

Molekulare Screeningmethoden in der Humangenetik

Mutationscreening auf der Ebene der RNA oder der DNA? Das Gen allein entscheidet

Wolfgang Ballhausen, Institut für Humangenetik der Universität, Erlangen

*Diagnostische und wissenschaftliche Fragestellungen in der Tumorgenetik sind meist eng mit der Identifizierung von Veränderungen in zellulären Wachstums- und Differenzierungsge-
nen verknüpft.*

Von besonderer Bedeutung ist die Mutationssuche in der Praxis der Humangenetik dort, wo sie darauf abzielt, Träger eines Tumorprädispositionsgens bereits vor dem Ausbruch der Erkrankung zu identifizieren. Als Beispiele bereits präsymptomatisch mit molekulargenetischen Methoden

diagnostizierbarer Tumorerkrankungen sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und der hereditäre Nicht-Polyposis Dickdarmkrebs (HNPCC) anzuführen.

Auf der Basis eigener Erfahrungen läßt sich anhand dieser beiden Entitäten exemplarisch die Frage diskutieren, welche Reichweiten und Interpretationsspielräume so unterschiedliche Verfahren wie die SSCP (single strand conformation polymorphism) Analyse auf der einen Seite und der PTT (protein truncation test) als

RNA-Analyseverfahren auf der anderen Seite, in ihrer Funktion als vorgeschaltete Screeningverfahren für die Identifizierung von Mutationen besitzen.

Die SSCP-Analyse basiert auf dem Prinzip, daß eine Mutation in der Nukleotidsequenz die Faltung eines einzelsträngigen DNA-Moleküls verändert. Sequenzspezifische Einzelstrang-Konformationen erzeugen nach elektrophoretischer Auftrennung Banden unterschiedlicher Mobilität, die eine Veränderung der Basenfolge indizieren. Die Sensitivität der SSCP wird mit 85% angegeben und ihre Anwendung ist auf DNA-Fragmente von maximal ca. 250 Basenpaaren beschränkt, die gewöhnlich durch Polymerasekettenreaktion (PCR) an genomischer DNA erzeugt werden (Jordano et al., 1997).

Der gekoppelten in vitro Transkription/Translation eines Gens geht meist das Umschreiben der labilen mRNA in eine stabile complementäre DNA (cDNA) mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) voraus, gefolgt von der Amplifikation der cDNA mittels der PCR. Die in vitro Synthese eines genspezifischen, meist radioaktiv markierten Proteins wird durch eine künstliche Regulationssequenz (Promotor), die als Teilsequenz in einem der beiden Oligonukleotide (Primer) für die PCR vorliegt, garantiert (Sarkar & Sommer, 1989). Genetische Veränderungen, welche die Anzahl der Aminosäuren des offenen Leserahmens einer mRNA i.d.R. deutlich reduzieren, führen zu verkürzten Polypeptidketten, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. In der Praxis haben sich die Amplifikation und in vitro Translation von bis zu 2000 Basenpaare umfassenden Fragmenten in einem Schritt als routinemäßig durchführbar erwiesen.

Es muß betont werden, daß Screening-Verfahren wie die SSCP-Analyse oder der PTT molekulargenetische Methoden darstellen, um eine krankheitsverursachende Mutation mit vergleichsweise geringem Zeit- und Kostenaufwand zunächst im Gen zu lokalisieren. Danach muß der Gendefekt, unabhängig davon, ob er mit SSCP oder PTT gefunden wurde, in aller Regel auf genomischer Ebene durch DNA-Sequenzierung definiert werden. Beide Verfahren erlauben es jedoch, den zu sequenzierenden Genbereich auf eine maximale Größe von ca. 300 Basenpaare einzugrenzen. In diesem Kontext stellt sich aber auch die Frage, ob denn nicht die Sequenzierung des gesamten Gens ohne den „Umweg“ über Mutationsscreening-Verfahren die effizientere Methode darstellt, um genetische Veränderungen auf genomischer Ebene festzulegen?

Waren es noch vor einigen Jahren vor allem finanzielle Überlegungen bei damaligen Aufwendungen von mehreren DM pro Base, die eine komplette Sequenzierung eines Krankheitsgens zu kostenintensiv erscheinen ließen, so stellt inzwischen die DNA-Sequenzierung mit modernen automatisierten Apparaturen in spezialisierten Einrichtungen eine praktikable Alternative für die Mutationsanalyse kleinerer Gene wie z.B. p53 dar. Wenn jedoch die zu untersuchenden Gene einen Umfang von nahezu 10 kb codierender Sequenz besitzen, wie das APC (adenomatöse Polyposis coli) Gen, oder wenn Mutationen in verschiedenen Genen für eine Erkrankung verantwortlich sind, wie beispielsweise

