

Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce chorób genetycznych

Ryszard Słomski^{1, 2}
Jolanta Kwiatkowska¹
Hanna Chlebowska¹

Rozwój molekularnych technik badawczych umożliwia poznawanie coraz to nowych genów, spośród 100 tys. genów składających się na ludzki genom. Nowe techniki umożliwiają nie tylko poznanie sekwencji nukleotydów, lecz również wprowadzanie genów do innych komórek w celu poznania ich funkcji. Bardzo ważnym zagadnieniem jest zastosowanie technik biologii molekularnej w badaniach molekularnego podłoża chorób człowieka.

Nowym, dynamicznie rozwijającym się działem medycyny jest diagnostyka oparta o pośrednią lub bezpośrednią analizę DNA. Najwcześniej, bo już w połowie lat osiemdziesiątych znalazła ona zastosowanie w genetyce człowieka. Złożyło się na to wiele czynników, przede wszystkim szerokie stosowanie analizy restrykcyjnej i klonowania DNA (1). Przed wprowadzeniem badań molekularnych diagnostyka genetycznie uwarunkowanych chorób metabolicznych polegała głównie na oznaczaniu biochemicznych defektów stanowiących podłoże danej choroby. Diagnostyka prenatalna była możliwa jedynie w przypadkach ekspresji patologicznego genu w fibroblastach płodowych. Umożliwiało to rozpoznanie zaledwie 2% ogólnej liczby chorób dziedziczonych wg praw Mendla.

Pionierskimi pracami w badaniach molekularnego podłoża chorób genetycznych były prace z zakresu hemoglobinopatii (2). Wkrótce okazało się, że badania molekularne mają ogromne znaczenie dla całej genetyki człowieka, zwłaszcza dla diagnostyki prenatalnej chorób nie poddających się leczeniu. Zaczęto wykorzystywać sondy molekularne. Terminem tym określa się takie fragmenty DNA, które mogą być zastosowane do wykrycia prawidłowych i zdektowanych genów. Mogą to być naturalne geny zawierające oprócz sekwencji kodujących także sekwencje flankujące i wtrącone (introny). Innym rodzajem sond molekularnych są syntetyczne geny zawierające wyłącznie sekwencje kodujące. Ich naturalnymi odpowiednikami są sondy cDNA syntetyzowane za pomocą odwrotnej transkryptazy na matrycy mRNA. Pewnym ograniczeniem w stosowaniu sond cDNA było ich skomplikowane przygotowanie, które obej-

¹ Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.

² Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu.

mowało immunoprecypitację polisomów syntetyzujących określone białko, izolację polisomalnego mRNA oraz syntezę cDNA. Obecnie dla genów, dla których poznano chociażby częściowo strukturę bardzo dogodnym podejściem badawczym jest uzyskiwanie cDNA drogą odwrotnej transkrypcji połączonej z reakcją łańcuchową polimerazy (PCR) (3,4).

Sondami molekularnymi mogą być również syntetyczne odcinki DNA (najczęściej 19-nukleotydowe oligomery) służące do wykrywania pojedynczych substytucji nukleotydowych w badanych sekwencjach (5). Zalecane jest stosowanie dwóch sond rozpoznających prawidłowe sekwencje DNA lub sekwencje zawierające mutacje punktowe. Okazało się, że bezpośrednie stosowanie takich sond molekularnych w badaniach genomowego DNA jest zbyt mało czułe dla wykrywania mutacji. Dlatego technika ta znalazła szersze zastosowanie dopiero po połączeniu jej z PCR. Obecnie pod nazwą ASO (ang. *allele specific oligonucleotide*) stosowana jest w przypadkach, gdzie występuje wiele polimorficznych alleli danego genu. Inny rodzaj sond molekularnych stanowią sondy genomowe, tzn. odcinki chromosomu, które stosuje się wówczas, gdy molekularne podłoże choroby nie jest znane, natomiast znany jest region chromosomu, w którym lub, w którego pobliżu występują mutacje (6).

Do przeprowadzenia badań diagnostycznych z jedną z wymienionych sond konieczne jest wykonanie analizy techniką blottingu wg Southerna. Genomowy DNA, najczęściej 5-10 μg trawiony jest określonym enzymem restrykcyjnym, a następnie rozdzielany elektroforetycznie w żelu agarozowym i przenoszony na filtr nitrocelulozowy. Unieruchomiony na filtrze DNA jest poddawany hybrydyzacji z radioaktywną sondą znakowaną ^{32}P NTP(α) przy udziale polimerazy DNA lub znakowaną ^{32}P dNTP(γ) przy udziale kinazy polinukleotydowej T4. W przypadku sond krótkich zalecane jest znakowanie jednego lub obydwu końców sondy, natomiast w przypadku sond dłuższych najwydajniejszą metodą znakowania jest metoda typu multiprime. Odcinki, które uległy hybrydyzacji uwidocznia się metodą autoradiografii.

