

# Trabajo Práctico de Laboratorio

## GENETICA

TP n°2: Detección de mutaciones en el proto-oncogen RET, asociado a Neoplasias Endócrinas Múltiples tipo 2A (MEN2A) por PCR/RFLP.

### Introducción

El síndrome de MEN2A es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por el desarrollo de cáncer medular de tiroides, feocromocitoma e hiperplasia de paratiroides. Mutaciones en el proto-oncogen RET se asocian con MEN2A, con una penetrancia cercana al 100%. El gen se encuentra en el cromosoma 10q11.2 y codifica para una proteína transmembrana con función de receptor del tipo tirosina quinasa. Mutaciones que afectan el dominio extracelular de la proteína estimulan la dimerización espontánea del receptor y un aumento de la actividad de tirosina quinasa basal. El codón 634 codifica para una cisteína, y es considerado un sitio *hot-spot* por encontrarse mutado en el 85% de las familias con MEN2A. Estudios realizados por el International RET Mutation Consortium mostraron que, en MEN2A, la mutación más frecuente (52%) es el cambio de una Cisteína por una Arginina en el codón 634 del exón 11 (C634R) del gen RET. La segunda mutación más frecuente (26%) es el cambio de Cisteína por Tirosina (C634Y).

El cambio de bases que producen estas dos mutaciones en MEN2A generan sitios de corte enzimático para dos enzimas de restricción: CfoI y RsaI (Tabla 1).

Mutación	Cambio Nucleotídico	Enzima de Restricción	Sitio completo de la enzima
C634R	TGC =>CGC	CfoI	5' GCGC 3' 3' CGCG 5'
C634Y	TGC=>TAC	Rsa I	5' GTAC 3' 3' CATG 5'

De esta forma, es posible detectar las mutaciones producidas en el proto-oncogen RET, mediante metodología basada en Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).

Esta técnica se basa en la amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR, posteriormente tratado con una enzima de restricción. Dependiendo de la presencia del sitio de corte para la enzima, se generarán fragmentos de ADN de tamaño diferente al fragmento amplificado por PCR.

En este trabajo práctico se amplificará por PCR un fragmento de ADN, que incluye el codón 634 del proto-oncogen RET, en muestras de ADN de pacientes y de ADN control (sano). El fragmento de ADN a amplificar es de 223 pb. Luego, los productos de ADN amplificados se incubarán con una enzima de restricción (RsaI). De no haber mutación (por ejemplo en la muestra control), el fragmento de ADN permanecerá intacto, es decir mantendrá su tamaño

de 223pb. Si el codón 634 se encuentra mutado y la mutación generó un sitio de corte para alguna de las enzimas empleadas se producirá un corte, que generará dos fragmentos de ADN: uno de 170pb y otro de 53pb. Para identificar ADN mutado y no mutado se analizarán los fragmentos obtenidos en geles de poliacrilamida al 10%, durante el Trabajo Práctico n°2.

### Protocolo de PCR/RFLP

#### **PCR**

##### MIX DE PCR

Buffer 10X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg 50mM	1 µl
dNTPs 2,5mM	4 µl
Primer 11F 25 µM	0,5 µl
Primer 11R 25 µM	0,5 µl
Polimerasa Taq	1 µl
Agua csp 44 µl	32 µl

- Rotular tubos eppendorf de 0,5 µl
- Alicuotar 44 µl de PCR Mix a cada tubo.
- Agregar 6 µl de ADN a cada tubo (Control o Paciente).
- Agregar 6 µl H<sub>2</sub>O al tubo de control negativo.
- Colocar los tubos en el termociclador
- Iniciar el programa de MEN2A (nombre del programa: MEN2)

##### PROGRAMA MEN2:

- |                       |             |
|-----------------------|-------------|
| 1) 1 minuto a 95°C    | } 20 Ciclos |
| 2) 30 segundos a 64°C |             |
| 3) 30 segundos a 72°  |             |
| 4) 3 minutos a 72°C   |             |

#### **Corte con enzimas**

##### MIX DE ENZIMA:

Buffer RsaI	1, 5 µl
RsaI	0,5 µl
Agua csp 5 µl	3,5 µl

- Rotular 2 tubos por cada tubo de producto PCR. Poner el mismo nombre que al tubo de PCR, agregando "+RsaI" o "-RsaI" (Ejemplo: el tubo de paciente se llama "P1", rotular 2 tubos: P1+RsaI y P1-RsaI)
- Alicuotar 5 µl de Mix de enzima en el tubo correspondiente
- Agregar 10 µl de producto de PCR a cada tubo
- Incubar las muestras durante 60 minutos a 37°C en el termociclador (NO USAR HEATED LID, ya que la alta temperatura puede inactivar la enzima)
- Guardar los productos de corte a 4°C hasta próximo práctico