCTATA	GACAGTTTTG
	1050	1060	1070	1080
	AAACACAGAG	AACACCACGA	AAAAGTAACC	TTGATGAAGA
	1090	1100	1110	1120
	GGTGAATGTA	ATTCTCCAC	ACACTCCAGT	TAGGACTGTT
	1130	1140	1150	1160
10	ATGAACACTA	TCCAACAATT	AATGATGATT	TTAAATTCAG
	1170	1180	1190	1200
	CAAGTGATCA	ACCTTCAGAA	AATCTGATTT	CCTATTTTAA
	1210	1220	1230	1240
	CAACTGCACA	GTGAATCCAA	AAGAAAGTAT	ACTGAAAAGA
	1250	1260	1270	1280
	GTGAAGGATA	TAGGATACAT	CTTTAAAGAG	AAATTTGCTA
	1290	1300	1310	1320
15	AAGCTGTGGA	CAGGGTTGTG	TCGAAATTGG	ATCACAGCGA
	1330	1340	1350	1360
	TACAAACTTG	GAGTTCGCTT	GTATTACCGA	GTAATGGAAT
	1370	1380	1390	1400
	CCATGCTTAA	ATCAGAAGAA	GAACGATTAT	CCATTCAAAA
	1410	1420	1430	1440
	TTTAGCAAA	CTTCTGAATG	ACAACATTTT	TCATATGTCT
	1450	1460	1470	1480
20	TTATTGGCGT	GCGCTCTTGA	GGTTGTAATG	GCCACATATA
	1490	1500	1510	1520
	GCAGAAGTAC	ATCTCAGAAT	CTTGATTTCAG	GAACAGATTT
	1530	1540	1550	1560
	GTCTTTCCCA	TGGATTCTGA	ATGTGCTTAA	TTTAAAAGCC
	1570	1580	1590	1600
	TTTGATTTTT	ACAAAGTGAT	CGAAAGTTTT	ATCAAAGCAG
	1610	1620	1630	1640
25	AAGGCAACTT	GACAAGAGAA	ATGATAAAAC	ATTTAGAACG
	1650	1660	1670	1680
	ATGTGAACAT	CGAATCATGG	AATCCTTTGC	ATGGCTCTCA
	1690	1700	1710	1720
	GATTCACCTT	TATTTGATCT	TATTAAACAA	TCAAAGGACC
	1730	1740	1750	1760
	GAGAAGGACC	AACTGATCAC	CTTGAATCTG	CTTGTCCTCT
	1770	1780	1790	1800
30	TAATCTTCCT	CTCCAGAATA	ATCACACTGC	AGCAGATATG
	1810	1820	1830	1840
	TATCTTTCTC	CTGTAAGATC	TCCAAAGAAA	AAAGGTTCAA
	1850	1860	1870	1880
	CTACGCGTGT	AAATTCTACT	GCAAATGCAG	AGACACAAGC
	1890	1900	1910	1920
	AACCTCAGCC	TTCCAGACCC	AGAAGCCATT	GAAATCTACC
	1930	1940	1950	1960
35	TCTCTTTCAC	TGTTTTATAA	AAAAGTGTAT	CGGCTAGCCT
	1970	1980	1990	2000

	ATCTCCGGCT	AAATACACTT	TGTGAACGCC	TTCTGTCTGA
	2010	2020	2030	2040
	GCACCCAGAA	TTAGAACATA	TCATCTGGAC	CCTTTTCCAG
	2050	2060	2070	2080
	CACACCCTGC	AGAATGAGTA	TGAACTCATG	AGAGACAGGC
	2090	2100	2110	2120
5	ATTTGGACCA	AATTATGATG	TGTTCCATGT	ATGGCATATG
	2130	2140	2150	2160
	CAAAGTGAAG	AATATAGACC	TTAAATTCAA	AATCATTGTA
	2170	2180	2190	2200
	ACAGCATACA	AGGATCTTCC	TCATGCTGTT	CAGGAGACAT
	2210	2220	2230	2240
	TCAAACGTGT	TTTGATCAAA	GAAGAGGAGT	ATGATTCTAT
	2250	2260	2270	2280
10	TATAGTGTTT	TATAACTCGG	TCTTCATGCA	GAGACTGAAA
	2290	2300	2310	2320
	ACAAATATTT	TGCAGTATGC	TTCCACCAGG	CCCCCTACCT
	2330	2340	2350	2360
	TGCACCAATA	CCTCACATTC	CTCGAAGCCC	TTACAAGTTT
	2370	2380	2390	2400
	CCTAGTTTAC	CCTTACGGAT	TCCTGGAGGG	AACATCTATA
	2410	2420	2430	2440
15	TTTCACCCCT	GAAGAGTCCA	TATAAAATTT	CAGAAGGTCT
	2450	2460	2470	2480
	GCCAACACCA	ACAAAAATGA	CTCCAAGATC	AAGAATCTTA
	2490	2500	2510	2520
	GTATCAATTG	GTGAATCATT	CGGGACTTCT	GAGAAGTTCC
	2530	2540	2550	2560
	AGAAAATAAA	TCAGATGGTA	TGTAACAGCG	ACCGTGTGCT
	2570	2580	2590	2600
20	CTAAAGAAGT	GCTGAAGGAA	GCAACCTCC	TAAACCACTG
	2610	2620	2630	2640
	AAAAAACTAC	GCTTTGATAT	TGAAGGATCA	GATGAAGCAG
	2650	2660	2670	2680
	ATGGAAGTAA	ACATCTCCCA	GGAGAGTCCA	AATTTCAGCA
	2690	2700	2710	2720
	GAAACTGGCA	GAAATGACTT	CTACTCGAAC	ACGAATGCAA
	2730	2740	2750	2760
25	AAGCAGAAAA	TGAATGATAG	CATGGATACC	TCAAACAAGG
	2770	2780	2790	2800
	AAGAGAAATG	AGGATCTCAG	GACCTTGGTG	GACACTGTGT
	2810	2820	2830	2840
	GCACCTCTGG	ATTCATTGTC	TCTCACAGAT	GTGACTGTAT
	2850	2860	2870	2880
	AACTTTCCCA	GGTTCTGTTT	ATGGCCACAT	TTAATATCTT
	2890	2900	2910	2920
30	CAGCTCTTTT	TGTGGATATA	AAATGTGCAG	ATGCAATTGT
	2930	2940	2950	2960
	TTGGGTGATT	CCTAAGCCAC	TTGAAATGTT	AGTCATTGTT
	2970	2980	2990	3000
	ATTTATACAA	GATTGAAAAT	CTTGTGTAAA	TCCTGCCATT
	3010	3020	3030	3040
	TAAAAAGTTG	TAGCAGATTG	TTTCTCTTTC	CAAAGTAAAA
	3050	3060	3070	3080
35	TTGCTGTGCT	TTATGGATAG	TAAGAATGGC	CCTAGAGTGG
	3090	3100	3110	3120
	GAGTCCTGAT	AACCCAGGCC	TGTCTGACTA	CTTTGCCTTC
	3130	3140	3150	3160