mindestens 4 Mismatch-Repair Gene bei der HNPCC, so ist die routinemäßige, direkte Sequenzierung genomischer DNA derzeit für die meisten diagnostischen Laboratorien immer noch zeitlich und finanziell zu aufwendig. Hinzu kommt, daß die Sensitivität der DNA-Sequenzierung bei der Heterozygotenanalyse mit 95-97% angegeben werden muß.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit eines effektiven, vorgeschalteten Mutationsscreening-Verfahrens. Es gibt eine Vielfalt etablierter Verfahren, die für eine Mutationssuche zur Verfügung stehen (siehe Beitrag von Meindl u. Golla). Diese können jedoch in diesem Rahmen nicht besprochen werden. Vielmehr sollen stellvertretend für die Analyse auf DNA und RNA-Ebene die in der Diagnostik hereditärer Tumorerkrankungen überwiegend eingesetzten Verfahren der SSCP und des RT-PCR-PTT diskutiert werden.

Die Wahl der Strategie, die krankheitsverursachende Veränderung im Gen auf der Ebene der genomischen DNA oder des Transkriptes zu suchen, wird letztendlich durch das Expressionsverhalten und die strukturellen Eigenschaften des zu untersuchenden Gens bestimmt.

Wenn eine Keimbahnmutation nachgewiesen werden soll, so erfolgt in aller Regel die Isolierung von Nukleinsäuren oder Proteinen aus Leukozyten des Blutes des Patienten. Wird die Suche nach genetischen Veränderungen auf der Ebene der mRNA in Erwägung gezogen, so erfordern solche Verfahren, daß Transkripte des Gens

Molekulare Screening-Verfahren: SSCP versus RT-PCR-PTT

Ebene der Analyse	Screening-Methode	Besonderheiten
Genomische DNA	SSCP (ca. 250 bp)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nachweis von Basenaustauschen (wichtig für Missense-Mutationen: ca. 85% Sensitivität), kurzen Insertionen und Deletionen 2. Genomische Deletionen einzelner oder mehrerer Exons nicht nachweisbar
mRNA	RT-PCR-PTT (ca. 2000 bp)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Expression der mRNA in Blutzellen notwendig 2. Instabilität mutierter Transkripte möglich 3. Missense-Mutationen nicht nachweisbar 4. Kenntnis physiologischer Spleissmechanismen notwendig 5. Stopmutationen nahe dem 5' und 3' Ende können übersehen werden
Protein	Western Blot	<ol style="list-style-type: none"> 1. Expression des Proteins in Blutzellen notwendig 2. Missense-Mutationen nicht nachweisbar 3. Intrazelluläre Stabilität verkürzter Proteine häufig nicht gegeben

SSCP (single strand conformation polymorphism)
 RT (reverse transcription)
 PCR (polymerase chain reaction)
 PTT (protein truncation test)

auch in Blutzellen exprimiert werden. Ist diese Voraussetzung erfüllt, so wird schließlich die Durchführung des PTT als Screening-Verfahren auf der Ebene der RNA davon abhängen, ob es sich bei den zu erwartenden Mutationen primär um Missense-Mutationen (ein Basenaustausch in einem Codon führt zu einem Aminosäureaustausch), oder um Nonsense und sog. Leserasterschub-Mutationen handelt (diese beiden Mutationstypen erzeugen ein prämaures Stoppsignal für die Translation).

Ein Basenaustausch, der zu einer veränderten Aminosäure (Missense-Mutation) führt, ist mit Hilfe der SSCP-Analyse im allgemeinen als individueller Einzelstrangpolymorphismus und somit elektrophoretisch als Bande mit veränderter Mobilität darstellbar. Hingegen führt ein mutativ bedingter Aminosäureaustausch in einem in vitro synthetisierten Protein gewöhnlich nicht zu einer erkennbaren Veränderung im Wanderungsverhalten. Es haben jedoch unsere Analysen des Tumorsuppressors p53 gezeigt, daß in vitro-translatierte p53 Proteine mit bestimmten Missense-Mutationen, v.a. einem Arg175His Aminosäureaustausch, eine von der Normalform deutlich unterscheidbare Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel aufweisen. Grund für diese ungewöhnliche Veränderung im Laufverhalten sind dramatische Auswirkungen dieses speziellen Aminosäureaustausches auf die Konformation des Proteins. Die meisten der bekannten Missense-Mutationen im p53 Protein beeinflussen hingegen die elektrophoretische Auf-

trennung im SDS-Gel nicht. Es ist somit die Regel zu beachten, daß der „Protein truncation-Test“, wie der Name richtig besagt, nur dann sinnvoll ist, wenn das in Frage kommende Gen hauptsächlich durch Nonsense- oder Leseraster-Mutationen in der Ausdehnung seines Leserahmens verstimmt wird.

