

METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA MUTACIJ V MOLEKULARNI ONKOLOGIJI

Damjan Glavač

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Povzetek

Sekveniranje celotnega človeškega genoma in določitev genomske strukture večine od okoli 32000 genov je veliko pripomoglo k boljšemu razumevanju molekularnih osnov mnogih bolezni in pospešilo razvoj novih molekularno genetskih testov. Pri genetskih boleznih, kjer je bolezenski gen znan, je odkritje mutacije najbolj zanesljiva diagnostična metoda in osnovni pogoj za uspešno in učinkovito molekularno diagnostiko. Metode in tehnike za odkrivanje mutacij v bolezenskih genih delimo na raziskovalne in diagnostične. Raziskovalne so bolj zahtevne in bolj splošno uporabne, medtem ko so diagnostične pogostokrat razvite samo za določeno bolezen, določen gen ali skupino genov in omogočajo hitrejšo in natančno diagnostiko. Poleg tradicionalnih tehnik za diagnostiko, kot so citogenetske tehnike in tehnike, ki temeljijo na hibridizaciji DNA s posebnimi označevalci so se razvile nove, katerih osnova je pomnoževanje v verižni reakcija s polimerazo (PCR). To so predvsem analiza konformacij enoverižnih DNK (single stranded conformational polymorphism – SSCP), analiza heterodupleksov (heteroduplex analysis – HA), denaturacijska visokoločljivostna tekočinska kromatografija (DHPLC - Denaturing High Performance Liquid Chromatography) in metodologija TaqMan. Metoda hkratnega pomnoževanje od ligacije odvisnih sond (MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) omogoča odkrivanje odstopanja v številu kopij DNA. V zadnjih letih pa se je razvila predvsem tehnologija DNA mikromrež, ki omogoča hkratno analizo velikega števila genov s pomočjo hibridizacije označenih sond na vnaprej pripravljena analizna mesta na mreži. Najnovejša prizadevanja diagnostike gredo v smeri kombiniranja več tehnologij v enotnem miniaturiziranem sistemu za biološko in klinično analizo v t.i. "laboratoriju na čipu". Nove tehnologije bodo omogočile mnogo hitrejšo in predvsem natančnejšo opredelitev bolezni.

Genetske bolezni

Poznamo približno 6000 genetskih bolezni in okoli 1200 genov za katere so že razvili diagnostične metode odkrivanja mutacij v teh genih. Za molekularno

diagnostiko v onkologiji je še posebno pomembno ugotavljanje napak v približno 100 onkogenih in za tumorje zaviralnih genih. Za ugotavljanje večine mutacij teh genov pa praviloma ne moremo uporabiti samo ene metode ali tehnike. Mutacije, ki jih lahko pričakujemo v teh genih, so praviloma različnih velikostnih redov in zaenkrat ne poznamo ene same univerzalne metode za njihovo odkrivanje (Tabela 1).

Tabela 1 Velikost mutacije v odvisnosti od uporabljene metode za njeno določevanje

Velikost mutacije	Vrsta mutacije	Metoda odkrivanja mutacij
< 1 bp	metilacija (5-metil-C > C)	MLPA, sekveniranje metiliranih citozinov
1 bp	tranzicije, transverzije (A>G, C>T...)	SSCP, DHPLC, sekveniranje
1–10 bp	delecija, insercija, podvajanje	SSCP, DHPLC, sekveniranje
10–10 ² bp	delecije, insercije, inverzije, podvajanje	SSCP, DHPLC, sekveniranje
10 ² –10 ³ bp	celotni ekson(i) ± intron(i)	SSCP, DHPLC, sekveniranje
10 ³ –10 ⁵ bp	celotni gen	MLPA, citogenetske metode
10 ⁶ –10 ⁷ bp	več sosednjih genov	citogenetske metode, Southern
10 ⁷ –10 ⁸ bp	segmenti kromosoma/celotni kromosom	citogenetske metode

Določanje mutacij in polimorfizmov

Mutacija pomeni vsako spremembo v zaporedju nukleotidov DNK, ki se praviloma izraža v bolezenskem fenotipu. Posledica mutacij so različni zapisi DNK pri določenem genu ali aleli. Če se alela homolognega genskega para razlikujeta, pravimo, da gre za heterozigotno stanje, če sta enaka, pa govorimo o homozigotu. Homozigotna stanja so povezana predvsem z genetskimi boleznimi, ki se dedujejo recesivno, heterozigotna stanja pa z boleznimi, ki se dedujejo dominantno. Prve mutacije in polimorfizme so ugotavljali z uporabo restrikcijskih nukleaz. Znanih je več kot 300 restrikcijskih endonukleaz, ki prepoznajo t. i. palindromska zaporedja na dvoverižni DNK in na takem mestu cepijo DNK. Uporabljajo se tudi pri metodi Southernovega prenosa s katerim analiziramo odseke DNK, ki so precej veliki, običajno več kot 1000 baznih parov, zato se metoda v diagnostiki uporablja predvsem za odkrivanje večjih okvar v genomu, tj. večjih delecij, insercij ali duplikacij. Metoda prenosa po Northernu je precej podobna, le da pri njej uporabimo RNK namesto DNK, metoda prenosa Western pa se uporablja za proteine. Metoda verižne reakcije s polimerazo osnovna metoda oz. prva stopnja molekularne diagnostike, saj omogoča pomnoževanje poljubnega odseka DNK, dolgega tudi do več 1000 baznih parov v zadostni množini (do 1 mikrograma), ki je potrebna za nadaljnje diagnostične postopke (na primer reakcijo z restrikcijsko endonukleazo, hibridizacijo, analizo mutacij s SSCP, analizo heterodupleksov ali drugo