Coraz częściej znakowanie sond molekularnych ^{32}P dNTP zastępowane jest znakowaniem nukleotydami zawierającymi ligandy, które na etapie detekcji rozpoznawane są swoistymi przeciwciałami. W naszej opinii największe zastosowanie znajdują sondy biotynylowane, w których wykrycie ligandu przebiega z zastosowaniem reakcji immunochemicznych i kolorymetrii, jak również sondy, dla których końcowym etapem detekcji jest chemiluminescencja. W ostatnim czasie największy postęp nastąpił w detekcji metodą chemiluminescencyjną, której czułość dla wielu sond osiągnęła już czułość uzyskiwaną dla sond radioaktywnych, tzn. ilość genomowego DNA nie przekracza kilku μg .

Przełom w diagnostyce molekularnej nastąpił po opublikowaniu doniesień o reakcji łańcuchowej polimerazy, umożliwiającej uzyskiwanie milionów kopii specyficznego fragmentu DNA poprzez jego enzymatyczną amplifikację. Od czasu opublikowania pionierskiej pracy Saiki i wsp. (3) o amplifikacji *in vitro* i analizie genomowych sekwencji β -globiny, diagnostyka molekularna rozwija się bardzo dynamicznie. Technika PCR dokonała wręcz przełomu w diagno-

stycie klinicznej, dlatego że nie wymaga stosowania radioaktywnych izotopów, a ilość uzyskiwanego DNA jest wystarczająca do bezpośredniej obserwacji i oceny podczas rozdzielów elektroforetycznych. W celach diagnostycznych wykonuje się przeciętnie 35 cykli PCR. Autorzy niniejszej pracy w tym samym okresie przeprowadzili amplifikację *in vitro* genu insuliny człowieka (7). Początkowo stosowano termolabilną polimerazę Klenowa, co wymagało dodawania świeżego enzymu każdorazowo po denaturacji. Często w reakcji powstawały niespecyficzne produkty, gdyż temperatura syntezy ograniczona była do 37°C i dochodziło do niespecyficznego wiązania primerów (8). Wprowadzenie termostabilnej polimerazy z bakterii *Thermus aquaticus* (polimeraza Taq) (9) w znaczący sposób uprościło reakcję amplifikacji, obniżyło jej koszty oraz przyczyniło się do szybkiego zastosowania tej reakcji w biologii i medycynie. Obecnie na rynku dostępna jest liczna grupa termofilnych polimeraz, nie zmieniających swej aktywności w podwyższonych temperaturach (10). Pojawiły się też termobloki do automatycznego przeprowadzenia reakcji.

Najprostszym zastosowaniem reakcji PCR w diagnostyce medycznej jest wykazanie obecności lub nieobecności specyficznego fragmentu DNA. Niezwykle duża czułość metody powoduje, że w warunkach suboptymalnych może dojść do amplifikacji niespecyficznego fragmentu. Dla uzyskania właściwego produktu konieczna jest również ściśle określona ilość poszczególnych substratów oraz doświadczalnie ustalone warunki reakcji. Należy również pamiętać o większej w porównaniu z enzymem Klenowa możliwości pojawienia się błędu replikacji przy zastosowaniu polimerazy Taq (11), dlatego nie można dla celów diagnostycznych stosować zbyt małej ilości wyjściowego DNA (12), chociaż możliwa jest amplifikacja DNA pojedynczej komórki (13).

Wykazanie obecności lub braku produktu PCR znalazło zastosowanie w wykrywaniu delecji powodujących występowanie chorób dziedzicznych u hemizygotycznych pacjentów, np. z dystrofią mięśniową Duchenne'a lub Beckera (14,15), w licznych testach na obecność wirusa HIV (16), *Hepatitis B*, *Papillomavirus*, *Legionella pneumophila* i *Trypanosoma cruzi* (17). Przy wykrywaniu nosicielstwa chorób genetycznych wylania się problem pomiaru ilości zamplifikowanego DNA. Opisano szereg podejść badawczych, jednak nie wydaje się by znalazły one zastosowanie w rutynowych badaniach diagnostycznych (18,19,20).

