

P. 2. 11084. 6114

4.

CLAYTON FOUNDATION FOR RESEARCH

"PROCESSO PARA A DETECÇÃO DA PREDISPOSIÇÃO PARA RETINOBLASTOMA E MÉTODO PARA A DETECÇÃO DE UM GENE DE RETINOBLASTOMA EM TUMORES UTILIZANDO UMA SONDA DE GENE DE RETINOBLASTOMA"

Âmbito da Invenção

A presente invenção refere-se ao âmbito de diagnóstico da propensão para o retinoblastoma utilizando um gene sonda do retinoblastoma.

A presente invenção também se refere ao âmbito dos genes sonda do retinoblastoma e à sua utilização para detectar tumores com um gene defeituoso do retinoblastoma. São exemplos destes tumores, o osteossarcoma, o fibrossarcoma, o sarcoma de tecido mole, o carcinoma de células pequenas, o melanoma e tumores da mama.

Antecedentes da Invenção

O gene do retinoblastoma é o protótipo de uma classe de genes de cancro humano recessivos os quais, se pensa estar associada com a tumorigénese a perda de actividade de ambos os alelos normais. O retinoblastoma (Rb) surge sob ambas as formas, hereditária e não hereditária e, é o cancro que atinge os olhos mais comum na criança. Os casos esporádicos bilaterais são sempre hereditários, enquanto que aproximadamente 85% dos casos esporádicos unilaterais não são hereditários. Com base na análise estatística de dados clínicos, pensou-se que para o desenvolvimento do retinoblastoma eram necessários dois fe-

4.

nômenos de mutação. Nos casos hereditários onde está presente a mutação da linha germinativa em todas as células, postulou-se ser necessário para tumorigênese uma mutação somática secundária ao acaso num retinoblastoma alvo.

A indicação inicial da natureza do primeiro fenómeno de mutação surge a partir de estudos citogenéticos de linfócitos ou fibroblastos de pacientes com retinoblastoma. Descobriu-se que um pequeno subgrupo destes pacientes possuía uma deleção que envolvia a região cromossômica 13q14. Os dados citogénicos iniciais do tumor também implicaram o cromossoma 13 como o alvo para o segundo fenómeno mutacional. Verificasse, frequentemente, a perda ou eliminação do cromossoma 13, incluindo 13q14 em retinoblastomas de pacientes com dois cromossoma 13 aparentemente de constituição normal.

Uma evidência adicional de que o segundo fenómeno também envolve o locus de susceptibilidade do Rb na região 13q14, surgiu a partir de estudos de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCFR).

Pela comparação dos genótipos de constituição normal e dos genótipos de tumor, conforme definido por PCFRs no cromossoma 13, demonstrou-se que a redução para hemizigotia ou homozigotia para todos ou parte dos alelos do cromossoma 13 é uma consequência normal no desenvolvimento do retinoblastoma. De modo semelhante, no osteossarcoma, um tumor ósseo que surge frequentemente como uma malignidade primária adicional em pacientes com retinoblastoma hereditário, observou-se o desenvolvimento de homozogotia e hemizigotia, no cromossoma 13. Todos os dados disponíveis sugerem que a perda de actividade de ambos os alelos normais no locus do Rb é o factor chave no desenvolvimento do tumor. Contudo, não foi possível até agora provar es

ta hipótese com segurança e utilizar este conhecimento para detectar tumores que possuem um gene defeituoso de Rb e determinar a propensão para o desenvolvimento do retinoblastoma.

Resumo da Invenção

Um dos objectivos da presente invenção é um método para detectar a propensão para o retinoblastoma.

Um objectivo adicional da presente invenção é um método para a detecção de tumores com um defeito no gene do retinoblastoma.

Um outro objectivo da presente invenção é o desenvolvimento de um conjunto para a detecção de uma propensão para desenvolver o retinoblastoma.

Um objectivo adicional da presente invenção é o desenvolvimento de um clone de cADN e sondas.

Assim, como complemento dos objectivos precedentes fornece-se, de acordo com um aspecto da presente invenção, um método para detectar a predisposição para desenvolver retinoblastoma, que compreende os passos de hibridação de uma sonda do gene do retinoblastoma com ADN extraído a partir de um tecido alvo; e determinação da ligação da sonda com o ADN. O tecido alvo é tecido não tumoral e pode ser tecido de feto, assim como, tecido post-natal até tecido adulto.

Noutros aspectos pode utilizar-se o método para a detecção de tumores que contêm um gene defeituoso de retinoblastoma. Por exemplo, pode utilizar-se este método para detectar este defeito no osteossarcoma, fibrossarcoma, sarcoma de tecido mole., carcinoma de células pequenas, melanoma e carcinoma da mama.

Um outro aspecto envolve um conjunto para a detecção de uma predisposição para desenvolver retinoblastoma que compreende pelo menos um cADN específico para o gene do retinoblastoma, em que a referida sonda de cADN é eficaz quando se hibrida com ADN a partir de uma célula alvo para indicar a presença ou ausência do gene do retinoblastoma.

Outro aspecto inclui um clone de ADN com até cerca de 4,6 Kb bem como dois fragmentos de restrição Eco R1 com cerca de 0,9 e cerca de 3,8 Kb.

A presente invenção é útil na detecção de uma ampla variedade de tumores que possuem um defeito no gene do retinoblastoma.

Outros objectivos adicionais, características e vantagens evidenciar-se-ão a partir da descrição seguinte, dos aspectos presentemente preferidos da presente invenção, fornecidos para o propósito da descoberta quando tomados conjuntamente com os gráficos em anexo.

Breve Descrição dos Gráficos

A presente invenção será mais facilmente entendida a partir da leitura da memória descritiva seguinte e por referência aos gráficos que a acompanham e formam uma parte desta.

A figura 1A é uma mapa de restrição do locus Rb na região H3-8.

A figura 1B é uma análise de Mancha de Northern de células mortais da retina de feto humano.

A figura 2A é um mapa de restrição de cADN de 4,6 Kb de um gene Rb.

A figura 2B apresenta a ordem linear dos fragmentos de restrição Hind III que se detectaram com diversas sondas de cADN. Cada uma das caixas representa um fragmento discreto de Hind III cujo tamanho (Kb) se indica pelo número na caixa.

A figura 3A é uma análise da mancha de Southern do ADN genômico Hind III a partir de células normais, retinoblastoma e das suas células constitucionais as quais se hibridaram com pGH2, o qual é um subclone do fragmento Eco RI de 0,9 Kb na extremidade 5' do clone de ADN.

Em ambas as figuras 3A e 3B, na calha 1 são fibroblastos humanos normais de controlo; 2, LA-RB128B (tumor); 3, LA-RB128B-F (fibroblasto); 4, LA-RB165 (tumor); 5, LA-RB165-F (fibroblasto); 6, LA-RB74 (tumor); 7, LA-RB-74-F (fibroblasto); 8, LA-RB151 (tumor); 9, LA-RB151-F (fibroblasto); 10, OHS-50 (osteossarcoma); 11, LA-RB73 (tumor); 12, LA-RB125 (tumor); 13, LA-RB113 (tumor); 14, LA-RB157 (tumor); 15, OSV (osteossarcoma); 16, LA-RB94 (tumor); 17, LA-RB70 (tumor); 18, Y-79 (tumor); 19, LA-RB69A (tumor); 20, LA-RB69A-F (fibroblasto); 21, LA-RB99 (tumor); 22, RB120F (fibroblasto que possui uma translocação equilibrada 46, XX,t [10, 13] [q22; q14]).

A figura 4 é uma análise de mancha Northern de ARN poliadenilado a partir de fibroblastos humanos normais de células imortais normais de retina humana, retinoblastoma e seus fibroblastos. Calha 1, Poli A-ARN; 2, células da retina de feto humano normal; 3, Ad5/HER A (células da retina humana imortais de Adenovírus 5); 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-RB70; 13, Y-79; 14, LA-RB69A; 15, LA-RB69A-F (fibroblasto); 16, LA-RB133; 17, LA-RB110; 18, LA-RB160; 19, WS 1 (fibroblasto); 20, LA-RB99.

A figura 5 apresenta o mapa de restr-ção Hind III do locus genômico Rb.

A figura 6 é uma análise da mancha de Southern de ADN genômico da mama humana digerido com Hind III, calhas A, BT-549 (carcinoma ductal infiltrante, tumores da mama humana); B, T-47D (efusão pleural dum paciente com carcinoma ductal de mama); C, DU4475 (nódulo cutâneo metastásico de mama humana); D, MDA-MB-175-VII (carcinoma ductal de mama humana); E, MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama humana); F, HS0578T (carcinoma ductal de mama humana); G, ZR-5-30 (carcinoma de mama humana); H, BT-483 (carcinoma ductal de mama humana); I, MDA-MB-415 (adenocarcinoma de mama humana); J, MDA-MB-453 (carcinoma de mama humana); K, MDA-MB-157 (carcinoma de mama humana).

Figura 7 - Análise da Mancha de Southern do ADN genômico digerido com Hind III a partir de tumores da mama e de um fibrossarcoma. As calhas A-K são as mesmas da fig. 6 e as calhas L, MRMDA 231; M, SW613; N, MCF-7 (carcinoma de mama humana); O, HSg13T (fibrossarcoma); P, MDAMB 461; Q, MDAMB 436.

A figura 8 é uma representação esquemática do resumo das aberrações estruturais que se detectaram em quatro tumores humanos. Rb = retinoblastoma, OS = osteossarcoma, HMT = tumores de mama humana e FS = fibrossarcoma.

A figura 9A - representação esquemática do locus genômico do gene do retinoblastoma. O local do enzima de restrição para Hind III apresenta-se acima e o de Eco RI apresenta-se a baixo da linha 5'3'. As caixas sombreadas representam fragmentos Hind III que contêm exões. A seta saliente aponta para os locais do enzima ou áreas que apresentam polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição. VNTR, número variável de

repetições de forma encadeada. As linhas a ponteadas representam regiões que não estão inteiramente caracterizadas.

A figura 9B - Sobreposição de clones de fago bacteriano a partir do qual se deduziu o mapa do enzima de restrição da figura 2A.

A figura 9C - Posição e dimensões dos diversos subclones dos fragmentos de ADN de locus genômico de Rb a partir de clones de fago bacteriano que se subclonaram dentro dos vetores plasmídicos PGEM.

Figura 10 - Uma porção hipotética do locus genômico de Rb. A área a sombreado representa exões. Parte das sequências nucleotídicas que cobrem as junções exão-intrão apresentam-se acima e abaixo. Para fins de diagnóstico, sintetizar-se-ã um par de oligonucleótidos de DNA a e b, de acordo com as sequências 5'-3' no intrão.

Figura 11 - Aplicação de ensaio de protecção de RNase para o diagnóstico de mutações numa região hipotética do genoma do Rb. (i) amplificação de ADN de uma pessoa sã ou de tecido de doente, utilizando o par de precursores a e b que flanqueiam a exão; (ii) ADN amplificado desnaturado e misturado com uma sonda ribonucleotídica marcada radioactivamente que neste caso é tão extensa quanto o ADN amplificado; (iii) Ácidos nucleicos misturados deixados a circularizar e, então, digeridos com RNase A. Uma porção da sonda ARN de cadeia simples digerida, mas que não digeriu ADN-ARN híbrido de cadeia dupla, (iv) O híbrido de cadeia dupla desnaturou-se em ADN e ARN de cadeia simples que depois se separou por electroforese num gele; (v) Expôs-se o gele a uma película de raios X para revelar o tamanho da molécula de ARN. As fontes de ADN foram as seguin-

tes. A, indivíduo normal; B, tecido de tumor que possui uma deleção ou uma mutação de base simples na região flanqueada pelo oligonucleótido precursor a e b; C, células constituintes a partir do paciente em B; D, tecido de tumor que possui uma deleção que abrange a e/ou b; E, células constituintes de paciente em D.