TTTTGTAGCA	TATAGGTGAT	GTTTGCTCTT	GTTTTTATTA
3170	3180	3190	3200
ATTTATATGT	ATATTTTTTTT	AATTTAACAT	GAACACCCTT
3210	3220	3230	3240
AGAAAATGTG	TCCTATCTAT	CTTCCAAATG	GAATTTGATT
3250	3260	3270	3280
GACTGCCCAT	TCACCAAAAT	TATCCTGAAC	TCTTCTGCAA
3290	3300	3310	3320
AAATGGATAT	TATTAGAAAT	TAGAAAAAAA	TTACTAATTT
3330	3340	3350	3360
TACACATTAG	ATTTTATTTT	ACTATTGGAA	TCTGATATAC
3370	3380	3390	3400
TGTGTGCTTG	TTTTATAAAA	TTTTGCTTTT	AATTAAATAA
3410	3420	3430	3440
AAGCTGGAAG	CAAAGTATAA	CCATATGATA	CTATCATACT
3450	3460	3470	3480
ACTGAAACAG	ATTTCATACC	TCAGAATGTA	AAAGAACTTA
3490	3500	3510	3520
CTGATTATTT	TCTTCATCCA	ACTTATGTTT	TTAAATGAGG
3530	3540	3550	3560
ATTATTGATA	GTACTCTTGG	TTTTTATACC	ATTCAGATCA
3570	3580	3590	3600
CTGAATTTAT	AAAGTACCCA	TCTAGTACTT	GAAAAAGTAA
3610	3620	3630	3640
AGTGTTCTGC	CAGATCTTAG	GTATAGAGGA	CCCTAACACA
3650	3660	3670	3680
GTATATCCCA	AGTGCACTTT	CTAATGTTTC	TGGGTCCTGA
3690	3700	3710	3720
AGAAATTAAGA	TACAAATTAA	TTTTACTCCA	TAAACAGACT
3730	3740	3750	3760
GTTAATTATA	GGAGCCTTAA	TTTTTTTTTC	ATAGAGATTT
3770	3780	3790	3800
GTCTAATTGC	ATCTCAAAAT	TATTCTGCCC	TCCTTAATTT
3810	3820	3830	3840
GGGAAGGTTT	GTGTTTTCTC	TGGAATGGTA	CATGCTTTCC
3850	3860	3870	3880
ATGTATCTTT	TGAACTGGCA	ATTGTCTATT	TATCTTTTAT
3890	3900	3910	3920
TTTTTTAAGT	CAGTATGGTC	TAACACTGGC	ATGTTCAAAG
3930	3940	3950	3960
CCACATTATT	TCTAGTCCAA	AATTACAAGT	AATCAAGGGT
3970	3980	3990	4000
CATTATGGGT	TAGGCATTAA	TGTTTCTATC	TGATTTTGTG
4010	4020	4030	4040
CAAAAGCTTC	AAATTAAAAC	AGCTGCATTA	GAAAAAGAGG
4050	4060	4070	4080
CGCTTCTCCC	CTCCCCTACA	CCTAAAGGTG	TATTTAAACT
4090	4100	4110	4120
ATCTGTGTGA	TTAACTTATT	TAGAGATGCT	GTAACCTAAA
4130	4140	4150	4160
ATAGGGGATA	TTTAAGGTAG	CTTCAGCTAG	CTTTTAGGAA
4170	4180	4190	4200

	AATCACTTTG	CCTAACTCAG	AATTATTTTT	AAAAAGAAAT
	4210	4220	4230	4240
	CTGGTCTTGT	TAGAAAACAA	AATTTTATTT	TGTGCTCAGT
	4250	4260	4270	4280
5	TAAGTTTCAA	ACTTACTATT	TTGACAGTTA	TTTTGATAAC
	4290	4300	4310	4320
	AATGACACTA	GAAAACTTGA	CTCCATTTC	TCATTGTTTC
	4330	4340	4350	4360
	TGCATGAATA	TCATACAAAT	CAGTTAGTTT	TTAGGTCAAG
	4370	4380	4390	4400
	GCCTTACTAT	TTCTGGGTCT	TTTGCTACTA	AGTTCACATT
	4410	4420	4430	4440
10	AGAATTAGTG	CCAGAATTTT	AGGAACTTCA	GAGATCGTGT
	4450	4460	4470	4480
	ATTGAGATTT	CTTAAATAAT	GCTTCAGATA	TTATTGCTTT
	4490	4500	4510	4520
	ATTGCTTTTT	TGTATTGGTT	AAACTGTAC	ATTTAAAATT
	4530	4540	4550	4560
	GCTATGTTAC	TATTTTCTAC	AATTAATAGT	TTGTCTATTT
	4570	4580		
15	TAAAATAAAT	TAGTTGTTAG	3'	

20

og fragmenter og derivater derav kodende for minst en del av retinoblastomgenet, og at minst en del av nevnte cDNA er hybridiserbar til 5'-enden av retinoblastomgenet.