metodo, dot-blot analizo ali sekvenčno reakcijo). Analiza konformacij enoverižnih DNK (single stranded conformational polymorphism – SSCP) in analiza heterodupleksov (heteroduplex analysis – HA) sta po pomnoževanju določenege odseka DNK v verižni reakciji s polimerazo med najpogostejšimi tehnikami za odkrivanje napak v bolezenskih genih. Enoverižna DNK se v nedenaturacijski raztopini zvije v specifično sekundarno strukturo, odvisno od njenega zaporedja. Verige DNK, ki se ločijo celo za 1 nukleotid, lahko zavzamejo drugačno konformacijo – trodimenzionalno strukturo enoverižne DNK. Te razlike v strukturi lahko opazimo v različnem potovanju verig – konformacij po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu v primerjavi s kontrolno DNK, brez mutacije. Njeni prednosti sta predvsem hitrost in nezapletenost, vendar pa ni stoodstotno občutljiva in jo je včasih težko interpretirati, še zlasti, kadar se pojavijo metastabilne konformacije. Podobna metoda je analiza heterodupleksov (heteroduplex analysis – HA) ki se pogosto uporablja v kombinaciji s SSCP, saj jo lahko izvajamo pri zelo podobnih pogojih elektroforeze. Heterodupleksi so dvoverižne strukture DNK, ki nastanejo po denaturaciji enoverižnih DNK, če obe verigi nista popolnoma enaki. Zlasti močne strukture heterodupleksov nastanejo pri manjših delecijah ali insercijah do 10 baznih parov, ki so pogoste pri mnogih onkogenih in za tumorje zaviralnih genih. Metoda denaturacijske visokoločljivostne tekočinske kromatografije (DHPLC - Denaturing High Performance Liquid Chromatography) temelji na zaznavanju sprememb DNK na podlagi nastanka in ločevanju heterodupleksov. Za razliko od SSCP je njena občutljivost skoraj 100%, ker je optimalne pogoje analize heterodupleksov mogoče zelo natančno napovedati. Metoda hkratnega pomnoževanje od ligacije odvisnih sond (MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) omogoča odkrivanje odstopanja v številu kopij DNA in je primerna predvsem za določanje delecij in duplikacij, ki jih je z drugimi metodami težko določiti. Metoda TaqMan je novejša metoda, primerna za zelo hitro in natančno genotipizacijo velikega števila vzorcev, obenem pa na osnovi sledenja PCR v realnem času omogoča tudi natančno kvantifikacijo izražanja genov. Metodo TaqMan odlikujejo predvsem visoka občutljivost in specifičnost, odsotnost "post-PCR" korakov, zmanjšano tveganje kontaminacije s prenosom, zmožnost obdelave velikega števila vzorcev, kratek čas analize in skoraj popolna avtomatizacija. Edina metoda, s katero neposredno dokažemo mesto mutacije, je določevanje nukleotidnega zaporedja oziroma sekvenčna analiza. Kljub pomembnemu napredku v zadnjih letih zaradi avtomatizacije in hitrosti izvedbe ter neradioaktivnim postopkom je metoda še vedno precej draga in zamudna, zato se v molekularni diagnostiki običajno uporablja v zadnji stopnji, ko je treba vzorec DNK, v katerem smo odkrili mutacijo z drugimi metodami, potrditi oziroma točno določiti mesto okvare. DNK-mikromreže (DNA microarrays) omogočajo analizo celotnega genoma. Hibridizacije potekajo na t. i. DNK-čipih z visoko ločljivostjo. Ločimo DNK-mikromreže, s katerimi ugotavljamo razlike v izražanju posameznih genov, in DNK-mikromreže, s katerimi določamo polimorfizme in mutacije v posameznih genih ali skupini genov.

Viri in literatura

1. Glavač D, Dean M., Application of Heteroduplex Analysis for Mutation Detection in Disease Genes, *Human Mutation* 1995; 6: 281-287.
2. Pfeifer GP, ed. Technologies for detection of DNA damage and mutations, New York : Plenum press, 1996: 241-251.
3. Cotton RGH, Edkins E, Forrest S. Eds. Mutation detection, Oxford: Oxford University Press, 1998.