Os gráficos não estão necessariamente à escala e determinadas características da presente invenção podem estar exageradas na escala ou apresentadas de forma esquemática tendo em vista a clarificação e concisão.

Descrição Pormenorizada

Será evidente para o especialista que diversas substituições e modificações possam fazer-se na presente invenção sem fugir ao seu âmbito e espírito.

Um aspecto da presente invenção é um método para detectar a predisposição para desenvolver retinoblastoma e que compreende os passos de hibridação de uma sonda do gene de retinoblastoma com ADN extraído a partir de tecido alvo e determinação da ligação sonda com o ADN. A ligação pode medir-se segundo uma diversidade de métodos, incluindo a determinação da quantidade da sonda que hibridava, a determinação das modificações estruturais, polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição e amplificação ligação-sonda pelo método PCR e avaliação do produto.

Num aspecto preferido, da presente invenção marca-se a sonda e mede-se a hibridação determinando a quantidade de material que se utilizou para a marcação da molécula híbrida. O especialista reconhecerá facilmente que se encontram disponí-

veis uma variedade de métodos biológicos moleculares para medir a própria hibridação ou o produto da hibridação.

Uma diversidade de tumores demonstraram possuir um defeito estrutural no gene do retinoblastoma. Isto verificou-se no próprio retinoblastoma e também noutras perturbações tumorais tais como o osteossarcoma, fibrossarcoma, sarcoma de tecido mole, carcinoma de células pequenas do pulmão, linhas de células de melanoma e tumor da mama.

Podem detectar-se os tumores que contêm o gene defeituoso do retinoblastoma segundo um método que compreende os passos: hibridação da sonda do gene de retinoblastoma com ADN extraído a partir de um tecido alvo; e determinação da ligação da sonda ao referido ADN; Por exemplo, no retinoblastoma o próprio tumor carece do gene Rb em ambos os cromossomas, enquanto as células constituintes podem carecer apenas de um gene Rb. Assim, é evidente que a disponibilidade de uma sonda de gene Rb proporciona a capacidade para detectar indivíduos que possuem predisposição para formar um retinoblastoma.

O tecido alvo é a amostra que se obtém de indivíduos que se pretendem observar e a partir da qual se extraiu o ADN. Não existem limitações no tipo de tecido que se pode recolher e analisar. Por exemplo, os tecidos podem ser de tumor, sangue, fibroblastos, pele ou outros tecidos normais e podem ser tomados dos tecidos fetal ao tecido adulto.

Um outro aspecto inclui um método para detecção do ADN cromossómico que codifica pelo menos uma porção do gene de retinoblastoma humano e que compreende a desnaturação do ADN cromossómico total para se obter um ADN de cadeia simples; fazer contactar o referido ADN de cadeia simples com uma sonda do ge-

ne de retinoblastoma; e identificação da sonda de ADN híbrido para detectar o ADN cromossómico que contém pelo menos uma porção do gene do retinoblastoma humano.

Um outro aspecto engloba um "conjunto" para a detecção de uma predisposição para retinoblastoma que compreende, pelo menos uma sonda específica de cDNA para o gene de retinoblastoma, em que a referida sonda de cADN é eficaz quando se efectua a hibridação com o cADN de uma célula alvo que indica a presença ou ausência do gene de retinoblastoma. Num aspecto adicional pode incluir-se pelo menos uma célula de controlo para determinar a especificidade e reactividade. Outros aspectos do "conjunto" podem incluir embalagem e instruções.

O especialista verificará facilmente que se podem utilizar uma diversidade de indicadores marcados com qualquer das sondas de retinoblastoma. Estes marcadores podem ser radioactivos, fluorescentes ou enzimáticos. Além disso, o especialista também verificará que podem utilizar-se outros métodos para determinar a hibridação sem se utilizarem sondas marcadas. Por exemplo, o exame dos polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição método de amplificação PCR e método de clivagem por RNAase A sondagem oligonucleotídica específica dos alelos.

Descrição do Locus Rb

O locus genómico Rb possui, pelo menos, 200 Kb de comprimento. Na figura 9 apresenta-se o mapa de restrição do locus genómico. As linhas a ponteadas representam regiões não completamente caracterizadas. Isolou-se a parte restante do locus genómico a partir de bibliotecas genómicas humanas que se construíram no

4.

bacteriófagos λ EMBL3 e λ fix. Na figura 9 apresenta-se a afinidade destes clones de bacteriófagos e o locus genômico. Existem pelo menos 20 exões no locus genômico. Estas exões localizam-se em 12 fragmentos de restrição Hind III conforme se apresenta na figura 9. Efectuou-se a subclonagem dos fragmentos de restrição que contêm as exões nos vectores plasmídicos PGEM4 e PGEM2. A posição dos locais Hind III apresentam-se acima da linha 5'-3' e os locais Eco RI apresentam-se abaixo. As caixas a sombreado representam os fragmentos de ADN Hind III que contêm as exões. Os fragmentos incluem-se na sonda de cADN de 4,6Kb para o gene de retinoblastoma. A hibridação do ADN digerido com Hind III ou Eco RI com um clone marcado de cADN de Rb revela vários fragmentos de ADN de Hind III representados pelas caixas a sombreado. Detectaram-se grandes modificações estruturais envolvendo estes fragmentos.

Método de Clivagem por Ribonuclease A (RNAase A)

- Uma pequena deleção envolvendo muito poucos nucleótidos e uma mutação de base singular não seriam habitualmente detectáveis pela análise de manchas de Southern. Podem detectar-se estas modificações pelo ensaio por clivagem com ribonuclease A (RNAase A).

Uma vez que os defeitos estruturais nas exões do locus genômico Rb são as causas mais prováveis de inactivação, centrou-se o diagnóstico inicial nestas regiões. Conforme se apresenta na figura 9, cada uma das caixas sombreadas representa um fragmento de ADN Hind III que contém a exão. Existe uma ou mais exões em cada um destes fragmentos. É provável que o número total de exões exceda 20.

Tendo em vista a aplicação do ensaio de clivagem da RNAase A, sintetisaram-se pares de oligonucleótidos de ADN, fig. 10. Estes pares podem ser ou partes da exão ou da região de flanqueamento em redor de cada exão. Para se analisar uma amostra de ADN para uma mutação numa exão mistura-se uma pequena quantidade da amostra de ADN com os dois oligonucleótidos a e b. Submete-se a mistura a reacção da cadeia de polimerase (RCP) utilizando o sistema de Amplificação de ADN Gene AmpTM de Perkin-Elmer Cetus. Este método permite a amplificação selectiva do ADN flanqueado pelos dois oligonucleótidos. Desnatura-se o ADN amplificado e, depois, efectua-se a sua hibridação com um ribonucleótido de cadeia simples marcado radioactivamente, sintetizado a partir de um subclone do locus genómico Rb que contém esta região. Submete-se o material hibridado a digestão com RNAase A. Toma-se como um controlo uma reacção que consiste em ADN amplificado a partir de um indivíduo normal. Fracciona-se, o produto digerido, por electroforese em gele e detecta-se o tamanho do ribonucleótido radioactivo por exposição a uma película de raio X. Protege-se a sequência nucleotídica da sonda de ARN radioactiva que corresponde ao ADN amplificado de um indivíduo normal, da digestão por RNAase A. Utiliza-se como padrão o tamanho do fragmento F₀ de ARN, protegido (figura 11).

Para as amostras de ADN de tumor, as deleções que ocorrem na região flanqueada pelos dois oligonucleótidos pode originar na digestão do híbrido em dois fragmentos mais pequenos F₁ e F₂, figura 11B. Nas células constituintes também podem detectar-se os dois fragmentos se a mutação ocorrer num dos alelos Rb, figura 11C. Para as amostras de ADN de tumor com deleção

ções que abrangem um ou ambos os nucleótidos a e b, não é possível a amplificação do ADN. Por isso, não se protege a sonda de ARN, figura 11D. Quando se utilizam células constituintes pode haver problemas. Em tais casos ter-se-á de procurar um outro par de iniciadores oligonucleotídicos que flanqueiam a região delectada. Uma vez que a mutação possa ser detectada no gene Rb segundo estes métodos, é possível aplicar o mesmo procedimento de detecção na vizinhança imediata da sonda.

Nos casos em que se conhece uma história familiar, a segregação dos cromossomas que contêm os alelos que foram objecto de mutação podem identificar-se utilizando os enzimas e a sonda no gene Rb que pode detectar PCFRs.

Estudos de Ligação Utilizando Polimorfismos da Extensão do Fragmento de Restrição (PCFRs)

- Existem, pelo menos, quatro regiões no locus genómico de Rb que apresentam frequente polimorfismo com um enzima dado. São KpnI na região 1, e Hind III na região 2, Ith III 1 na região 4 e diversos enzimas na região 3. A região 3 é uma região VNTR (informações encadeadas em número variável); os enzimas RSal parecem ser particularmente úteis na detecção do polimorfismo. Os fragmentos de ADN gerados por estes enzimas podem apresentar polimorfismo de tamanho quando se hibridam com a sonda de ADN da região indicada. A segregação de um dado alelo Rb, conforme definido por estes RFLPs pode, assim, comparar-se com a segregação e incidência de retinoblastoma numa família.

4.

Descrição do cADN de Rb e dos Clones de ADN Genómico

A estratégia básica de clonagem envolve procedimentos cromossómicos utilizando sondas na região 13q14.1, o locus do gene de Rb. Isolaram-se, sondas livres, ao acaso, de sequências altamente repetitivas, a partir da biblioteca específica do cromossoma 13, LL 13NS01. Para identificar os clones que pertenciam à região 13q14.1, utilizaram-se duas linhas de células humanas híbridas desenvolvidas no hamster. Cada uma destas linhas de células continha o cromossoma 13 com uma deleção incluindo a região 13q14.1. Preparou-se a célula híbrida 3B6 utilizando a estirpe celular 32T que possui uma deleção cromossómica desde 13q14.1 até 13q14.3 enquanto 2D12 contém um cromossoma 13 com uma deleção de 13q14.1 a 13q22.3.

Identificaram-se os clones que continham inserções de ADN no interior da região cromossómica de 13q14.1 a 13q14.3 pela ausência de hibridação de ADN a partir de 3B6 e 2D12 utilizando as inserções como sondas. Podem obter-se, mediante estratégia semelhante, duas outras sondas, H2-42 e H3-8. Para além disso, uma vez que ambos os locais ESD e Rb estão em 13q14.1, também se isolou um clone de cADN ESD completo para se utilizar como uma sonda.

Utilizaram-se cada uma dessas sondas localizadas em 13q14.1 como ponto de partida para procedimento bidireccional. Isolou-se um grande número de clones utilizando estas diversas sondas. Descobriu-se, de forma interessante, que uma destas sondas, H3-8, não está presente em diversos fagos ou bibliotecas de cosmídeos, presumivelmente, devido ao facto de estar numa região que é facilmente eliminada e, assim, utiliza-se para detectar fragmentos de restrição mais pequenos.

A figura 1A apresenta um mapa de restrição desta região obtido por sobreposição de clones de diferentes fragmentos de restrição. O tamanho da inserção de cada clone obtido verificou-se por hibridação do clone com manchas genômicas.

