

Klinisk molekylærmedisin (2): Molekylær diagnostikk av mindre mutasjoner

Pål Rasmus Njølstad¹

Seksjon for endokrinologi og metabolsme, Barneklirikken, Haukeland Sykehus, 5021 Bergen

Innledning

I første del av denne temaserien ble diagnostikk av større delesjoner og rearrangementer diskutert (1). De fleste mutasjonene som forårsaker sykdom er imidlertid bemerkelsesverdig små selv om effekten kan være betydelig. I denne andre delen diskuteres diagnostikk av mindre mutasjoner. Dette dreier seg om små delesjoner eller insersjoner av en eller noen få nukleotider som kan analyseres hjelp av relativt enkle teknikker ulike de som ble beskrevet i første del av serien. DNA-sekvensering, som er mye mer ressurskrevende, vil bli omtalt spesielt i en tredje del av serien.

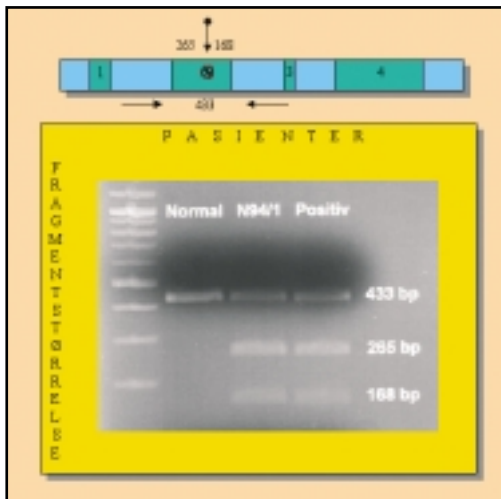
Det er egentlig utrolig at forandring av bare et enkelt nukleotid i genomet på 3,2 Gb (gigabaser eller 3,200.000.000 basepar) (2) kan føre til for eksempel endret enzymaktivitet slik at medfødt binyrebarksvikt eller diabetes oppstår når vi nå vet at genetisk variasjon fra person til person er vanlig og oftest ikke får noen fenotypisk konsekvens! En utfordring er derfor sikkert å kunne påvise slike små forandringer samt å finne ut om de kan forårsake sykdom eller ikke (3).

Mutasjonsdeteksjon

Det finnes mange ulike tester for å detektere mutasjoner i DNA. En enkel metode er restriksjonsenzymbaserte tester. Restriksjonsendonukleaser gjenkjenner spesifikke DNA-sekvenser på 4-8 nukleotider og kutter DNA bare på disse stedene i genomet. Dersom en endring i DNA skjer i et slikt sete, vil ikke restriksjonsenzymet lenger kutte DNA på dette stedet. Dette kan enkelt detekteres ved elektroforese (Figur 1). Restriksjonsenzymbaserte tester har sine begrensninger. Det er ikke alltid at en mutasjon oppstår i et kuttested for et enzym, og testen kan ikke brukes til å studere flere mutasjoner samtidig. Til dette finnes tester som benytter oligonukleotider og hybridisering (hybridisering ble gjennomgått i første delen av serien) (Figur 2). Testen er relativt robust og kan benyttes til massescreeninger. Mange mutasjoner kan også undersøkes samtidig, noe som utnyttes ved for eksempel HLA-typing.

De beskrevne teknikker benyttes for å undersøke små mutasjoner som for eksempel insersjon eller delesjon av få nukleotider. Ved deteksjon av såkalte dynamiske mutasjoner, må en annen teknikk benyttes. Dynamiske mutasjoner er omtalt i et annet nummer av *Pediatrik endokrinologi* (4) og ble i sin tid introdusert for å skille den unike egenskapen til ekspanderende, ustabile repetisjoner i DNA fra andre mutasjoner (5). DNA-repetisjonene består av tripletter av nukleotider. Hos friske individer er antallet repetisjoner under en bestemt grense, hos syke mer enn et visst antall og hos bærere vil tallet være mellom disse grenseverdiene. Fragil-X syndrom er den vanligste sykdommen som skyldes

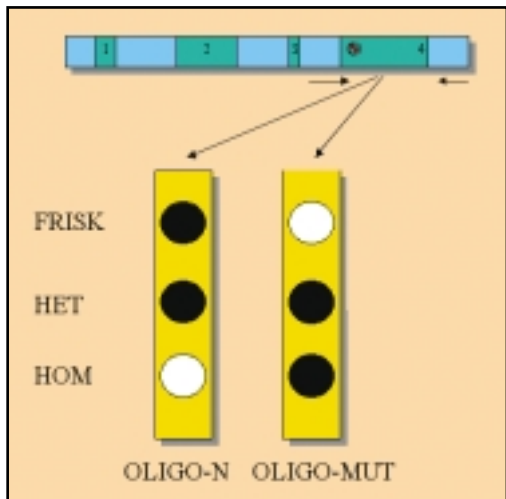
1: Korrespondanse til:
Professor Pål Rasmus Njølstad
Barneklirikken
Haukeland Sykehus
Helse Bergen HF
5021 Bergen
Tlf. 55975153
Fax. 55975147
E-post: pal.njolstad@haukeland.no



Figur 1

Mutasjonsdeteksjon ved hjelp av en restriksjonsenzymbasert test.