25

2.

30

cDNA ifølge krav 1 kodende for en del av Rb-proteinet, karakterisert ved at nevnte cDNA har en lengde på omtrent 0,9 Kb og nevnte cDNA er hybridiserbart til retinoblastomgenet og er et EcoR1-fragment av nevnte cDNA ifølge krav 1.

3.

35

cDNA ifølge krav 1 kodende for en del av Rb-proteinet, karakterisert ved at nevnte cDNA har en lengde på omtrent 3,8 Kb og at nevnte cDNA er hybridiserbart til retinoblastomgenet og er et EcoR1-fragment av cDNA ifølge krav 1.

4.

Fremgangsmåte for detektering av en predisposisjon overfor utvikling av retinoblastoma, k a r a k t e r i s e r t
v e d at følgende trinn utføres:

a) hybridiserer in vitro en merket retinoblastomgenprobe som omfatter et cDNA ifølge krav 1, 2 eller 3 til DNA ekstrahert fra et målvev; og

b) bestemmer bindingen av proben til nevnte DNA.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at målvevet som blir anvendt er ikke-tumorvev.

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 4 og 5, k a r a k t e r i s e r t
v e d at målvevet er føtalt vev.

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at nevnte målvev er en tumor.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at nevnte cDNA omfatter fragmenter av, derivater av, eller cDNA-sekvensen ifølge krav 4.

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at resultatene ifølge trinn (b) blir anvendt for å bestemme terapi for tumorer.

10.

Diagnostisk in vitro analysesett for å detektere predisposi-

sjon for retinoblastom, k a r a k t e r i s e r t v e d
at det omfatter:

minst et cDNA ifølge kravene 1, 2 eller 3 spesifikt
for retinoblastomgenet, hvori nevnte cDNA er effektivt når
5 det blir hybridisert med DNA fra en målcelle for å indikere
tilstedeværelse eller fravær av retinoblastomgen, i det
nevnte cDNA koder for en del av Rb proteinet.

11.

10 Diagnostisk analysesett ifølge krav 10, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at det videre innbefatter minst en
kontrollprøve.

12.

15 Diagnostisk analysesett ifølge krav 10, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at det videre omfatter emballasje og
instruksjoner.

20

25

30

35

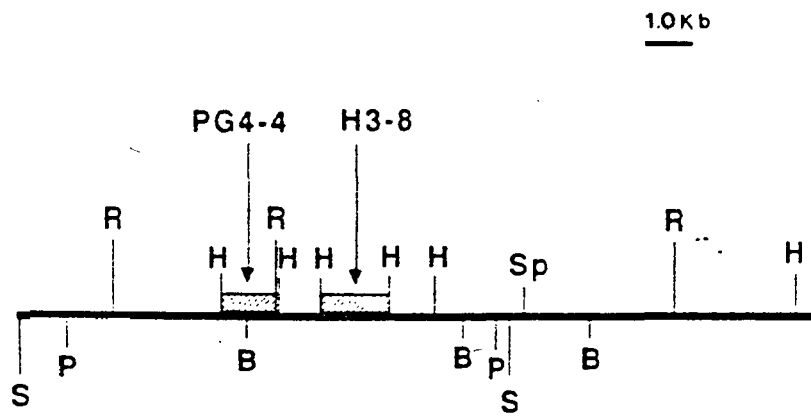
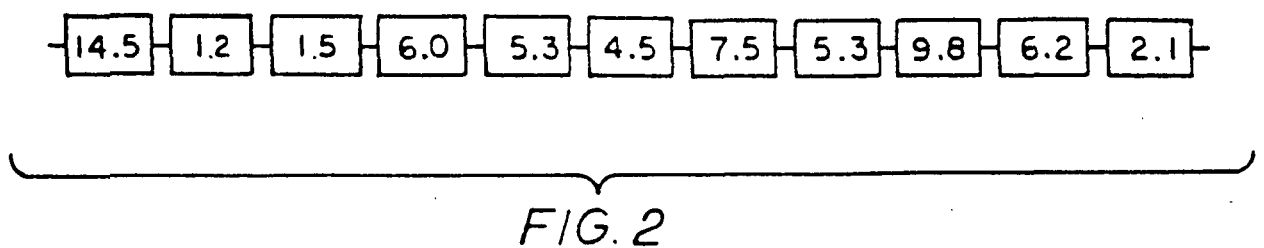
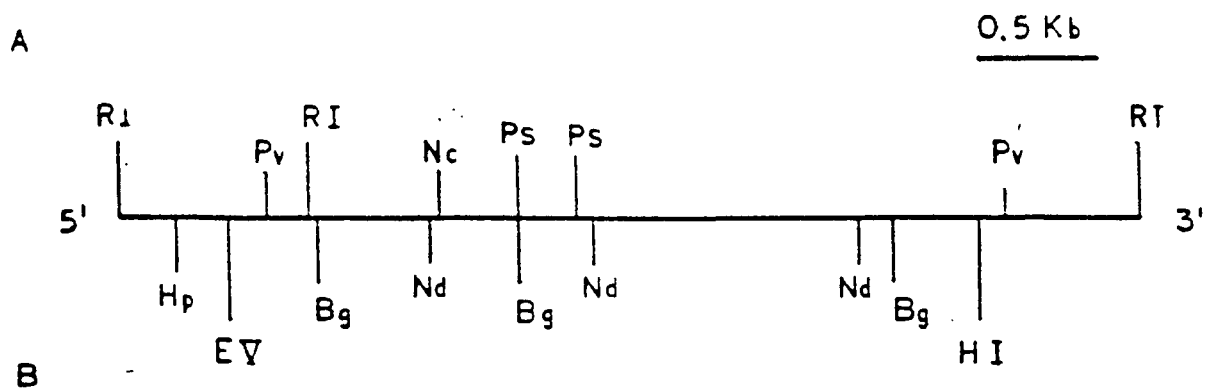
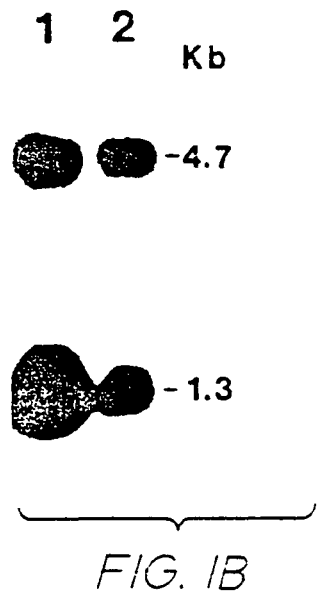