Isolou-se, de modo surpreendente, uma sonda, PG4-4 que se situava muito próximo de H3-8 a qual hibridou com uma sequência de hamster. Esta conservação de sequência entre o ser humano e o hamster sugeriu que o PG4-4 contém a sequência de clonagem de um gene. A hibridação do PG4-4 com uma mancha de mARN de diversas linhas de células imortais de retina de feto humano revelou um mARN de 4,6 quilobases (Kb), fig. 1B. Utilizando o PG4-4 como uma sonda, isolaram-se diversos clones de cADN, o mais longo dos quais tinha 4,6 Kb. A figura 2A apresenta o mapa de restrição deste clone de cADN. Conforme se apresenta na figura, determinou-se a polaridade dos clones por hibridação de sondas de cadeia específica com manchas de mARN. Descobriu-se que a sequência da exão no PG4-4 estava localizada entre os sítios HpaI e Eco RV próximo da extremidade 5' do cADN. Na Tabela 1 apresenta-se a sequência nucleotídica de uma sonda de 4,6 Kb.

TABELEA 1

5'			
10	20	30	40
CCCCCAAAA	ACGGCCGCCA	CCGCCGCCGC	TGCCGCCCGC
50	60	70	80
GAACCCCGG	CACCGCCGCC	GCCGCCCCCT	CCTGAGGAGA
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
250	260	270	280
TGGAGTATTG	GGAGGTTATA	TTCAAAAGAA	AAAGGAACTG
290	300	310	320
TGGGGAATCT	GTATCTTTAT	TGCAGCAGTT	GACCTAGATG
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
490	500	510	520
GGAAAGGACA	TGTGAACCTA	TATATTTGAC	ACAACCCAGC
530	540	550	560
AGTTCGATAT	CTACTGAAAT	AAATTCTGCA	TTGGTGCTAA
570	580	590	600
AAGTTTCTTG	GATCACTTTT	TTATTAGCTA	AAGGGGAAGT
610	620	630	640
ATTACAAATG	GAAGATGATC	TGGTGATTTT	ATTTCACTTA
650	660	670	680
ATGCTATGTG	TCCTTGACTA	TTTTATTAAA	CTCTCACCTC
690	700	710	720
CCATGTTGCT	CACCCAGGCG	TATAAACAG	CTGTTATACC
730	740	750	760
CATTAATGGT	TCACCTCGAA	AACCCAGHC	GGGTCAGAAC
770	780	790	800
AGGAGTGCAC	GGATAGCAAA	ACAAC TAGAA	AATGATACAA
810	820	830	840
GAATTATTGA	AATTCTCTGT	AAAGAACATG	AATGTAATAT
850	860	870	880
AGATGAGGTG	AAAAATGTTT	ATTTCAAAAA	TTTTATACCT
890	900	910	920
TTTATGAATT	CTCTTGGA	TGTAACATCT	AATGGACTTC
930	940	950	960
CAGCGGTTGA	AAATCTTTCT	AAACGATACG	AAGAAATTTA

4.

TABELA 1 (Cont.)

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	ATTCTCCAC	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
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
GCAGAAGTAC	ATCTCAGAAT	CTTGATTGAG	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
ATGTGAACAT	CGAATCATGG	AATCCTTTGC	ATGGCTCTCA
1690	1700	1710	1720
GATTCACCTT	TATTTGATCT	TATTAACAA	TCAAAGGACC
1730	1740	1750	1760
GAGAAGGACC	AACTGATCAC	CTTGAATCTG	CTTGTCCTCT
1770	1780	1790	1800
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
TCTCTTTCAC	TGTTTTATAA	AAAAGTGTAT	CGGCTAGCCT
1970	1980	1990	2000
ATCTCCGGCT	AAATACACTT	TGTGAACGCC	TTCTGTCTGA

TABELA 1 (Cont.)

2010	2020	2030	2040
GCACCCAGAA	TTAGAACATA	TCATCTGGAC	CCTTTTCCAG
2050	2060	2070	2080
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
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
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
AGAAAATAAA	TCAGATGGTA	TGTAACAGCG	ACCGTGTGCT
2570	2580	2590	2600
CTAAGAAGT	GCTGAAGGAA	GCAACCCTCC	TAAACCCTG
2610	2620	2630	2640
AAAAACTAC	GCTTTGATAT	TGAAGGATCA	GATGAAGCAG
2650	2660	2670	2680
ATGGAAGTAA	ACATCTCCCA	GGAGAGTCCA	AATTTCAGCA
2690	2700	2710	2720
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
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
TAAAAAGTTG	TAGCAGATTG	TTTCCTCTTC	CAAAGTAAAA

TABELA 1 (Cont.)

3050	3060	3070	3080
TTGCTGTGCT	TTATGGATAG	TAAGAATGGC	CCTAGAGTGG
3090	3100	3110	3120
GAGTCCTGAT	AACCCAGGCC	TGTCTGACTA	CTTTGCCTTC
3130	3140	3150	3160
TTTTGTAGCA	TATAGGTGAT	GTTTGCTCTT	GTTTTTTATTA
3170	3180	3190	3200
ATTTATATGT	ATATTTTTTT	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	ATTCATACC	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
AGTGTCTGTC	CAGATCTTAG	GTATAGAGGA	CCCTAACACA
3650	3660	3670	3680
GTATATCCCA	AGTGCACTTT	CTAATGTTTC	TGGGTCCTGA
3690	3700	3710	3720
AGAATTAAGA	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	CATGTCCTTC
3850	3860	3870	3880
ATGTATCTTT	TGAACGGCA	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

TABELA 1 (Cont.)

4090	4100	4110	4120
ATCTGTGTGA	TTAACTTATT	TAGAGATGCT	GTAACCTTAAA
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
TAAGTTTCAA	ACTTACTATT	TTGACAGTTA	TTTGTATAAC
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
AGAATTAGTG	CCAGAATTTT	AGGAACTTCA	GAGATCGTGT
4450	4460	4470	4480
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'

Esta sonda de cADN consiste em, pelo menos, 20 exões.

Assim, podem efectuar-se sondas múltiplas mais pequenas (fragmentos) a partir desta grande sonda. Além disso, o especialista verificará que derivados desta sonda, por exemplo, sequências degeneradas ou sequências com poucas modificações no par de bases simples funcionarão como sondas eficazes.

Parte da extremidade 5' do gene de Rb carece do clone genómico. Esta parte que inclui o promotor e parte da primeira exão apresenta-se na Tabela 2.

TABELA 2

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

No clone genômico as Tabelas 1 e 2 são contínuas pelo que a base 1 da Tabela 1 será a base 527 da Tabela 2.

Estas dados mostram uma região CG enriquecida entre a extremidade 5' e o sítio Hpa I. A hibridação de manchas Southern com uma sonda feita a partir desta região CG enriquecida proporcionou invariavelmente um padrão manchado.

As sondas disponíveis de Rb proporcionam um meio para identificar a existência ou não de alterações estruturais no gene de Rb num dado tipo de tumor ou subjacentes a uma dado ti-

po de tumor. Por consequência, é possível que alguns tumores respondam de modo diferente à terapia com base no facto de existir ou não um defeito no gene de Rb. Também, uma vez que é evidente que a perda funcional do gene de Rb é crítica para o desenvolvimento do tumor pode ser possível tratar estes tumores mediante adição do gene ou do produto do gene dentro das células.

Análise de manchas de Southern - Extraíu-se o ADN a partir de tecidos alvo, por exemplo, tumor, sangue, fibroblasto ou outros tecidos normais. Efectua-se a digestão, separadamente, com diferentes enzimas de restrição. Separam-se os fragmentos de enzimas de restrição em gele de agarose por electroforese, desnaturam-se e transferem-se para um filtro de nitrocelulose. Sondas marcadas de cADN do gene do Rb hibridaram com o fragmento de ADN, no filtro. Num aspecto preferencial o marcador é radioactivo e expõe-se o filtro a películas de raios X.

Se o clone de cADN é o gene de Rb putativo, detectar-se-ão anomalias estruturais no ADN de determinados retinoblastomas. incluindo aqueles com deleções visíveis na região 13q14.1. Para analisar a estrutura do ADN genómico de retinoblastomas, utilizou-se um exame de endonucleases de restrição para descobrir enzimas que gerariam fragmentos de restrição bem separados com, uma sonda de cADN. O Hind III gerou fragmentos de restrição bem separados no ADN humano normal que podiam detectar-se pelos subclones do clone de cADN de 4,73 Kb. Na fig. 2B apresenta-se a ordem dos fragmentos de restrição de Hind III genómico detectáveis com uma sonda de cADN.

Uma vez que se utilizou uma sonda de cADN, detectar-se-ão apenas aberrações estruturais dos fragmentos de restrição que contêm a exão. Podem não ser detectadas aberrações estruturais nos fragmentos de restrição que contenham uma exão muito pequena.

Isto também é verídico para mutações pontuais ou deleções extremamente pequenas na exão ou nas junções de reparação. Contudo, mesmo com estas limitações observaram-se aberrações estruturais, incluindo parte ou todo o gene de Rb. Na Tabela 3 resumem-se as diversas formas de alterações estruturais.

TABELA 3

<u>TUMOR</u>	<u>FORMA DA DOENÇA</u>	<u>MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL NO GENE Rb</u>	<u>EXPRESSÃO DO GENE Rb E NÍVEL DE mARN</u>
LA-RB128B	Delecção	Delecção Homozigótica Total	Ausente
LA- RB165	Unilateral	Delecção Homozigótica 3'	Ausente
LA-RB74	Bilateral	Delecção Homozigótica Interna	Anormal
LA-RB151	Bilateral	Delecção Homozigótica Interna	ND+
OHS-50	Bilateral*	Delecção Homozigótica Interna	Anormal
LA-RB125	Unilateral	Delecção Interna de 1 Alelo	ND
LA-RB99	Unilateral	Delecção Interna de 1 Alelo	Anormal
LA-RB112	Unilateral	Delecção Total de 1 Alelo	ND
LA-RB157	Bilateral	Delecção Total de 1 Alelo	Ausente
OSV	Osteossarcoma Primário	Supressão Total de 1 Alelo	Anormal
LA-RB69A	Bilateral	Não Detectável	Ausente
LA-RB73	Bilateral	Não Detectável	Ausente
LA-RB110	Bilateral	Não Detectável	Ausente
LA-RB133	Bilateral	Não Detectável	Ausente
LA-RB160	Unilateral	Não Detectável	Ausente
LA-RB94	Unilateral	Não Detectável	Anormal
LA-RB70	Unilateral	Não Detectável	Reduzida
Y-79	Bilateral	Não Detectável	Anormal

* Osteossarcoma em pacientes com retinoblastoma bilateral.

+ Não determinado.



EXEMPLO 1

Examinaram-se por análise de manchas do Southern o ADN de quarenta casos de pacientes com retinoblastoma e de fibroblastos dos mesmos pacientes. Para facilitar esta análise, efectuou-se a subclonagem dos fragmentos Eco R1 de 0,9 Kb e 3,8 Kb dentro do vector PGEM-4, fig. 2A. Manchas Southern de ADN genómico isolado a partir de retinoblastomas digeridos com diferentes endonucleases de restrição hibridaram com sondas feitas a partir destes dois subclones, PG H2 (Eco R1 de 0,9 Kb) e PG 3,8M (Eco R1 de 3,8 Kb). Também se analisaram com estas sondas o ARN poliadenilado de diversos retinoblastomas.

Um dos mecanismos pelo qual se inactivam os dois alelos é a deleção total ou parcial de ambos os alelos de Rb. Um exemplo de deleção total de ambos os alelos é proporcionado pelo tumor, LA-RB128B, a partir de um paciente com retinoblastoma bilateral. A análise citogenética de fibroblastos deste indivíduo utilizando faixa de resolução elevada uma deleção visível num cromossoma 13 desde 13q14.1 a 13q14.3. O cromossoma 13 restante parecia normal.