Doskonałym przykładem postępu jaki nastąpił w bezpośredniej diagnostyce DNA za pomocą PCR jest jedna z najczęstszych chorób genetycznych — mukowiscydoza. Stosując metodę PCR, Williams i wsp. już w 1988 r. przeprowadzili pełną diagnostykę tej choroby w ciągu jednego dnia (21). Szybkie zgromadzenie danych z różnych krajów, o typach i częstości mutacji genu CFTR (genu odpowiedzialnego za występowanie mukowiscydozy), wkrótce po sklonowaniu genu (22), byłoby niemożliwe bez techniki PCR. Obecnie kilkoma reakcjami PCR można wykryć zdecydowaną większość mutacji punktowych.

Identyfikacja nie znanych jeszcze mutacji, prowadzących do stanów chorobowych może być znacznie uproszczona przez zastąpienie używanego do analizy genomowego DNA przez mRNA. Ukazały się już doniesienia o wykry-

waniu delecji i ustalaniu nosicielstwa dystrofii mięśniowej Duchenne'a poprzez analizę mRNA limfocytów krwi obwodowej, z wykorzystaniem zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (ang. *illegitimate transcription*) wykazanej po raz pierwszy przez Chelly'ego i wsp. (18). Stosując jako materiał wyjściowy całkowity RNA limfocytów przeprowadzono syntezę cDNA stosując primery specyficzne dla genu DMD, a następnie dwie reakcje PCR z wewnętrznymi primerami (ang. *nested PCR*). Ukazało się już kilka doniesień o zastosowaniu tej metody nie tylko do analizy patologicznych transkryptów, lecz również do ustalania nosicielstwa dystrofii (23,24,25,26). Szczególnie cenne jest bezpośrednio ustalanie nosicielstwa, gdyż próby ustalenia nosicielstwa metodą hybrydyzacji z sondami cDNA, metodą PCR lub poprzez analizę sprzężeń nie dają informatywnych wyników u wielu rodzin z ryzykiem DMD. Wykorzystanie łatwo dostępnych limfocytów z krwi obwodowej jako źródła rzadkich transkryptów przedstawiono w pracy, w której transkrypty specyficzne dla spermatogenezy u człowieka wykryto w limfocytach nie tylko mężczyzn, ale i kobiet (27). Bezpośrednia analiza transkryptów metodą PCR przyczyniła się również do wykrycia alternatywnego splicingu genu CFTR (28,29).

Diagnostyka molekularna z zastosowaniem PCR może być również wykorzystana do wykrywania translokacji specyficznych dla nowotworów w mRNA lub genomowym DNA. Najwcześniej zastosowano PCR w diagnostyce białaczek limfoblastycznych. Markerem cytogenetycznym tych białaczek jest występowanie chromosomu Philadelphia, natomiast na poziomie molekularnym dochodzi do fuzji genu BCR na chromosomie 22 z genem ABL na chromosomie 9 i powstawania chimerycznej formy mRNA i białka. Znaczenie tych badań wzrosło jeszcze bardziej po wykryciu mRNA BCR-ABL u pacjentów, których karyotyp nie wykazywał obecności chromosomu Philadelphia (30,31,32).

Metody molekularne stosowane są coraz częściej do wykrywania mRNA specyficznych dla nowotworów, a także oceny ich ekspresji i rearanżacji. Odbiorze znaczenie PCR dla oceny leczenia pacjentów wykazano ostatnio w badaniach mutacji genu supresorowego p53 w nowotworach pęcherza i dróg moczowych (33) oraz raka sutka. Opisano także szereg mutacji punktowych powodujących alternatywny splicing tego genu w nowotworach płuc (34) i szyjki macicy (35).

Polimorfizm DNA wykrywany poprzez PCR zastosowano do ustalania nosicielstwa zmutowanego genu w rodzinach z ryzykiem wystąpienia najczęstszych chorób genetycznych — mukowiscydozy i dystrofii mięśniowej. W przypadku dystrofii mięśniowej wykorzystano naturalny polimorfizm regionu pERT genu DMD, oceniany poprzez trawienie uzyskanych produktów PCR endonukleazami Xmn I, Bam HI i Taq I (36). Na potrzeby diagnostyki klinicznej opracowano wariant PCR umożliwiający jednoczesną amplifikację kilku fragmentów DNA. Po raz pierwszy ten wariant PCR (multiplex) zastosowano w badaniach największego dotąd poznanego genu człowieka (gen DMD). Autorzy niniejszego opracowania metodą PCR-multiplex analizują 20 regionów genu DMD — region promotora i eksony 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 i 60, wykonując 6 reakcji typu multiplex (37).