FIG. 1A



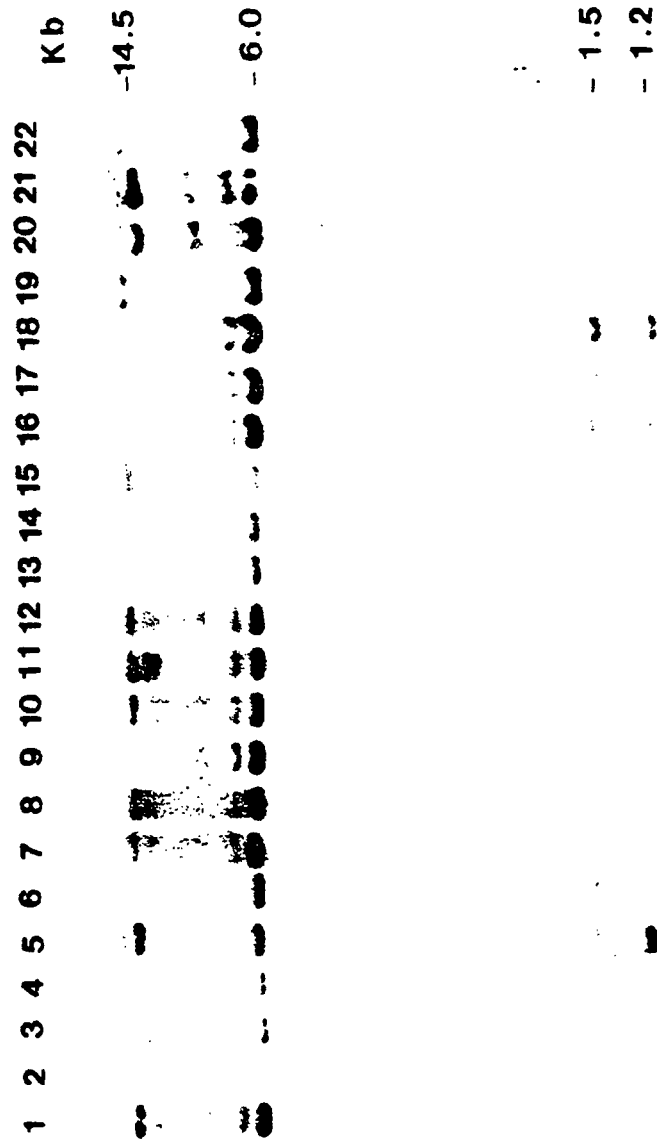


FIG. 3A

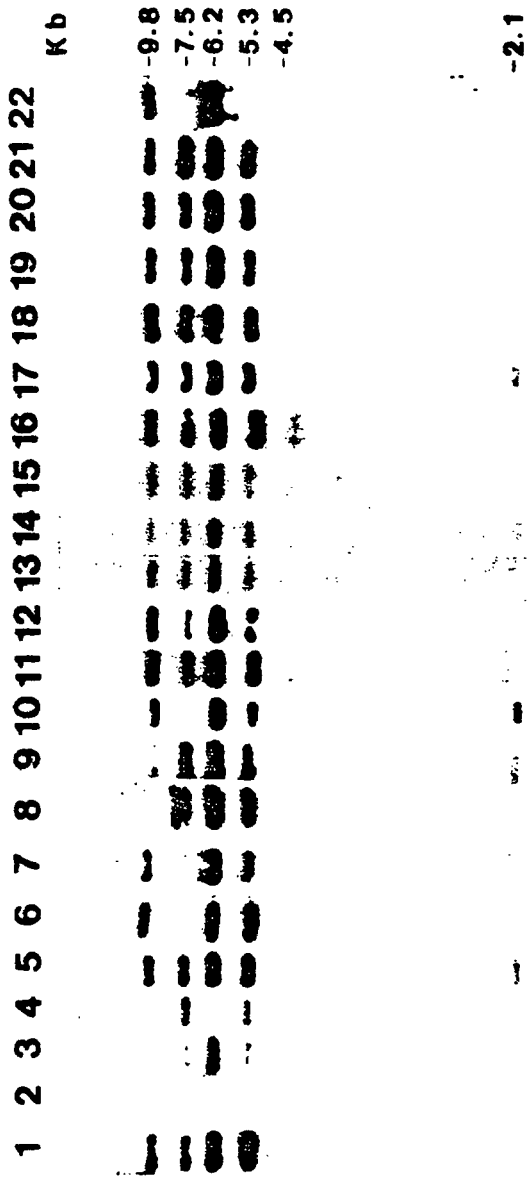