Consistente com estas observações, as intensidades dos fragmentos de restrição Rb indicaram a presença de apenas uma cópia simples de um locus Rb aparentemente intacto nos fibroblastos, calha 3 em ambas as figuras 3A e 3B. Estudos de RFLP utilizando sondas de cromossoma 13 acima e abaixo da região 13q14.1 demonstraram que ambos os cromossomas 13 estavam presentes no tumor. Contudo, faltavam ambos os alelos do locus Rb, fig. 3A e 3B, calha 2. Assim, neste paciente, a primeira e segunda mutação envolveu a deleção de um dos alelos Rb.

Conforme se esperava, não puderam detectar-se trans-

crições RB no tumor, fig. 4, calha 4.

O LA-RB165, representa um exemplo de uma deleção parcial. Este tumor foi obtido a partir de um paciente com doença unilateral. Conforme se apresenta na fig. 3B, calha 4, faltam os fragmentos Hind III de 9,8 Kb, 6,2 Kb e 2,1 Kb. As intensidades dos fragmentos Rb restantes indicam a existência de uma cópia apenas do locus Rb aberrante. Assim, neste tumor um alelo do gene Rb foi totalmente delectado e o outro possui uma deleção na extremidade 3'. Conforme se pode observar nas figs. 3A e B, calha 5, estão presentes nos fibroblastos duas cópias de locus Rb aparentemente intactos. Isto implica a ocorrência de dois fenômenos mutacionais diferentes nas células somáticas (isto é, o retinoblasto alvo), um resultado que é consistente com a condição unilateral (não hereditária) deste paciente com retinoblastoma. Não se detectou neste tumor transcrição Rb, fig. 4, calha 5.

Embora a correlação entre as grandes deleções estruturais e a inativação do gene de Rb seja consistente com a transferência do gene de Rb para esta região, a deleção total homozigótica ou deleções comuns 3' não excluem a possibilidade do gene Rb estar a juzante desta região. A prova definitiva da autenticidade do gene de Rb será quer a existência de uma deleção 5' quer deleção interna homozogótica noutros tumores. Descobriu-se que dois retinoblastomas e um osteossarcoma possuíam tais deleções.

O primeiro exemplo, tumor LA-RB74 proveio de um paciente com retinoblastoma bilateral. Conforme se demonstra na fig. 3B, calha 6, falta o fragmento de restrição Hind III de 7,5 Kb. Pode detectar-se uma cópia de uma nova faixa de 4,1 Kb. Neste

tumor, reduziu-se em tamanho o Rb transcrito para 4,4 Kb, o que é consistente com a deleção de uma exão presente no fragmento Hind III de 7,5 Kb, em falta, Fig. 4, calha 6. O padrão de restrição dos fibroblastos do mesmo paciente apresenta-se na fig. 3B, calha 7. A presença de uma cópia de cada um dos fragmentos Hind III, normal de 7,5 Kb e aberrante de 4,1 Kb indica que este paciente possui uma deleção na linha germinativa nesta região.

Um segundo exemplo de deleção interna homozigótica, observa-se no tumor LA-RB151, também obtido a partir de um paciente com retinoblastoma bilateral. Estudos de RFLP demonstraram que ambas as sondas de cromossoma 13, acima e abaixo do locus de Rb, eram heterozigotas nos fibroblastos e tornavam-se homozigotas nas células de tumor. No tumor faltavam ambas as cópias do Hind III de 9,8 Kb e estavam presentes duas cópias de um novo fragmento Hind III de 8,0 Kb, fig. 3B, calha 8. Da observação da intensidade do fragmento Hind III de 9,8 Kb nos fibroblastos, fig. 3B, calha 9, conclui-se que apenas estava presente nos fibroblastos uma única cópia do fragmento Hind III de 9,8 Kb.

Descobriu-se no osteossarcoma, OHS, um terceiro exemplo de deleção interna homozigótica. Obteve-se este tumor a partir de um paciente com uma história antecedente de retinoblastoma. Como se pode observar na fig. 3B, calha 10, falta o fragmento Hind III de 7,5 Kb. A pequena quantidade de hibridação antecedente com o fragmento de 7,5 Kb surge, presumivelmente, a partir de um pequeno número de células normais que se contaminam.

De modo interessante, enquanto que OHS e LA-RB74 pos-

suem ambos uma deleção do fragmento Hind III de 7,5 Kb e transcrições truncadas, a transcrição do gene de Rb no OHS reduziu-se para 3,9 Kb, Fig. 4, calha 7, o qual é mais pequeno do que a do LA-RB74, fig. 4, calha 6.

O tumor LA-RB125 é de um paciente com retinoblastoma unilateral esporádico. Conforme se apresenta na fig. 3B, calha 12, apenas se encontra presente uma única cópia do fragmento Hind III de 7,5 Kb, em contraste com as duas cópias da parte restante do gene de Rb. Aparentemente, um dos alelos de Rb contém uma deleção interna na região 7,5 Kb.

O LA-RB99 é de um caso de retinoblastoma unilateral no qual pode detectar-se num dos alelos das Rb uma deleção interna envolvendo o fragmento Hind III de 9,8 Kb, fig. 3B, calha 21. No seu lugar gerou-se um novo fragmento de 7,5 Kb. Podem detectar-se no tumor duas transcrições de dimensões diferentes uma de 7,0 Kb e uma com e dimensão normal de 4,7 Kb, fig. 4, calha 20. Em ambos estes casos, podia detectar-se uma anormalidade em apenas um dos cromossomas 13. Nas calhas 13, 14 e 15 das figs. 3A e 3B apresentam-se três tumores com perda total de um dos alelos Rb. O LA-RB112, calha 13 era de um paciente com doença esporádica unilateral, LA-RB157, calha 14, era de um caso bilateral e OSV, calha 15 é um osteossarcoma de um paciente sem história de retinoblastoma conhecida. Em todos estes casos apenas se conservou um único locus Rb aparentemente normal. Em LA-RB157, fig. 4, calha 9 pode detectar-se pouca ou nenhuma transcrição Rb. Contudo, com OSV, pode detectar-se uma mensagem truncada de 4,2 Kb, fig. 4, calha 10.

A presença de uma extensão de uma região rica em GC na extremidade 5' do cADN complica a análise do locus genómico.

4.

Se se estabelecer que o fragmento Hind III de 14,5 Kb, fig. 2B, contém a primeira exão do gene de Rb, então diversos dos casos de retinoblastoma possuem deleções na extremidade 5'. Contudo, se existisse ainda uma outra pequena exão em frente do fragmento Hind III de 14,5 Kb, então, estes casos representariam exemplos adicionais de deleções internas.

Aproximadamente 60% dos quarenta retinoblastomas não apresentam modificações estruturais aparentes no gene de Rb. Entre estes grupos de tumores observaram-se diversas anormalidades na expressão da transcrição de Rb. Por exemplo, nenhum dos cinco tumores seguintes exprimem uma cópia de Rb: retinoblastomas bilaterais LA-RB73, fig. 4, calha 8; LA-RB69A, fig. 4, calha 14; e o LA-RB133, fig. 4, calha 16; são todos homozigotos para o cromossoma 13; o tumor bilateral LA-RB110, fig. 4, calha 17, que é heterozigoto para as sondas polimórficas do cromossoma 13 ambos acima e abaixo do locus de Rb; e o tumor unilateral LA-RB160, fig. 4, calha 18, que se torna homozigoto para uma sonda do cromossoma 13, 7D2, que também se localiza na região cromossômica 13q14.

Também se detectaram transcrições anormais noutros casos. Por exemplo, no caso unilateral, LA-RB94 que é homozigoto para o cromossoma 13, não apresentar grandes modificações estruturais, fig. 3A e 3B, calha 16 mas possui uma pequena quantidade de uma transcrição de Rb aparentemente maior, fig. 4, calha 11. Isto deve-se, presumivelmente, à excisão de uma junção de tal modo que foi incluída uma pequena intrão no final da transcrição. LA-RB70, que também não possui modificação aparente no locus de ADN de Rb, figs. 3A e 3B, calha 17, possui uma quantidade reduzida de uma transcrição de Rb de tamanho normal,

fig. 4, calha 12. Finalmente o Y79, a linha de células de retinoblastoma mais comumente utilizada até agora, apresentou de forma consistente, uma quantidade reduzida de uma transcrição truncada de Rb de 4,2 Kb, fig. 4B, calha 13, apesar de não se terem observado modificações significativas com as presentes sondas, figs. 3A e 3B, calha 18. Presumivelmente, ocorreu no locus de Rb uma deleção ainda não detectada.

Também se observou uma deleção interna homozigótica e uma transcrição de Rb truncada no osteossarcoma de um paciente com história anterior de retinoblastoma. Estes dados são consistentes com o postulado de que o gene de Rb é responsável pelo desenvolvimento quer de retinoblastoma quer de osteossarcoma. A observação de que a maioria dos tumores não expressa o gene de Rb ao nível do ARN, proporciona um forte suporte para a natureza recessiva do gene de Rb para o contencioso de que é a perda de função de ambos os alelos de Rb que é responsável pelo desenvolvimento do tumor.

Em todos os casos de deleção interna examinados, as deleções envolveram sempre quer o fragmento Hind III de 7,5 Kb quer o fragmento Hind III de 9,8 Kb. Também se descobriu que uma cópia do fragmento Hind III de 7,5 Kb estava alterada nos fibroblastos RB120F, fig. 3B, calha 22. Esta linha celular de fibroblastos era de um paciente com retinoblastoma bilateral no qual ocorreu uma translocação equilibrada envolvendo as regiões cromossômicas 13q14 e 10q22.

Em seu lugar detectou-se uma nova banda de 6,5 Kb.

Se estas regiões do locus do gene de Rb contiverem estruturas peculiares que as possam predispor para deleção ou translocação continuam para serem observadas.

4.

Estes dados, LA-RB128B, LA-RB74, e LA-RB151 também proporcionam a verificação da hipótese de dois alvos alternativos de Kn-dson. Nos casos bilaterais detectou-se facilmente nos fibroblastos a mutação do locus Rb que representa o primeiro alvo, fig. 3B, calha 3, 7 e 9, e, o segundo alvo detecta-se no tumor, fig. 3B, calhas 2, 6 e 8. No caso unilateral, LA-RB165, os dois fenômenos mutacionais, deleção 3' ou deleção total, apenas se verificaram no tumor, fig. 3B, calha 4 e não nos fibroblastos, fig. 3B, calha 5.

EXEMPLO 2

Observou-se que o gene de retinoblastoma é inativado de forma idêntica nalguns tumores da mama, melanoma humano, carcinoma de células pequenas do pulmão, sarcoma e fibrossarcoma de tecido mole. Estas observações proporcionam a base para a detecção de defeitos do gene de retinoblastoma nas células destes pacientes. As linhas de células de carcinoma de mama humana que se utilizaram foram obtidas a partir da American Type Culture Collection. As técnicas empregues foram as previamente descritas para os retinoblastomas.

O locus de Rb genômico, fig. 5, representa-se como exões que contêm fragmentos de restrição Hind III e Sal I. Os clones de cADN dividem-se em duas porções para a síntese de sondas. A figura 6 apresenta a análise da mancha Southern do ADN genômico digerido por Hind III de onze tumores da mama humana. Como se pode verificar, cinco destes tumores, A, C, E, G e K, apresentam aberrações estruturais nesta região.