Ziehen Mutationen nahezu ausschließlich translationale Stopmutationen in einem Gen nach sich, wie man dies bei FAP Patienten findet, so ist der PTT in der Lage, ca. 95% aller krankheitsverursachenden Veränderungen im APC Gen aufzufinden. Gleichzeitig ist der PTT der SSCP-Analyse dadurch überlegen, daß er in einem Schritt eine beinahe um Faktor 10 größere Genregion durchsucht. Dies stellt natürlich einen deutlichen Zeitgewinn bei der Mutationssuche in einem großen Gen dar, das, wie das Beispiel des APC Gens mit mehr als 8500 Basenpaaren codierender Sequenz zeigt, in 5 überlappenden Fragmenten komplett untersucht werden kann. Aus der Praxis ist bekannt, daß Stopmutationen, die sich nahe am 5' und 3' Ende des zu untersuchenden Abschnitts befinden, entweder in der SDS-Front mit den freien radioaktiven Aminosäuren, bzw. mit einem von der Normalform nicht unterscheidbaren Molekulargewicht im Gel auftrennen. Aus diesem Grunde müssen die zu analysierenden Fragmente so gewählt werden, daß sie deutlich überlappend sind, damit auch randständige Stopmutationen nicht übersehen werden (Mayer et al., 1998).

Aber auch Mutationen in Spleiß-Kon-

sensussequenzen (Spleißakzeptor und -donor) werden durch den RT-PCR-PTT detektiert, da als Folge eines, u.U. einzelnen Basenaustauschs im essentiellen Spleißakzeptor-Dinukleotid ein Exon im reifen Transkript übersprungen wird (exon-skipping). In diesem Zusammenhang muß aber auch darauf hingewiesen werden, daß „exon-skipping“ für viele Gene ein physiologischer Mechanismus ist, um die strukturelle und funktionelle Vielfalt seiner Genprodukte über eine Variabilität in der Exonzusammensetzung zu erweitern. Dies bedeutet, daß die Durchführung eines diagnostischen RT-PCR-PTT verkürzte in vitro-translatierte Proteine ergeben kann, die allerdings als physiologische mRNA-Isoformen anzusehen sind. Die Kenntnis solcher verkürzten, jedoch natürlich vorkommenden Transkriptvarianten ist wichtig für die richtige Interpretation eines komplexen Proteinstusters von Patienten, das der RT-PCR-PTT beispielsweise bei der Analyse der ersten 14 Exons des APC-Gens liefert (Bala et al., 1996).

Erschwert, wenn nicht sogar unmöglich gemacht werden, kann die molekulare Diagnostik hereditärer Tumorerkrankungen auf der Ebene der RNA durch einen physiologischen Abbauvorgang der RNA, der als „nonsense-mediated mRNA decay“ beschrieben wurde. Hierbei überprüfen Ribosomen das reife Transkript auf die Durchgängigkeit des offenen Leserahmens. Stoßen sie auf prämaure Stopcodons, so wird die sog. Cap-Struktur am 5' Ende der mRNA abgebaut, was zur raschen Degradation des mutierten Transkriptes führt (Muhlrad & Par-

ker, 1994). Dieser Abbaumechanismus betrifft nach unseren Erfahrungen verschiedene Gene, unter ihnen aber auch die für die Diagnostik von HNPCC wichtigen Mismatch-Repair-Gene. Aus diesem Grunde ist eine sichere Mutationsanalyse dieser Gene durch RT-PCR-PTT nur unter Einbeziehung spezifischer Gegenmaßnahmen möglich. Das Antibiotikum Puromycin ist durch seine Interferenz mit den Ribosomen in der Lage, diesem, von Nonsense-Mutationen abhängigen Abbau der RNA entgegenzuwirken (Andreutti-Zaugg et al., 1997). Leukozyten von HNPCC Patienten, die vor der RNA Extraktion für einige Stunden mit Puromycin behandelt wurden, zeigten äquimolare Mengen normaler und mutierter Mismatch-Repair-Gen Transkripte. Dies ist nun eine entscheidende Voraussetzung dafür, daß verkürzte in vitro-Translationsprodukte problemlos mit Hilfe des PTT erfaßt werden können. Speziell im Zusammenhang mit der HNPCC Diagnostik muß jedoch angemerkt werden, daß der PTT allein kein ausreichendes Screening Verfahren ist, um das gesamte Spektrum genetischer Veränderungen in den Mismatch-Repair Genen zu erfassen. Als krankheitsverursachend wurden nämlich neben translationalen Stopmutationen (ca. 70%) auch zu etwa einem Drittel Missense-Mutationen in phylogenetisch konservierten Abschnitten dieser Gene festgestellt. Um auch sie zu erfassen, wird das Mutations-Screening nach der Durchführung eines PTT durch eine SSCP Analyse ergänzt. Durch diesen kombinierten Ansatz kann eine effektive Mutationssuche im Gen mit einer Sensitivität von ca. 90% erreicht werden. Eine im Zusammenhang mit dem PTT häufig gestellte Frage lautet, „lassen sich verkürzte Proteine denn nicht direkt aus Proteinextrakten der Leukozyten von Patienten mit Hilfe einer Western Blot Analyse nachweisen?“ Hierauf kann mit Verweis auf das APC Protein geantwortet werden, daß eine intrazelluläre Stabilität mutierter Transkripte nicht mit der Stabilität verkürzter Proteine in der Zelle korrelieren muß (Bala et al., 1996). Daher ist die Eignung eines diagnostischen Western Blots zum Nachweis von Stopmutationen für jedes Gen individuell und sorgfältig zu prüfen.