FIG. 3B

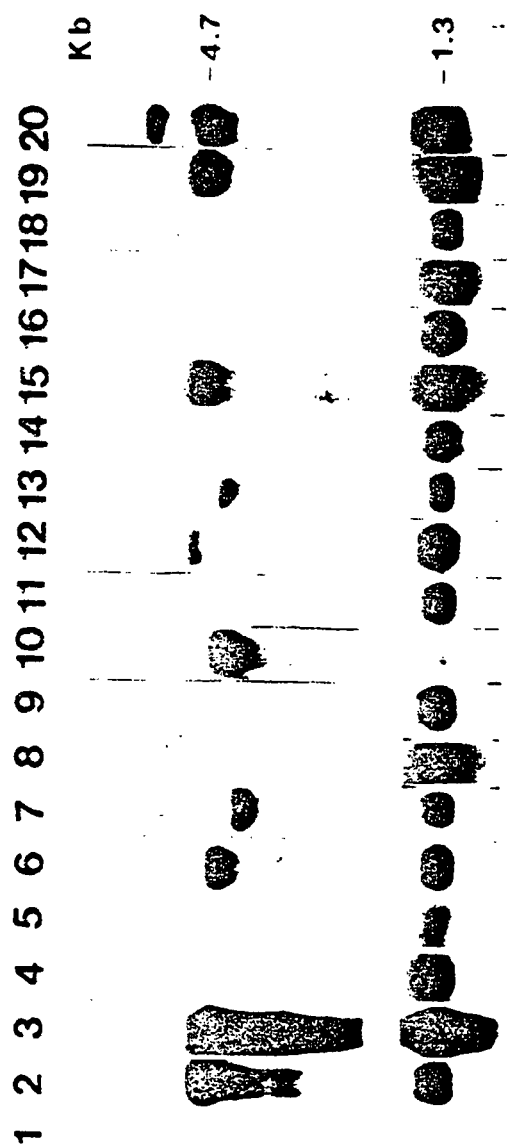
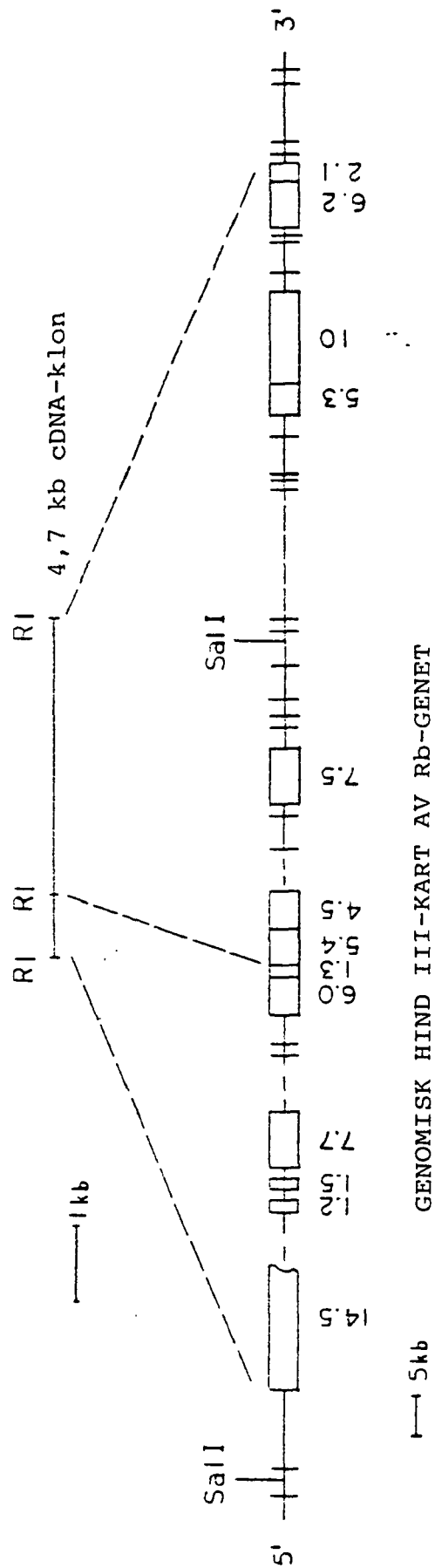