A figura 7 apresenta a análise de manchas de Southern

de ADN genômico digerido por Hind III de dezasseis linhas de células de tumor da mama humana, incluindo as onze amostras que se apresentam na figura 6, e uma linha de células de fibrossarcoma, calha 0.

Conforme se pode verificar a partir da figura 7, podem observar-se aberrações estruturais. Para além disso, uma linha de células de tumor da mama humana, calha A, e uma linha de células de fibrossarcoma, calha 0, apresentaram ambas, aberrações estruturais nesta porção do locus do gene de Rb.

Na figura 8 apresenta-se um resumo das modificações estruturais. Os fragmentos Hind III que contêm a exão apresentam-se na parte superior da figura enquanto que as modificações estruturais se apresentam na parte inferior. As deleções internas na região do fragmento Hind III de 7,5 Kb observam-se facilmente em diversas amostras.

Além da deleção interna nesta região, também se observaram outros tipos de modificações incluindo a deleção homozigótica interna, deleção 3', amplificação ou combinação destes. Estas aberrações estruturais nos tumores da mama humana apresentam uma semelhança surpreendente às que se descobriram no retinoblastoma. Utilizando a análise da mancha de Southern, nove dos dezanove tumores da mama humana, um melanoma humano, SK-Mel-5 da linha celular da ATCC, dois osteossarcomas e um fibrossarcoma apresentaram aberrações estruturais. A percentagem de linhas celulares de tumor da mama com alterações estruturais é, contudo, semelhante à do retinoblastoma.

EXEMPLO 3

Efectua-se o diagnóstico no tumor e/ou nas células constitutivas. Sempre que se encontre disponível material de tumor, testa-se, em primeiro lugar, quanto aos defeitos estruturais no gene de Rb segundo qualquer uma ou todas as técnicas aqui descritas.

Uma vez identificada a mutação, centralizam-se os esforços de diagnóstico na região que sofreu a mutação e aplicam-se nas células constitutivas. Por exemplo, ambas as cópias dos fragmentos de ADN de 7,5 Kb Hind III faltam no ADN do tumor LA-RB74. Este defeito estrutural é adquirido de modo hereditário pela célula constitucional do paciente devido ao facto de faltar nestas células uma cópia do fragmento Hind III de 7,5 Kb. Por conseguinte, para a diagnose da predisposição para o desenvolvimento de retinoblastoma e doenças que lhe estão associadas na vizinhança imediata da sonda, centralizar-se-ão os esforços na detecção da presença ou ausência do fragmento Hind III de ADN com 7,5 Kb.

Na ausência de material de tumor, a detecção de aberração estrutural de Rb efectua-se nas células constitutivas. Para além disso, quando existe uma história familiar de retinoblastoma e/ou osteossarcoma, pesquisa-se a hereditariedade dos alelos polimórficos de Rb e compara-se com a incidência Rb na família.

O facto de se poderem detectar facilmente as alterações estruturais no locus de Rb, com o novo clone de cADN, em aproximadamente 40% dos retinoblastomas bem como nos fibroblastos de alguns pacientes bilaterais, torna esta sonda bastante útil na diagnose pré-natal.

O especialista reconhecerá facilmente que na medida em que se analisa o locus genômico completo e mais sondas e metodologias se tornam disponíveis, poderão detectar-se, consideravelmente, mais anormalidades.

A sonda de cADN será de utilidade imediata no diagnóstico pré-natal em famílias que possuam uma parente com uma anormalidade estrutural detectável do gene de Rb tais como os indivíduos a partir dos quais se obtiveram os tumores LA-RB74, LA-RB151 e LA-RB128B ou a linha de fibroblastos RB120 F. Se se descobrirem alterações idênticas nas células do feto, isto indicará que o feto herdou o gene de susceptibilidade ao retinoblastoma. Tal como feto desenvolverá, quase certamente, retinoblastoma e estará sobre alto risco de contrair outras doenças malignas nos últimos anos, se a gravidez chegar ao termo.

A sonda de cADN também pode permitir a identificação de alguns dos indivíduos, estimulados em 15%, que possuem Rb esporádico unilateral que, infelizmente, possuem a forma hereditária da doença.

Também é certo que o gene de Rb desempenha uma função no desenvolvimento dos tumores referidos antes. A utilização do clone de cADN do gene de Rb para detecção dos defeitos do gene pode, por conseguinte, ser aplicada a outras doenças malignas, incluindo os tumores da mama humana, melanomas humanos, osteossarcoma, fibrossarcoma, sarcoma de tecido mole e carcinoma de células pequenas do pulmão.

O especialista verificará facilmente que a presente invenção se encontra devidamente adaptada para atingir o objetivo e obter as finalidades e vantagens mencionadas, bem como

as que lhe são inerentes. Pretende-se que os métodos, procedimentos e técnicas aqui descritos que representam, presentemente, os aspectos preferenciais sejam tomados como exemplos e não limitem o âmbito da presente invenção.

As alterações e outras utilizações que possam ocorrer ao especialista e que estejam contidas no espírito da presente invenção, definem-se no âmbito das reivindicações que se seguem.

4.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a detecção da predisposição para desenvolver retinoblastoma, caracterizado pelo facto:

de se hibridar uma sonda de gene de retinoblastoma ao DNA extraído de um tecido em estudo; e

de se determinar a ligação da sonda ao referido DNA.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sonda de retinoblastoma ser marcada.

3.- Processo para a detecção de tumores que contêm um defeito dos genes de retinoblastoma, caracterizado pelo facto:

de se hibridizar uma sonda de genes de retinoblastoma ao DNA extraído de um tecido em estudo; e

de se determinar a ligação da sonda ao referido DNA.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os referidos tumores serem seleccionados do grupo que consiste em retinoblastoma, osteo-sarcoma, fibro-sarcoma, sarcoma de tecidos moles, melanoma, carcinoma de células pequenas do pulmão e carcinoma da mama.

4.

5.- Processo para a detecção de DNA cromossómico que codifica para pelo menos uma porção do gene de retinoblastoma humano, caracterizado pelo facto:

de se tratar o DNA cromossómico total sob condições de desnaturação para se obter DNA de cadeia simples;

de se fazer contactar o DNA de cadeia simples assim obtido com uma sonda de gene de retinoblastoma; e

de se identificar a sonda-DNA hibridizada assim obtida para detectar DNA cromossómico que contém pelo menos uma porção do gene de retinoblastoma humano.

6.- Conjunto de diagnóstico para a detecção da predisposição para retinoblastoma, caracterizado por incluir:

pelo menos uma sonda de cDNA específica para o gene de retinoblastoma, em que a referida sonda de cDNA é eficaz quando hibridizada com DNA de uma célula em estudo para indicar a presença ou ausência do gene retinoblastoma.

7.- Conjunto de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se incluir, adicionalmente, pelo menos uma amostra de controlo.

8.- Processo para a preparação de uma sonda de cDNA específica para o gene de retinoblastoma de até cerca de 4,6 kb, caracterizado pelo facto de compreender a fase que con

4.

siste em hibridizar uma sonda específica para mRNA obtida a partir de linhas de células imortalizadas de fetos humanos.

9.- Processo para a preparação de uma sonda de cDNA específica para o gene de retinoblastoma de até cerca de 0,9 kb, caracterizado pelo facto de compreender as fases que consistem em hibridizar uma sonda específica para mRNA obtida a partir de uma linha de células imortalizadas de fetos humanos e em cindir o cDNA hibridizado para a referida sonda com uma enzima de restrição.

10.- Processo para a preparação de uma sonda de cDNA específica para o gene de retinoblastoma de até cerca de 3,8 kb, caracterizado pelo facto de compreender as fases que consistem em hibridizar uma sonda específica para mRNA obtida a partir de uma linha de células imortalizadas de fetos humanos e em cindir o cDNA hibridizado para a referida sonda com uma enzima de restrição.

11.- Processo para a detecção de um gene de retinoblastoma, caracterizado pelo facto:

de se hibridizar fragmentos, derivados, ou a sequência de cDNA de fórmula:

...

5'

10	20	30	40
CCCCCAGAAA	ACGGCCGCGCA	CCGCGCGCGCG	TGCGCGCGCGG
50	60	70	80
GAACCCCGCGG	CACCGCGCGCC	GCCGCGCGCCT	CCTGAGGAGA
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
250	260	270	280
TGGAGTATTG	GGAGGTTATA	TTCAAAAGAA	AAAGGAACTG
290	300	310	320
TGGGGAATCT	GTATCTTTAT	TGCAGCAGTT	GACCTAGATG
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
490	500	510	520
GGAAAGGACA	TGTGAACTTA	TATATTTGAC	ACAACCCAGC
530	540	550	560
AGTTCGATAT	CTACTGAAAT	AAATTCTGCA	TTGGTGCTAA
570	580	590	600
AAGTTTCTTG	GATCACTTTT	TTATTAGCTA	AAGGGGAAGT
610	620	630	640
ATTACAAATG	GAAGATGATC	TGGTGATTTC	ATTTAGTTTA
650	660	670	680
ATGCTATGTG	TCCTTGACTA	TTTTATTAAA	CTCTCACCTC
690	700	710	720
CCATGTTGCT	CACCCAGGCG	TATAAACAG	CTGTTATACC
730	740	750	760
CATTAATGGT	TCACCTCGAA	AACCCAGHC	GGGTCAGAAC
770	780	790	800
AGGAGTGCAC	GGATAGCAAA	ACAACTAGAA	AATGATACA
810	820	830	840
GAATTATTGA	AATTCTCTGT	AAAGAACATG	AATGTAATAT
850	860	870	880
AGATGAGGTG	AAAAATGTTT	ATTTCAAAAA	TTTTATACCT
890	900	910	920
TTTATGAATT	CTCTTGGAAT	TGTAAACATCT	AATGGACTTC
930	940	950	960

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

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

TAAAAAGTTG 3050 TAGCAGATTG 3060 TTTCCTCTTC 3070 CAAAGTAAAA 3080
TTGCTGTGCT 3090 TTATGGATAG 3100 TAAGAATGGC 3110 CCTAGAGTGG 3120
GAGTCCTGAT 3130 AACCCAGGCC 3140 TGTCTGACTA 3150 CTTTGCCTTC 3160
TTTTGTAGCA 3170 TATAGGTGAT 3180 GTTTGCTCTT 3190 GTTTTTATTA 3200
ATTTATAIGT 3210 ATATTTTTTT 3220 AATTTAACAT 3230 GAACACCCTT 3240
AGAAAATGTG 3250 TCCTATCTAT 3260 CTTCCAAATG 3270 GAATTTGATT 3280
GACTGCCCAT 3290 TCCCAAAAT 3300 TATCCTGAAC 3310 TCTTCTGCAA 3320
AAATGGATAT 3330 TATTAGAAAT 3340 TAGAAAAAAA 3350 TTACTAATTT 3360
TACACATTAG 3370 ATTTTATTTT 3380 ACTATTGGAA 3390 TCTGATATAC 3400
TGTGTGCTTG 3410 TTTTATAAAA 3420 TTTTGCTTTT 3430 AATTAAATAA 3440
AAGCTGGAAG 3450 CAAAGTATAA 3460 CCATATGATA 3470 CTATCATACT 3480
ACTGAAACAG 3490 ATTTCATACC 3500 TCAGAATGTA 3510 AAAGAACTTA 3520
CTGATTATTT 3530 TCTTCATCCA 3540 ACTTATGTTT 3550 TTAAATGAGG 3560
ATTATTGATA 3570 GTACTCTTGG 3580 TTTTATAACC 3590 ATTCAGATCA 3600
CTGAATTTAT 3610 AAAGTACCCA 3620 TCTAGTACTT 3630 GAAAAAGTAA 3640
AGTGTTCCTGC 3650 CAGATCTTAG 3660 GTATAGAGGA 3670 CCCTAACACA 3680
GTATATCCCA 3690 AGTGCACCTT 3700 CTAATGTTTC 3710 TGGGTCCTGA 3720
AGAATTAAGA 3730 TACAAATTAA 3740 TTTTACTCCA 3750 TAAACAGACT 3760
GTTAATTATA 3770 GGAGCCTTAA 3780 TTTTTTTTTC 3790 ATAGAGATTT 3800
GTCTAATTGC 3810 ATCTCAAAAT 3820 TATTCTGCCC 3830 TCCTTAATTT 3840
GGGAAGGTTT 3850 GTGTTTTCTC 3860 TGGAATGGTA 3870 CATGTCTTCC 3880
ATGTATCTTT 3890 TGAACGGCA 3900 ATTGTCTATT 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
CAAAAGCTTC 4050 AAATTAAAC 4060 AGCTGCATTA 4070 GAAAAAGAGG 4080