Die Eingangsfrage, „Mutationsscreening auf der Ebene der RNA oder der DNA?“, ist hiermit noch nicht erschöpfend diskutiert. Es ist jedoch festzustellen, daß die Entscheidung, ein vorgeschaltetes Mutations-Screening entweder auf der Ebene der RNA oder der DNA durchzuführen, letztendlich von den Eigenschaften des Genes und die es betreffenden Mutationen bestimmt wird. Hingegen ist die Wahl, ein Mutationsscreening vorzuschalten oder das Gen (die Gene) direkt zu sequenzieren von der diagnostische Einrichtung selber zu treffen.

Literatur

1. Andreutti-Zaugg C, Scott RJ, Iggo R (1997). Inhibition of nonsense-mediated messenger RNA decay in clinical samples facilitates detection of human MSH2 mutations with an in vivo fusion protein assay and conventional techniques. *Cancer Res* 57: 3288-3293
2. Bala S, Kraus C, Wijnen J, Meera Khan P, Ballhausen WG (1996). Multiple products in the protein truncation test due to alternative splicing in the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Hum Genet* 98: 528-533
3. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I (1997). SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Hum Mutat* 10: 65-70
4. Mayer K, Ballhausen WG, Rott H-D (1998). Molekulargenetische Diagnostik bei tuberöser Sklerose (TSC): Erfahrungen mit dem Protein-Truncation-Test (PTT). *Med Genetik* 1: 27-32
5. Muhrad D, Parker R (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578-581
6. Sarkar G, Sommer SS (1989). Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity. *Science* 244: 331-334

Korrespondenzadresse

PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil.
Wolfgang Ballhausen
Institut für Humangenetik
der Universität
Schwabachanlage 10
91054 Erlangen
Tel 09131-85-9113
Fax 09131-209297
ballhaus@humgenet.uni-erlangen.de
<http://www.humgenet.uni-erlangen.de>

Erratum

In dem Artikel „Die pränatale Diagnostik in Schwangerschaften nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)“ von Hans-Ulrich Pauer, Barbara Zoll und Wolfgang Engel – erschienen in *medgen* 10 (1998) S. 20 – ist uns versehentlich ein Fehler unterlaufen. Der Absatz muß korrekt lauten:
2. CFTR-Mutationen bei beiden Elternteilen. Ca. 2% der infertilen Männer weisen aufgrund einer kongenitalen Aplasie der Vasa Deferentia (CBAVD) eine Azoospermie auf. Der CBAVD liegt in ca. 80% der Fälle eine Mutation im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Gen zugrunde. Da die Heterozygotenfrequenz der CF 4% beträgt, ist bei jeder 25. nicht mit ihrem Partner verwandten Frau ebenfalls mit einer Mutation im CFTR-Gen zu rechnen. Paare, bei denen der Mann an einer CBAVD leidet und die Partnerin Trägerin einer CFTR-Mutation ist, haben in Abhängigkeit von der Art der CFTR-Mutation beim Mann ein Risiko von 0-50% für ein Kind mit einer CF (Vollbild der Cystischen Fibrose).

Die Redaktion

Erratum

zu dem Artikel von Karin Mayer, Wolfgang Ballhausen und Hans-Dieter Rott, Institut für Humangenetik der Universität Erlangen mit dem Titel „Molekulargenetische Diagnostik bei tuberöser Sklerose (TSC): Erfahrungen mit dem Protein-Truncation-Test (PTT)“, *medgen* 10 (1998) 27-31:

Durch ein unglückliches Versehen wurde Wolfgang Ballhausen als Koautor nicht erwähnt. Die oben aufgeführte Autorenliste ist korrekt.

Die Autoren