FIG. 4

5



GENOMISK HIND III-KART AV Rb-GENET

FIG. 5

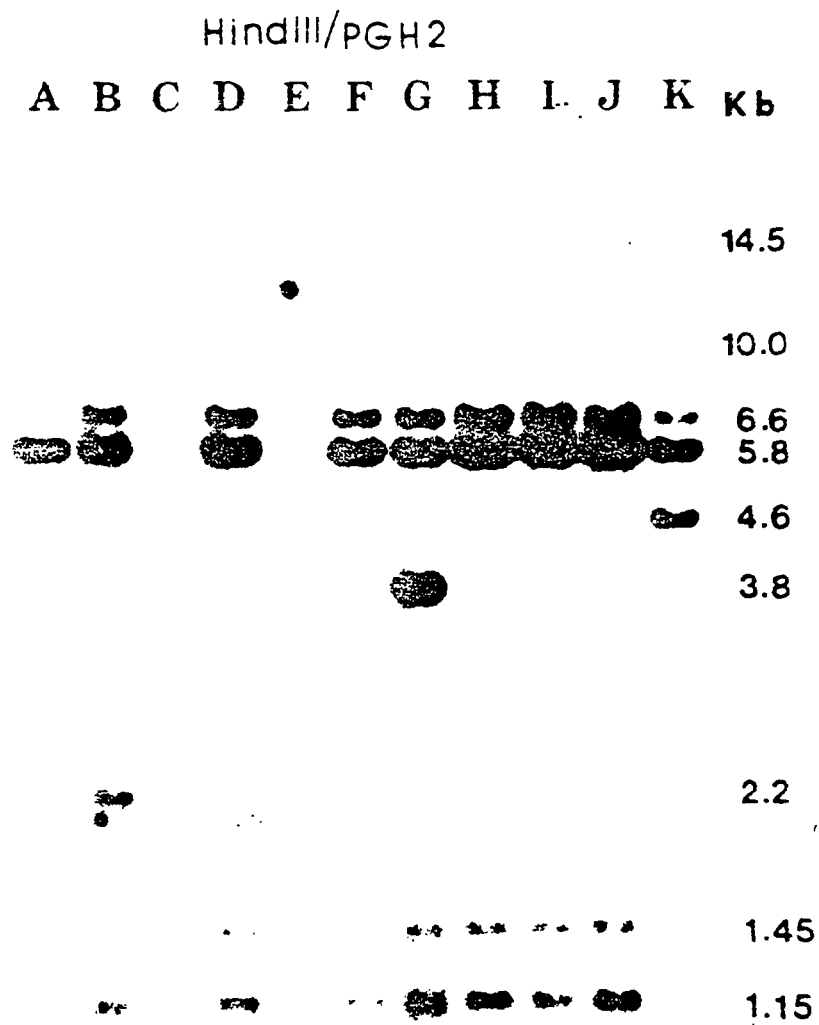


FIG. 6

HindIII/PG3.8