4

CGCTTCTCCC	CTCCCCCTACA	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
TAAGTTTCAA	ACTTACTATT	TTGACAGTTA	TTTTGATAAC
4290	4300	4310	4320
AATGACACTA	GAAAACTTGA	CTCCATTCCA	TCATTGTTTC
4330	4340	4350	4360
TGCATGAATA	TCATACAAAT	CAGTTAGTTT	TTAGGTCAAG
4370	4380	4390	4400
GCCTTACTAT	TTCTGGGTCT	TTTGCTACTA	AGTTCACATT
4410	4420	4430	4440
AGAATTAGTG	CCAGAATTTT	AGGAACCTCA	GAGATCGTGT
4450	4460	4470	4480
ATTGAGATTT	CTTAAATAAT	GCTTCAGATA	TTATTGCTTT
4490	4500	4510	4520
ATTGCTTTTT	TGTATTGGTT	AAAACCTGTAC	ATTTAAAATT
4530	4540	4550	4560
GCTATGTTAC	TATTTTCTAC	AATTAATAGT	TTGTCTATTT
4570	4580		
TAAAATAAAT	TAGTTGTTAG		

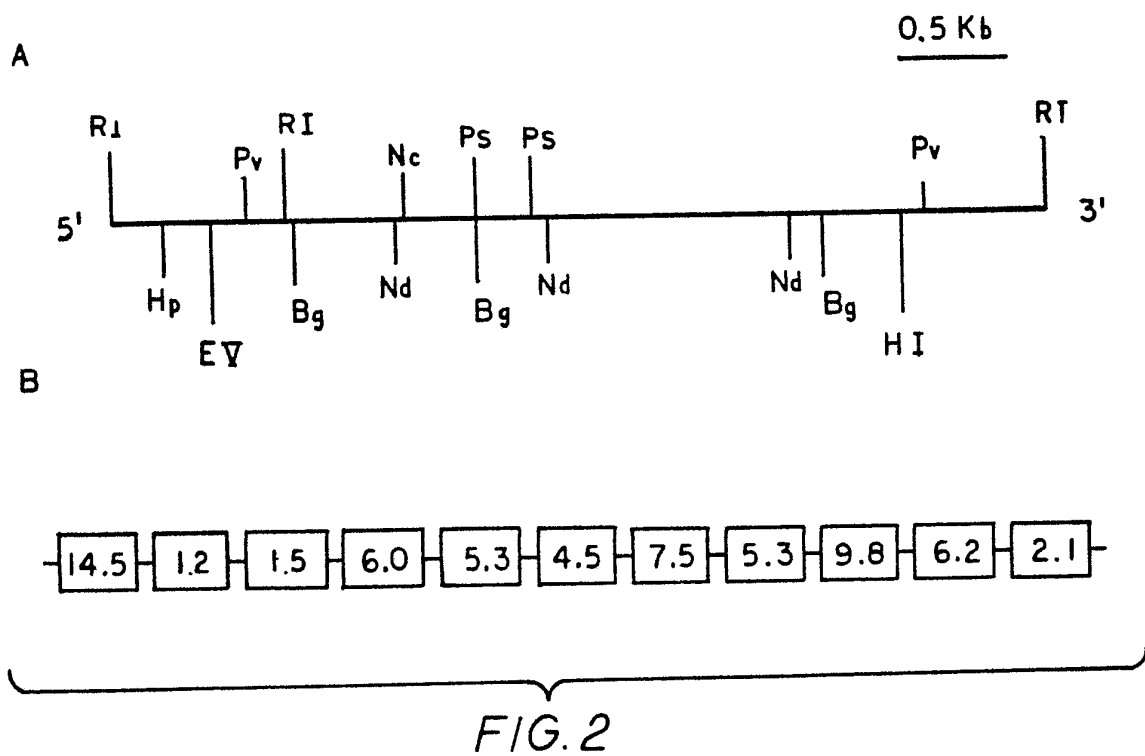
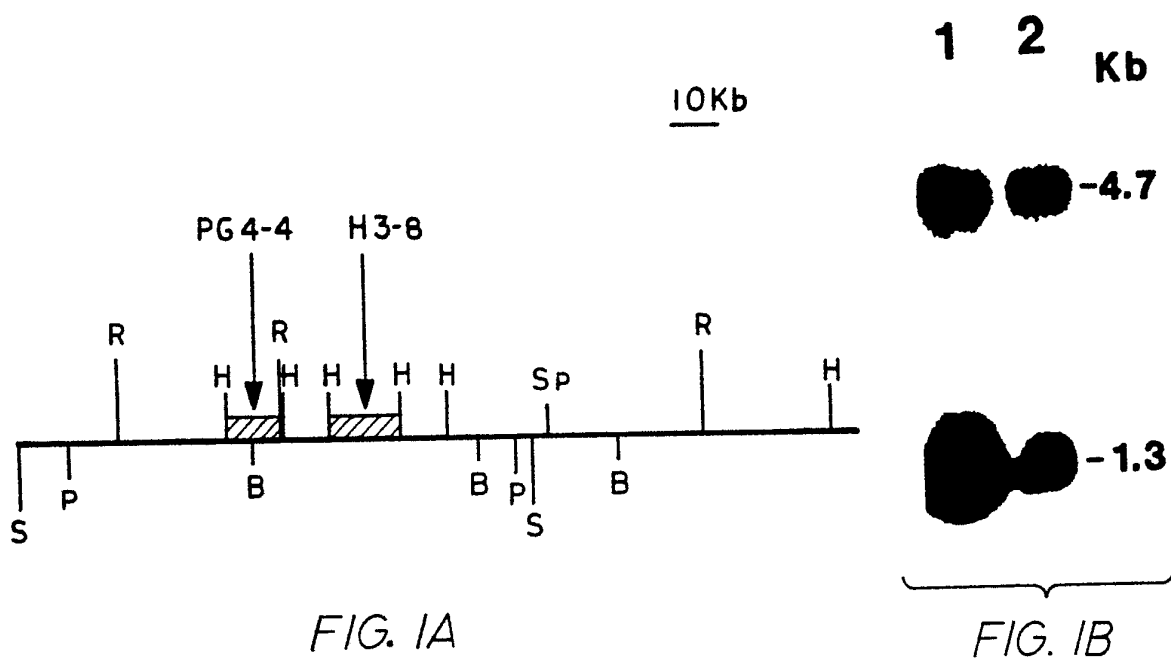
e fragmentos e seus derivados, codificando os referidos fragmentos para pelo menos uma parte de um exão do gene de retinoblastoma, no DNA extraído do tecido em estudo; e

de se detectar a hibridação.

12.- Processo para a determinação da terapia para tumores, caracterizado pelo facto de se hibridizar uma sonda de gene de retinoblastoma no DNA extraído do referido tumor; e de se determinar a ligação da sonda ao referido DNA, em que a terapia está dependente da presença ou ausência no tumor do gene de retinoblastoma.

Regulador

4.



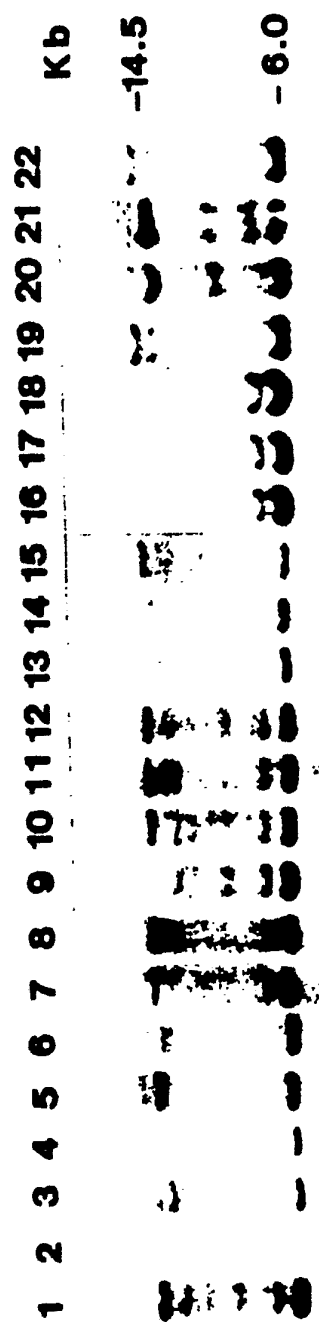


FIG. 3A

Y.

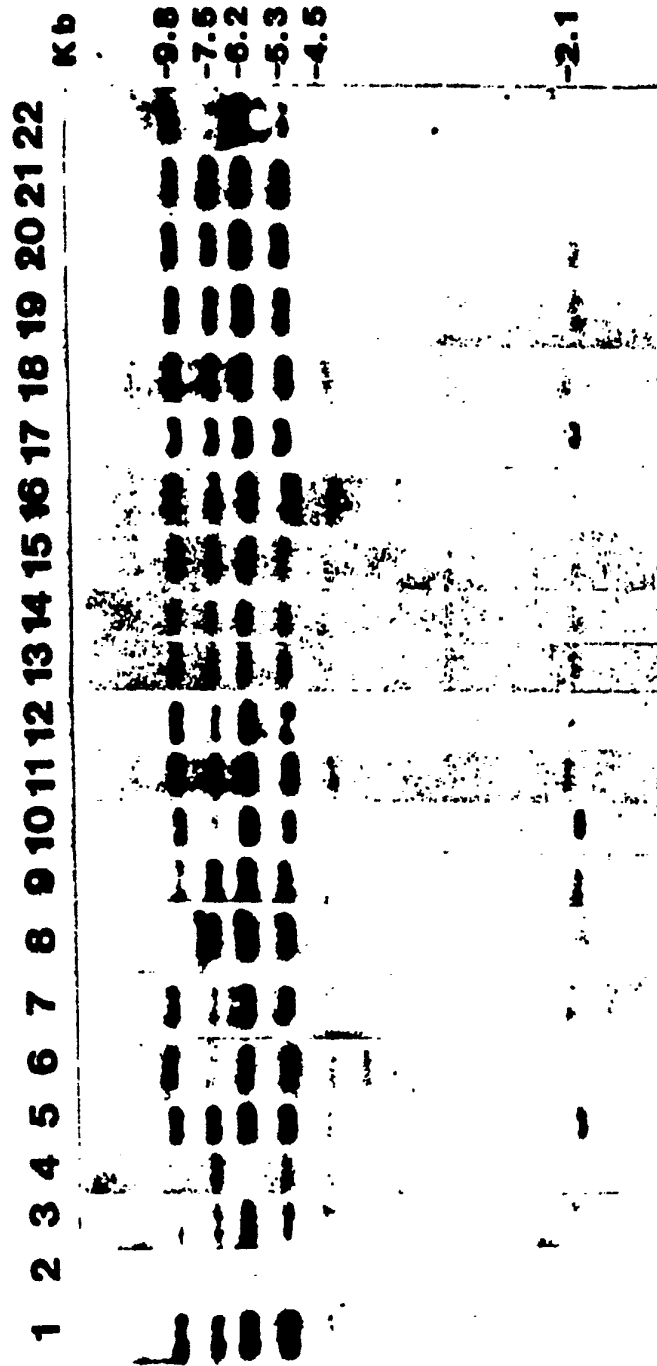


FIG. 3B

4.