Diagnostyka molekularna znajduje szerokie zastosowanie w medycynie sądowej i kryminalistyce (38,39), zastępując badania serologiczne. Umożliwia ustalanie ojcostwa i identyfikację śladów biologicznych. W tym celu przeprowadza się amplifikację regionów DNA charakteryzujących się w populacji znacznym polimorfizmem (40). Opisano już kilka regionów wykazujących polimorfizm długości wynikający z zawartości różnej liczby krótkich, tandemowych powtórzeń (ang. *variable number tandem repeats, VNTR*). Znając częstość występowania alleli w populacji można obliczyć prawdopodobieństwo pokrewieństwa, co w zasadniczy sposób różni tę technikę od analizy typu multilocus, składającej się na tzw. DNA *fingerprinting*. Dokładność oznaczeń poprzez analizę VNTR zbliżona jest do 100%. Olbrzymie znaczenie ma również możliwość wykonania analizy na materiale częściowo zdegradowanym lub dostępnym jedynie w śladowych ilościach.

W najbliższej przyszłości należy oczekiwać dalszego rozwoju diagnostyki molekularnej i jej bezpośredniego zastosowania w wyjaśnianiu molekularnego podłoża chorób człowieka. Wprawdzie badania te zostały zapoczątkowane i rozwinięte głównie w badaniach chorób genetycznych człowieka, jednak w ostatnim czasie wyraźnie widać zastosowanie tych badań w wyjaśnianiu etiopatologii innych chorób. Przede wszystkim ogromny postęp należy odnotować w wykrywaniu patogenów — wirusów, bakterii, pasożytów i grzybów. Uzyskane wyniki umożliwiają identyfikację typu patogenu co pozostaje w bezpośrednim związku z terapią.

W przypadku zakażeń wirusowych diagnostyka molekularna umożliwia wykrycie zaledwie kilku cząstek wirusa w materiale od osób seronegatywnych. Jest to szczególnie ważne w zapaleniu wątroby wywołanej wirusem *Hepatitis B*, gdyż około 10% nosicieli wirusa nie wykazuje obecności przeciwciał w testach immunochemicznych. Również inne choroby rozpowszechnione w populacji człowieka są coraz częściej diagnozowane poprzez badania molekularne. Duże znaczenie przywiązuje się do badań zaniku heterozygotyczności w procesie nowotworzenia oraz identyfikacji genotypów chorych, u których wystąpił zawał serca.

Literatura

1. Orkin S. H., Markham A. F., Kazazian H. H., (1983), *J. Clin. Invest.*, 71, 775 – 779.
2. Panny S. R., Scott A. F., Smith K. D., Phillips J. A., Kazazian H. H., Talbott C. C., Boehm C. D., (1981), *Am. J. Hum. Genet.*, 33, 25 – 35.
3. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., et al., (1985), *Science*, 230, 1350 – 1354.
4. Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A., (1981), *Science*, 233, 1076 – 1078.
5. Conner B. J., Reyes A. A., Morin C., Itakura K., Teplitz R. L., Wallace R. B., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 278 – 282.
6. Willard H. F., Waye J. S., Skolnick M. H., Schwartz C. E., Powers V. E., England S. B., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5611 – 5615.
7. Słomski R., Jungerman M., Kraszewski A., Horst-Sikorska W., (1989), *Biotechnologia*, 2(4), 74 – 84.
8. Jungerman M., Słomski R., (1990), *Postępy Biochemii*, 36, 14 – 21.