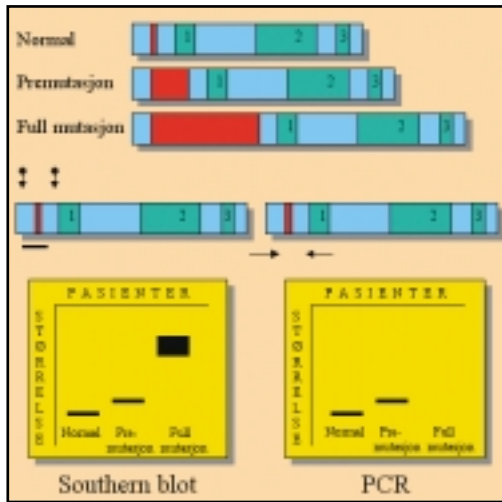
Eksempelet viser deler av et gen *HNF-1A* som er årsak til diabetes av typen MODY3. Eksoner er markert med grønt mens introner er blå. Det finnes en sekvensvariasjon (rødt symbol) som introduserer et kuttested for restriksjonsenzymet Taal i eksone 2 av gen (pil med endepunkt). Testen er utført ved at området rundt kuttestedet er amplifisert ved hjelp av PCR. PCR-produkter fra en frisk person, pasienten N94/1 og en positiv kontroll er tilsatt restriksjonsenzymet og produktene er separert ved elektroforese. I figuren sees en molekylvektstandard til venstre, mens fragmentene fra testen sees som bånd med oppgitte størrelser i basepar til høyre. I den friske personen blir det bare ett fragment (433 bp) fordi enzymet ikke kutter. Pasienten har en sekvensvariasjon fordi det er dannet to fragmenter ($265 + 168 = 433$ bp) siden sekvensvariasjonen har ført til at enzymet nå kutter. Dette passer med resultatet fra den positive kontrollen. Den omvendte situasjonen kan også være basis for en tilsvarende test ved at en sekvensvariasjon i DNA ødelegger et kuttested for et restriksjonsenzym. I så fall kuttes DNA ikke hos de med DNA-forandringen. Testen er utført av avdelingsingeniør Janne Molnes ved Senter for diabetesgenetikk, Barneklubben, Haukeland Sykehus.



Figur 2

Mutasjonsdeteksjon ved hjelp av hybridisering med oligonukleotider.

Figuren viser et tilfeldig gen med fire eksoner (grønne) der det finnes en kort deleksjon i eksone 4 markert med rødt symbol. Testen benytter oligonukleotider som merkes (for eksempel radioaktivt). Oligonukleotider er korte DNA-sekvenser, vanligvis fra 18-24 nukleotider i lengde. Det lages en oligonukleotid som inneholder den normale DNA-sekvensen (OLIGO-N) og en som inkluderer sekvensvariasjonen (OLIGO-MUT). Disse hybridiseres til hvert sitt filter med PCR-amplifisert DNA fra ulike individer som ønskes undersøkt. Oligonukleotid med normal sekvens vil bare hybridisere med normalt DNA og oligonukleotiden med sekvensvariasjonen vil på samme måte bare hybridisere med DNA som har denne endringen. Etter hybridiseringen vaskes den merkede oligonuklotiden vekk under spesielle kontrollerte betingelser. Bare de sekvensene som passer helt vil unngå å bli vasket bort, og disse kan etterpå detekteres ved for eksempel en røntgenfilm. På denne måten kan det skille mellom personer som ikke har sekvensvariasjon (FRISK), personer som er heterozygote for endringen (HET) og personer som er homozygote (HOM) for sekvensvariasjonen.



Figur 3

Prinsippet for deteksjon av dynamiske mutasjoner.

Figuren viser eksempler på deteksjon av trinukleotidrepetisjoner med Southern blot og PCR. Eksoner er vist med grønn og introner med blå farge. Ved Southern blot analyse benyttes et restriksjonsenzym som kutter på begge sider (piler med endepunkt) av sekvensvariasjonen (rød farge). En merket oligonukleotid eller probe (svart farge) som gjenkjenner denne delen av genet hybridiseres til et filter med DNA fra de som skal undersøkes. En person som er frisk vil ha et båndmønster med mindre molekylstørrelse enn en viss grenseverdi (normal). Et individ med sykdom vil være representert med et bånd med molekylvekt over en viss grenseverdi (full mutasjon), mens asymptotiske bærere (premutasjon) vil ha et bånd med størrelse mellom disse

grenseverdiene. Det kan også benyttes PCR som vist til høyre i figuren. Full mutasjon kan ha en molekylvekt som er så stor at fragmentet ikke amplifiseres ved hjelp av PCR.