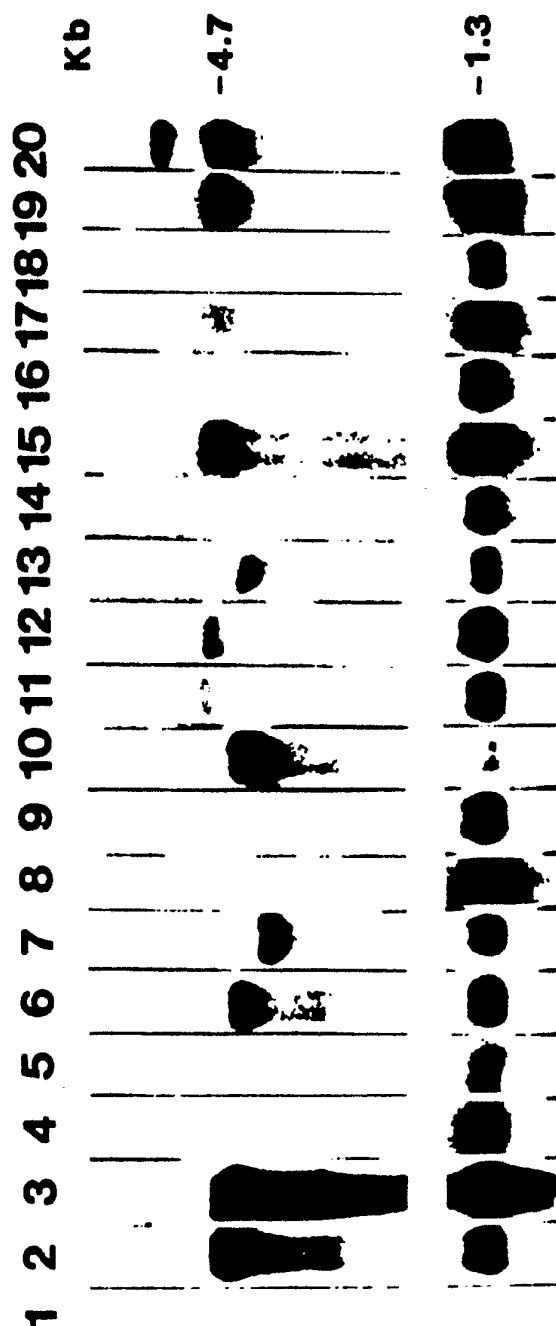


FIG. 4

Y.

7.

5

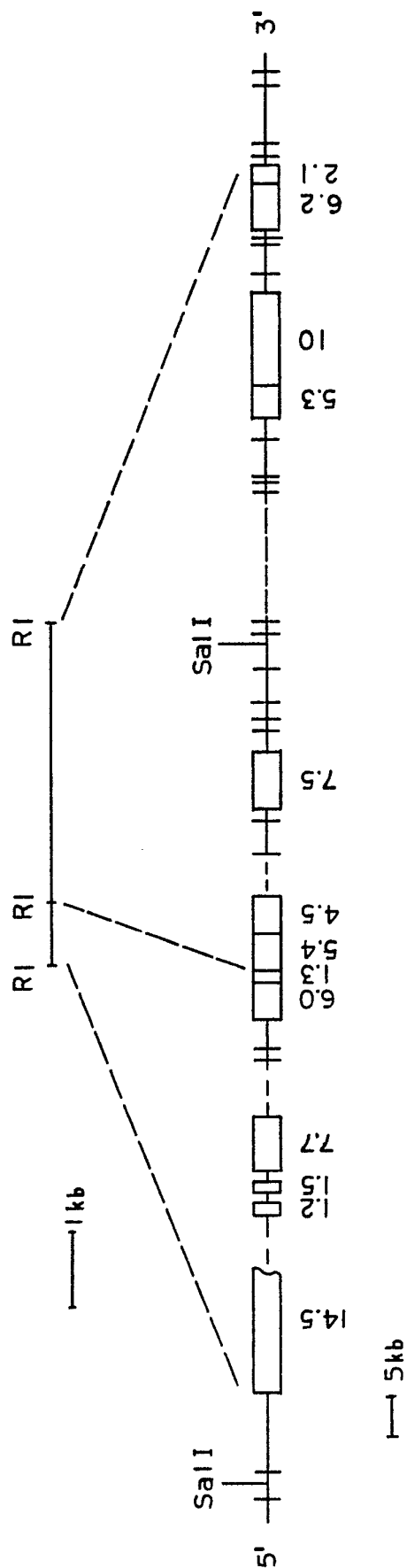
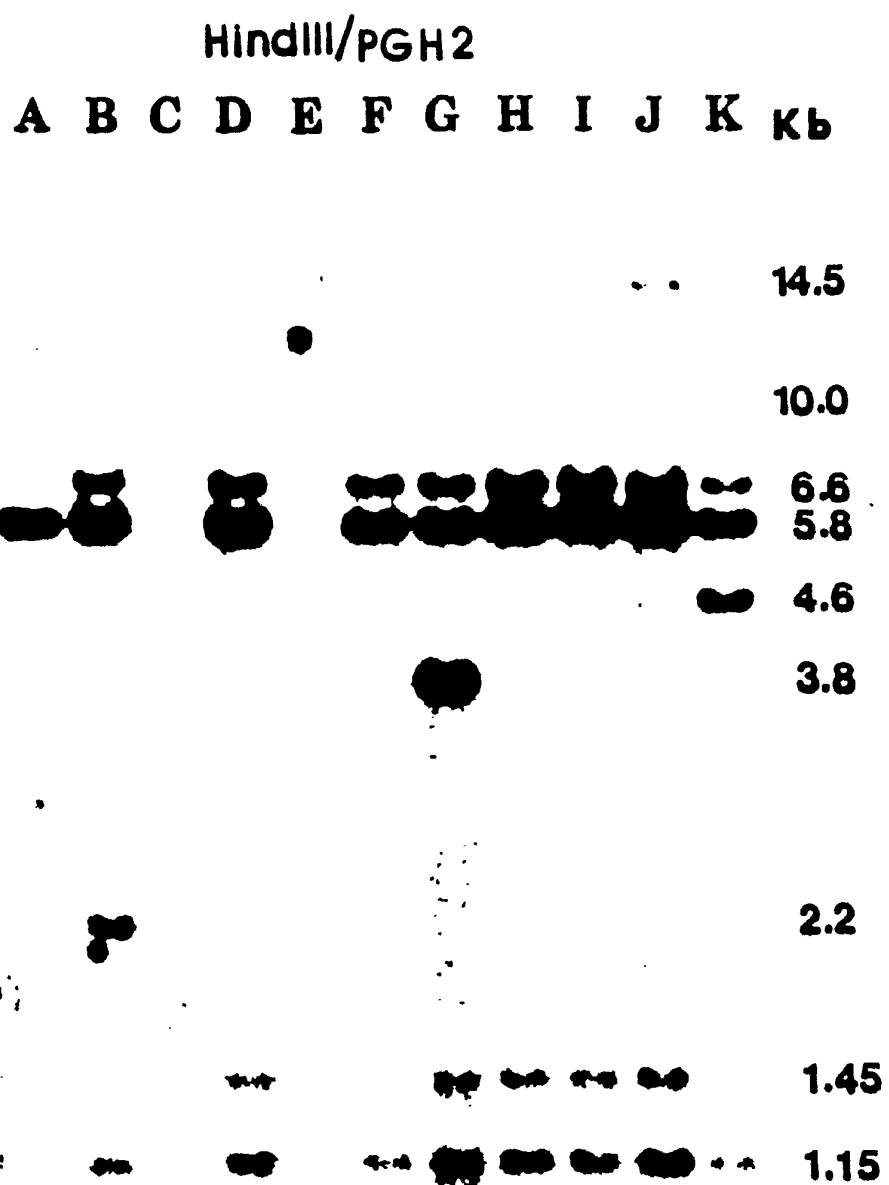


FIG. 5

*FIG. 6*

HindIII/PG3.8

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



2.1

FIG. 7

7

4.

5' — [14.5] — [1.2] — [1.5] — [7.7] — [6.0] — [1.3] — [5.4] — [4.5] — [7.5] — [5.3] — [9.8] — [6.2] — [2.1] — 3'