9. Chien A., Edgar D. B., Trela J. M., (1976), *J. Bacteriol.*, 127, 1550 – 1557.
10. Orrego C., (1990), in: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*, San Diego, Academic Press, Inc., 447 – 454.
11. Tindall K. R., Kunkel T. A., (1989), *Biochem.*, 27, 6008 – 6013.
12. Krawczak M., Reiss J., Schmidtke J., Rslor U., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 2197 – 2201.
13. Li H., Gyllenstein U. B., Cui X., Saiki R. K., Erlich H. A., Arnheim N., (1988), *Nature*, 335, 414 – 417.
14. Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N., Caskey C. T., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 23, 11141 – 11156.
15. Beggs A. H., Koenig M., Boyce F. M., Kunkel L. M., (1990), *Hum. Genet.*, 86, 45 – 48.
16. Kellog D. E., Kwok S., (1990), in: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*, San Diego, Academic Press, Inc., 337 – 347.
17. Eisenstein B. I., (1990), *N. Engl. J. Med.*, 322, 178 – 183.
18. Chelly J., Kaplan J. C., Maire P., Gautron S., Kahn A., (1988), *Nature*, 333, 858 – 860.
19. Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H. F., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 2725 – 2729.
20. Gaudette M. F., Crain W. R., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 1879 – 1884.
21. Williams C., Williamson R., Coutelle C., Loeffler F., Smith J., Ivinson A., (1988), *Lancet*, II, 102 – 103.
22. Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B. S., et al., (1989), *Science*, 245, 1066 – 1073.
23. Chelly J., Concordet J. P., Kaplan J. C., Kahn A., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2617 – 2621.
24. Roberts R. G., Bentley D. R., Barby T. F. M., Manners E., Bobrow M., (1990), *Lancet*, 336, 1523 – 1526.
25. Schloesser M., Słomski R., Wagner M., Reiss J., Berg L-P., Kakkar V. V., Cooper D. N., (1990), *Mol. Biol. Med.*, 7, 519 – 523.
26. Roberts R. G., Barby T. F. M., Manners E., Bobrow M., Bentley D. R., (1981), *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 298 – 330.
27. Słomski R., Schloesser M., Chlebowska H., Reiss J., Engel W., (1991), *Hum. Genet.*, 87, 307 – 310.
28. Chu C. S., Trapnell B. C., Mutragh J. J., Jr., Moss J., Dalemans W., Jallat S., Mercenier A., Pavirani A., Lecocq J-P., Cutting G. R., Guggino W. B., Crystal R., (1991), *EMBO J.*, 10, 1355 – 1363.
29. Słomski R., Schloesser M., Berg L-P., Wagner W., Kakkar V. V., Cooper D. N., Reiss J., (1992), *Hum. Genet.*, 89, 615 – 619.
30. Hooberman A. L., Carrino J. J., Leibowitz D., Rowley J. D., Le-Beau M. M., Arlin Z. A., Westbrook C. A., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 4259 – 4263.
31. Lange W., Snyder D. S., Castro R., Rossi J. J., Blume K. G., (1989), *Blood*, 73, 1735 – 1741.
32. Smadia M., Alimena G., Goudsmit R., Grosveld G., Hagemeyer A., (1989), *Blood*, 73, 1038 – 1044.
33. Sidransky D., Eschenbach A., Tsai Y. C., et al., (1991), *Science*, 252, 706 – 709.
34. Takahashi T., D'Amico D., Chiba I., Buchhagen D. L., Minna J. D., (1990), *J. Clin. Invest.*, 86, 363 – 369.
35. Crook T., Wrede D., Vousden K. H., (1991), *Oncogene*, 6, 873 – 875.
36. Roberts R. G., Cole C. G., Hart K. A., Bobrow M., Bentley D. R., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 811.
37. Niemann-Seyde S., Słomski R., Rininsland F., Ellermeyer U., Kwiatkowska J., Reiss J., (1992), *Hum. Genet.*, 90, 65 – 70.

38. Jeffreys A. J., Wilson V., Neumann R., Keyte J., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 10953 – 10971.
39. Higuchi R., Beroldingen CH., Sensabaugh G. F., Erlich H. A., (1988), *Nature*, 332, 543 – 546.
40. Kasai K., Nakamura Y., White R., (1990), *Journal of Forensic Sciences*, 35, 1196 – 1200.

Application of molecular biology techniques in diagnosis of human genetic diseases

Summary

Following the initial reports of the cloning of a DNA fragment, modern molecular genetics found immediate practical application in molecular analysis and diagnosis of human diseases. Genomic DNA, RNA, nucleic acids from archival specimens or cloned DNA may be starting materials for gene analysis. In extreme cases complete analysis can be performed on the DNA from a single cell or a few microdissected chromosome fragments, or on RNA from only few cells. Many variations of the basic analytical procedures have now been described and applied to a range of medical disciplines. These include, the polymerase chain reaction (PCR), which has had a major impact on the diagnosis and screening of genetic diseases and cancer, the rapid detection of fast or slow growing microorganisms and viruses, such as mycobacteria and HIV, the detection of minimal residual diseases in leukaemia and in HLA typing. The analysis of archival and forensic material has applications in forensic pathology and evolutionary biology. PCR technique has also established a central role in the human genome project.

Key words:

human diseases, genetics, DNA diagnosis, mutations, polymorphism.

Adres dla korespondencji:

Ryszard Słomski, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60 – 479 Poznań.