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R R K Ъ



2.1

FIG. 7

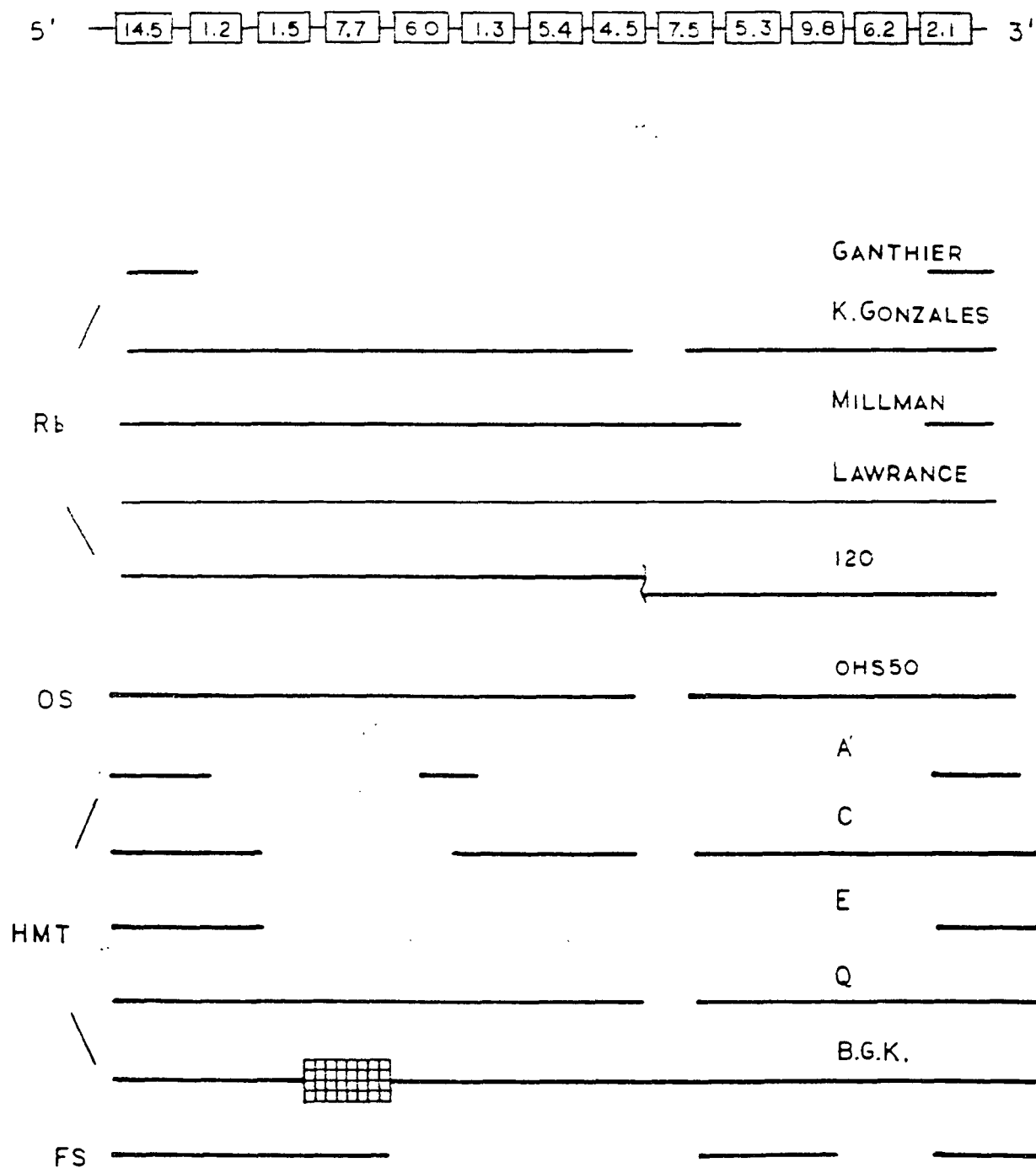


FIG. 8