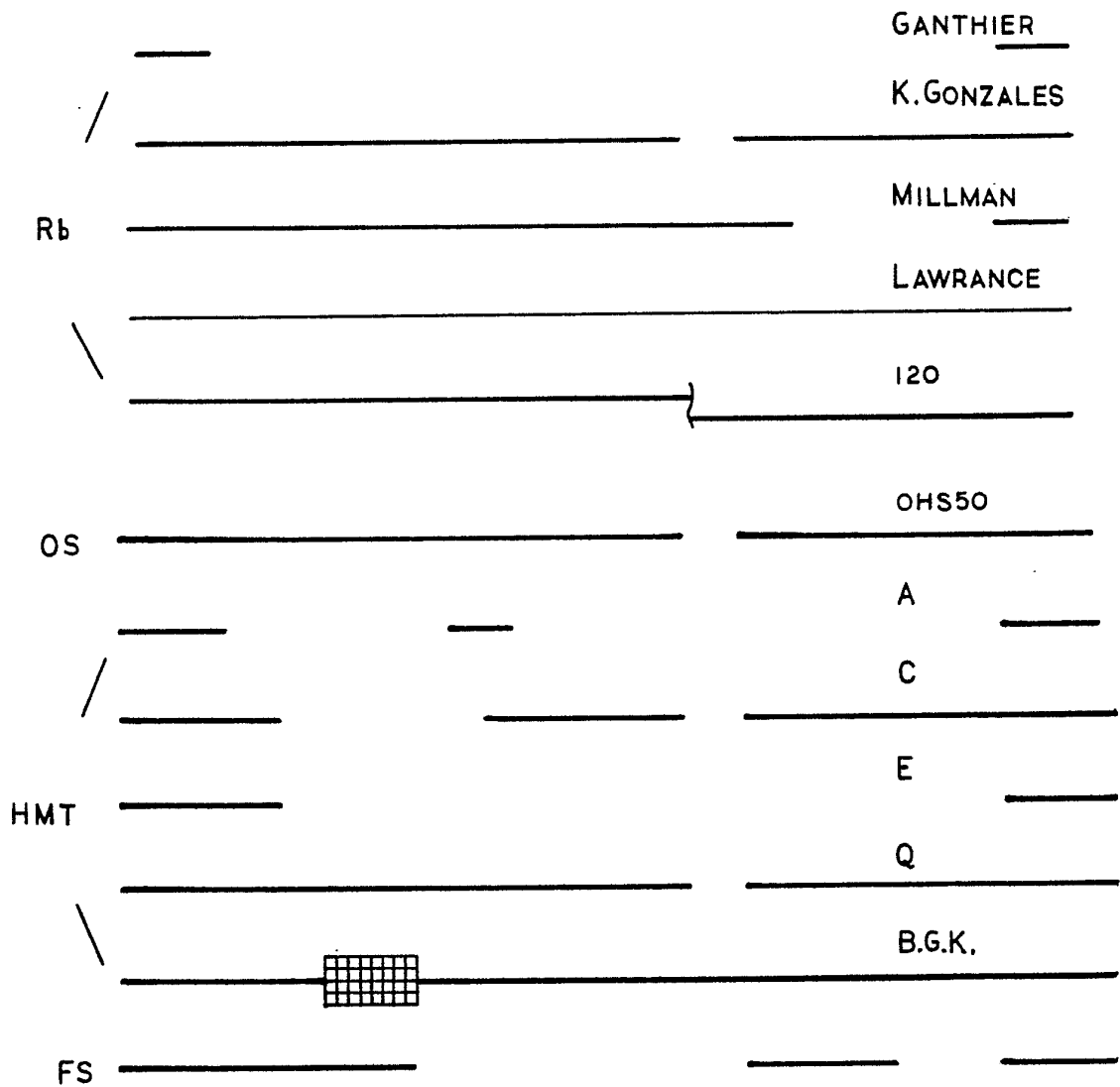


FIG. 8

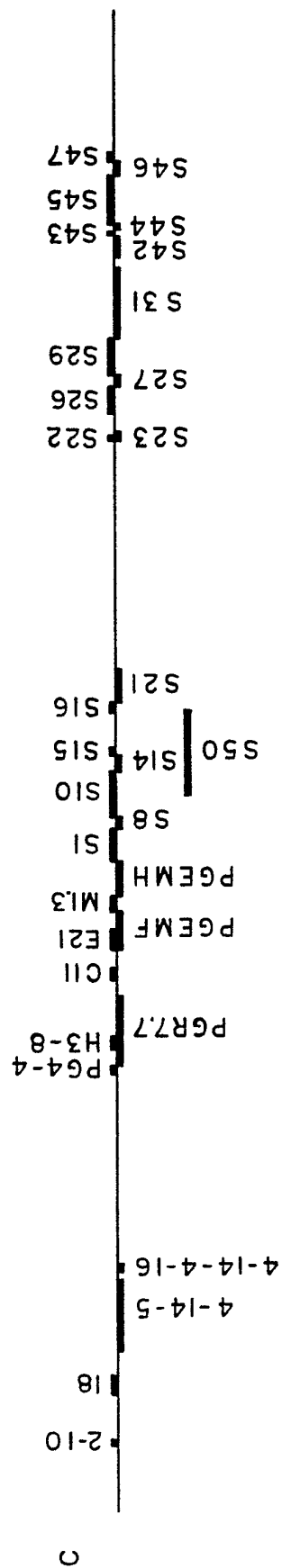
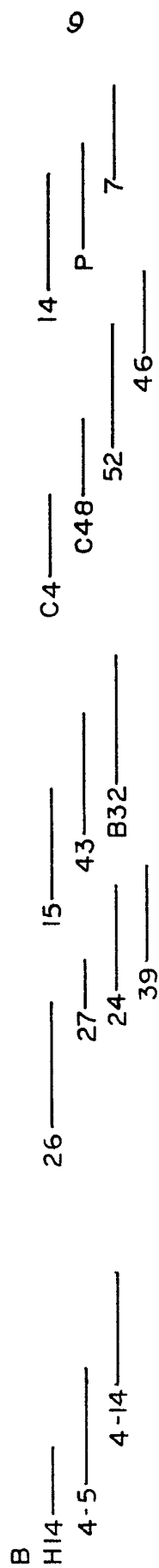
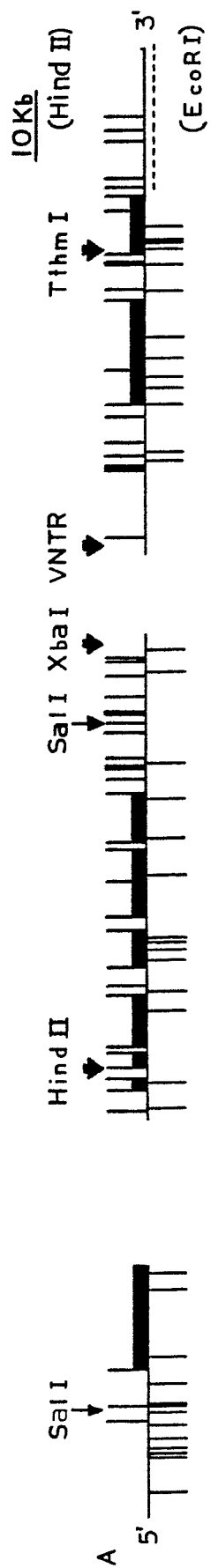


FIG. 9

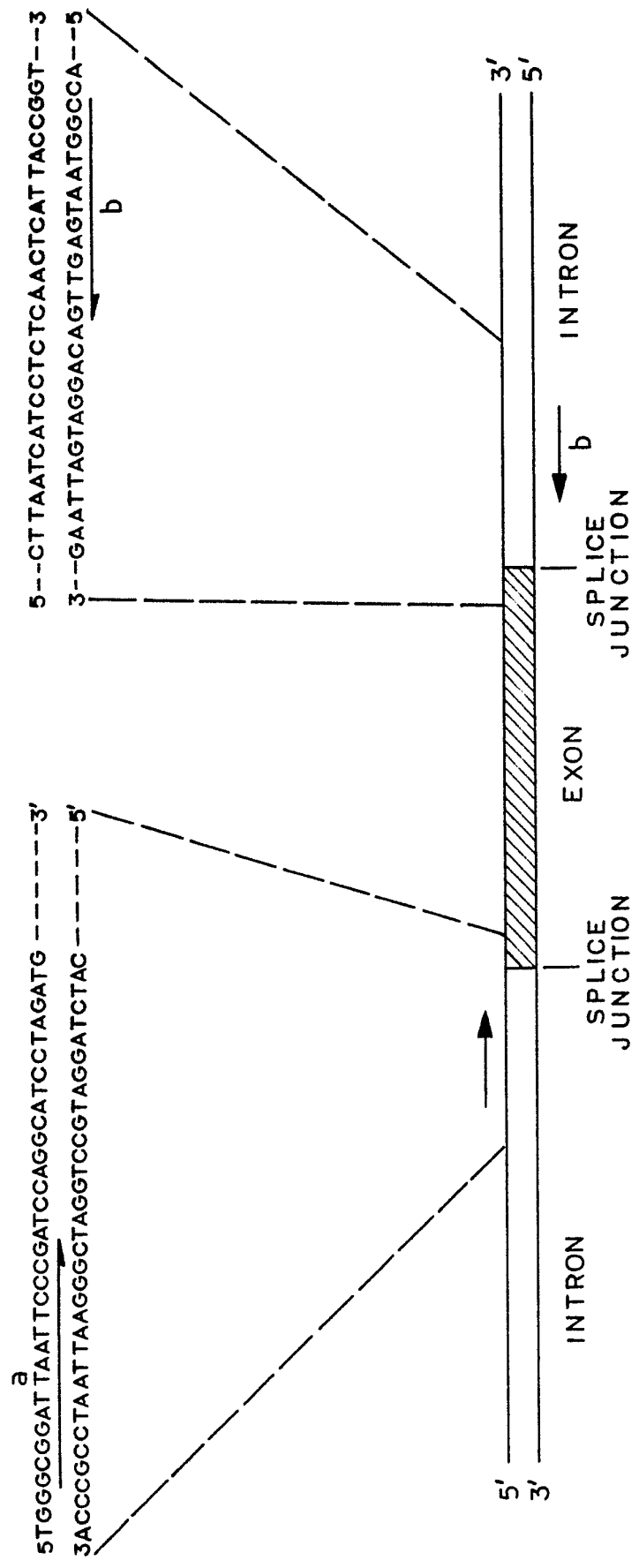


FIG. 10

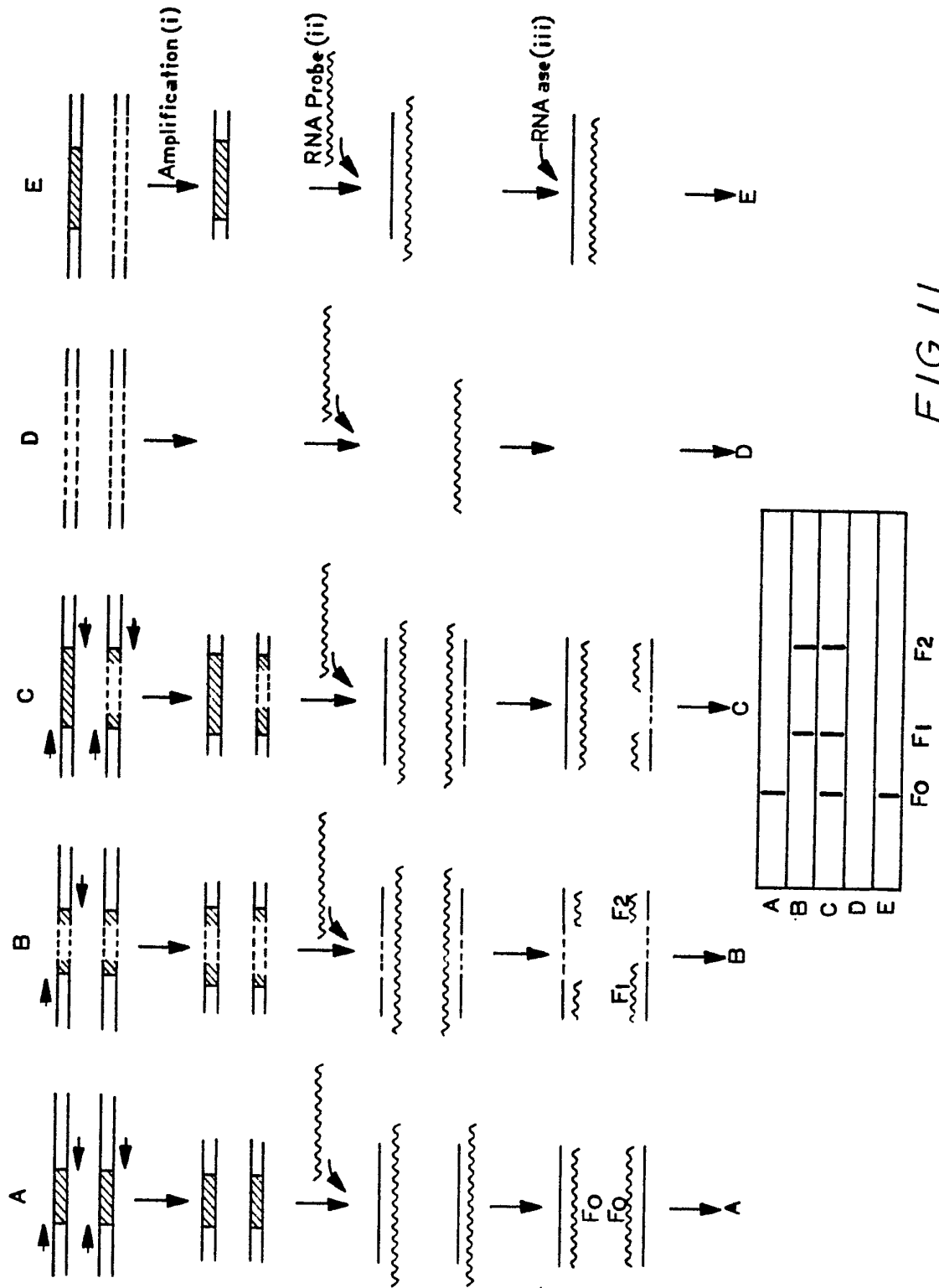


FIG. 11

Handwritten signature or mark.