Figur 4

Sekvensvariasjoner og betydning for sykdom eller ikke. Figuren illustrerer ulike aspekter ved det å bedømme om en sekvensvariasjon er årsak til sykdom (mutasjon) eller ikke (polymorfisme). Øverst sees et familietre der det var påvist diabetestypen MODY2. Pasienter med MODY2 er representert med grønn (diabetes) eller orange farge (nedsatt glukosetoleranse). Friske individer er åpne symboler. En bestemt sekvensvariasjon (V62A) i glukokinase/MODY2-genet er oppgitt med tegnet +, mens - betyr at denne sekvensvariasjonen ikke var til stede. Sekvensvariasjonen segregerte med sykdommen i familien ved at alle syke hadde sekvensvariasjonen mens de friske ikke hadde denne. Dette er et sterkt indisium på at sekvensvariasjonen er årsak til diabetes i denne familien. Panelet i midten viser skjematisk en undersøkelse av genproduktet fra HNF-1A/MODY3-genet. Dette genet har som funksjon blant annet å aktivere andre gener. Denne egenskapen ble undersøkt i kunstig laget protein som inneholdt en bestemt sekvensvariasjon (mutasjon) og DNA uten denne forandringen (normal).

Aktiviteten var lavere i genproduktet med sekvensvariasjonen sammenlignet med protein uten endringen. Undersøkelsen indikerer at sekvensvariasjonen er årsak til sykdommen. Nederst er genet HNF-1A/MODY3 illustrert med eksoner som bokser og introner som streker. De ulike delene av genet har forskjellige farger alt etter biologisk funksjon. Noen viktige funksjoner som dimerisering, DNA-binding og aktivering er oppgitt. Sekvensvariasjon i noen av disse regionene er mer sannsynlig årsak til sykdom sammenlignet med sekvensvariasjon i en region uten kjent biologisk funksjon.

ekspansjon av trinukleotidrepetisjoner (6). Deteksjon av dynamiske mutasjoner kan benytte Southern blot analyser (Southern blot er beskrevet i første del av serien) eller PCR (Figur 3).

Sekvensvariasjoner

Dersom en forandring i DNA forårsaker sykdom, har den hittil blitt kalt mutasjon til forskjell fra polymorfismer som ikke gir opphav til sykdom. Grensen er imidlertid i mange tilfeller flytende og begrepet polymorfisme er ikke godt definert. Den vanlige oppfatningen er at en polymorfisme betegner en forandring i DNA som finnes hos flere enn ett av hundre individer. På grunn av definisjonsproblemene ser det ut til at det blir enighet om å kalle både mutasjoner og polymorfismer for sekvensvariasjoner uten i selve ordet å angi funksjonen nærmere (7).

Det er viktig å fastslå om en sekvensvariasjon kan forårsake sykdom eller ikke (Figur 4). Et av de beste kriteriene for at en sekvensvariasjon er sykdomsfremkallende, er at den segregerer med sykdommen i en familie slik at den bare finnes hos de syke (og sykdomsbærerne) og ikke de friske. Et annet indisi-um er om sekvensvariasjonen påvirker den normale funksjonen til genproduktet. I mange tilfeller finnes det ikke tilgjengelige tester for dette slik at det må gjøres teoretiske betraktninger. Dersom sekvensvariasjonen fører til at genproduktet ikke kan dannes eller at proteinet stoppes i avlesningen, er det sannsynlig at funksjonen endres. Endring av bare en aminosyre er imidlertid vanskeligere å bedømme. Noen aminosyrer er lite viktige mens andre har stor betydning for funksjonen til et protein. Det må derfor undersøkes om den muterte aminosyren er konservert mellom ulike arter eller om den finnes i en region som har en kjent biologisk funksjon slik som DNA-binding. I så fall er sekvensvariasjonen trolig av betydning. Det ultimate beviset for om en sekvensvariasjon er patogen er å reprodusere fenotypen i en dyremodell eller i cellekultur. Disse problemene illustrerer hvorfor det er vanskelig å lage molekylære diagnostiske tester til rutinebruk og at korrekt tolking av analyseresultatene er viktig og krevende.

Referanser

1. Njølstad PR, Aarskog D. Klinisk molekylærmedisin (1): diagnostikk av større delesjoner og rearrangementer. *Pediatrisk Endokrinologi* 2001;15:61-5.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
3. Korf B. Molecular medicine: molecular diagnosis. *N Engl J Med* 1995;332:1499-502.
4. Aarskog D, Njølstad PR, Bjerknes R. Klinisk dysmorfologi: en oversikt. *Pediatrisk Endokrinologi* 2000;14:29-37.
5. Richards RI. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 2001;10:2187-94.
6. Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 1994;271:536-42.
7. Dunnen JT den, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109:121-4.