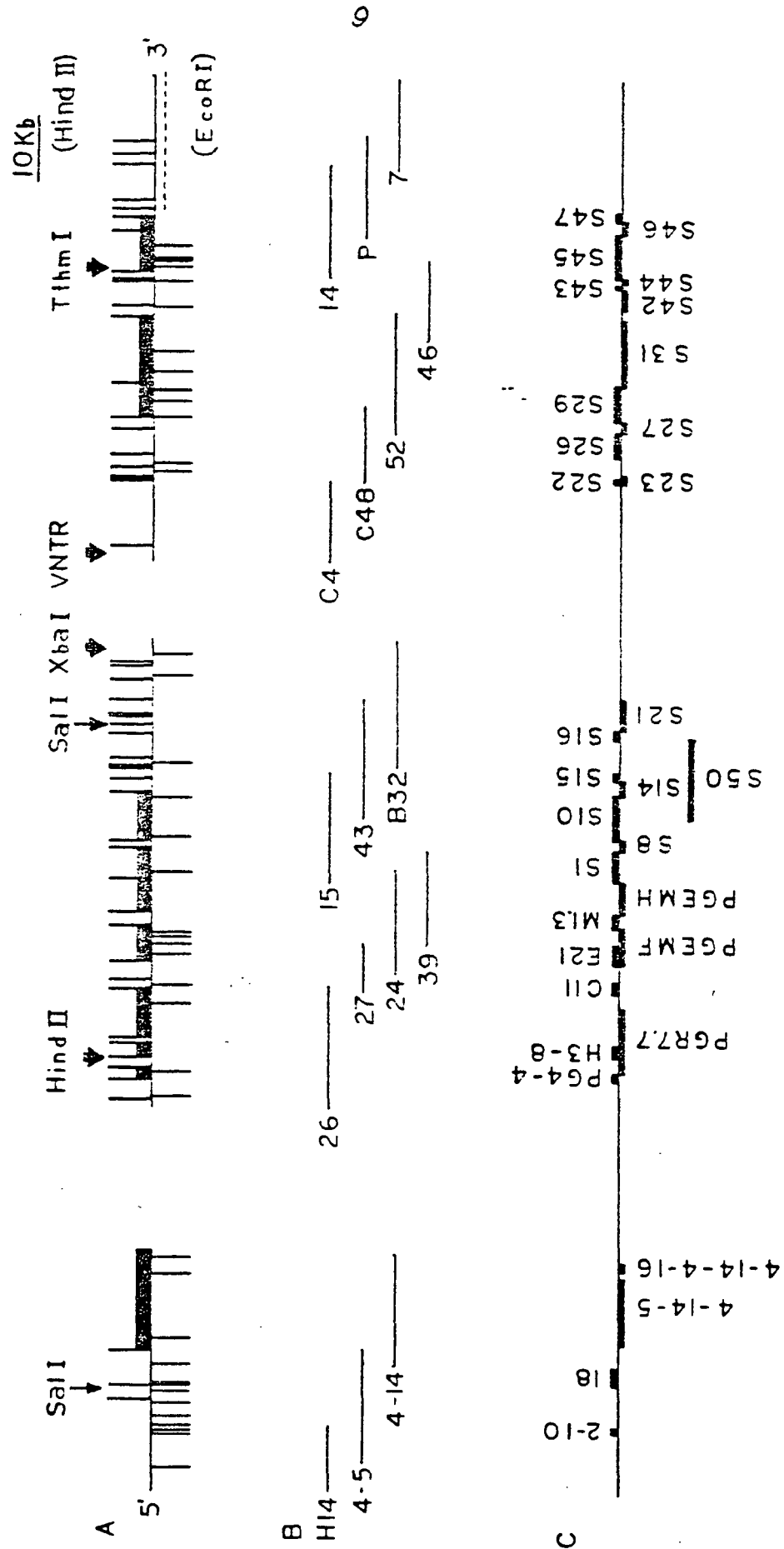


FIG. 9

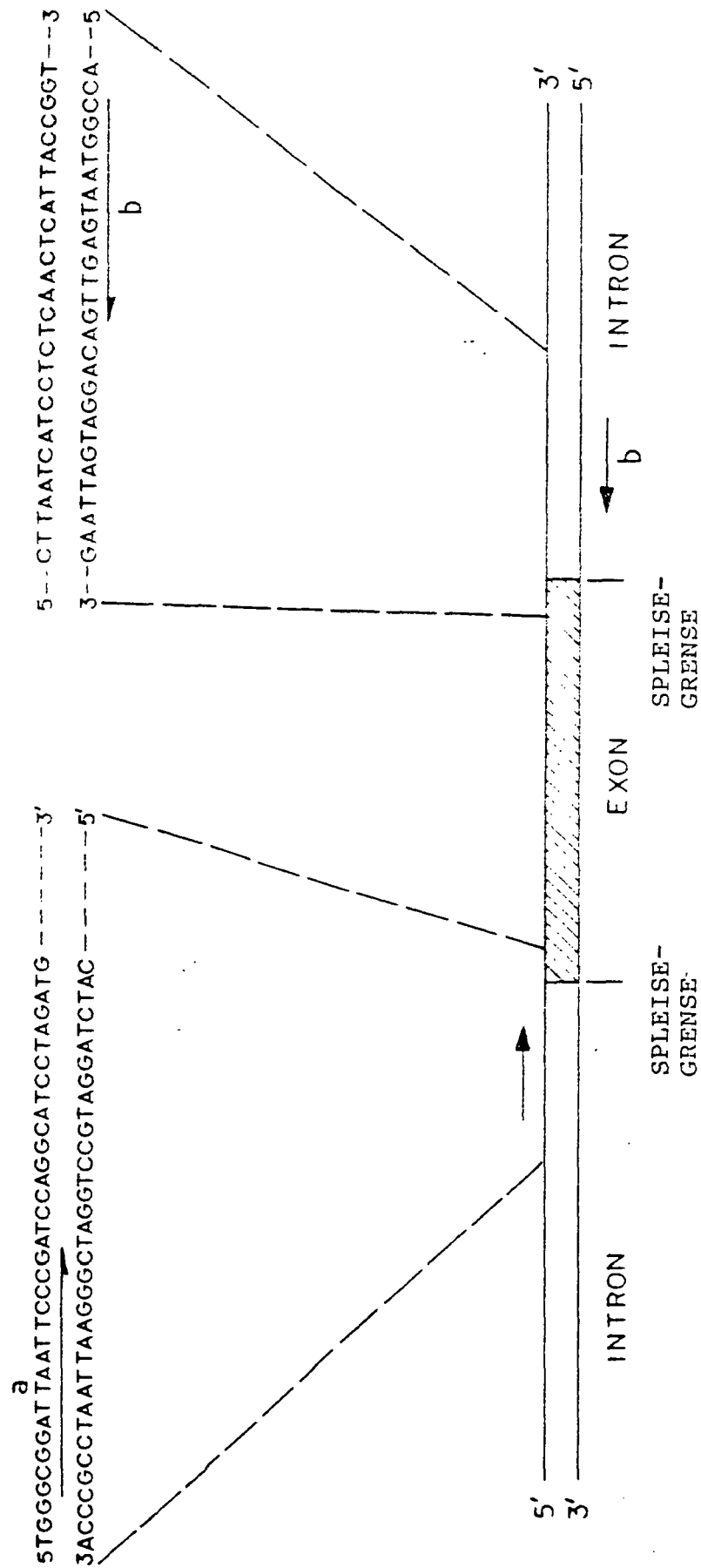


FIG. 10

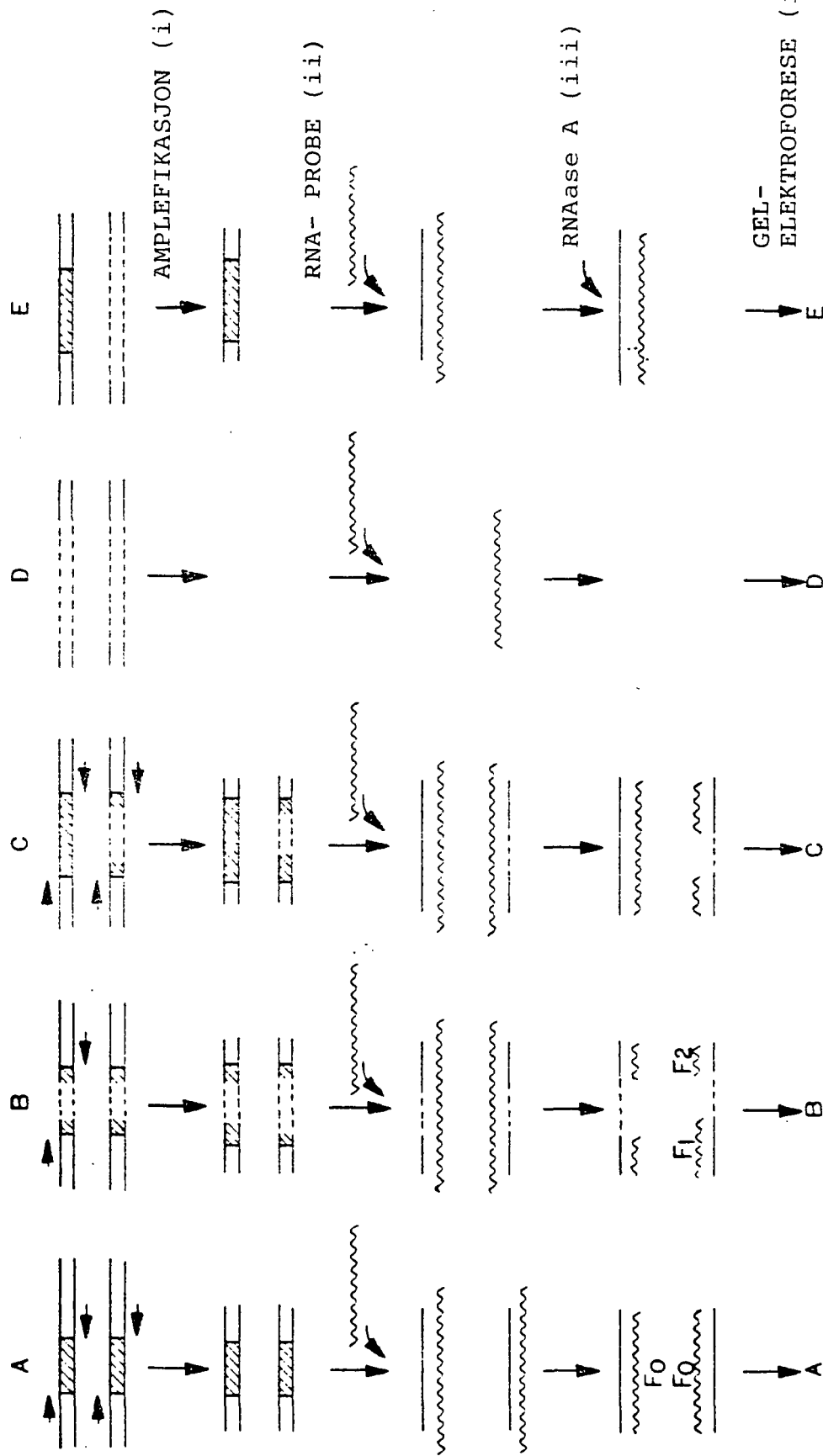


FIG. 11