

Rune R. Frants^{1*} en Louis M. Havekes^{2*}

Met de opkomst van de moleculaire genetica is het inzicht in de genetische achtergrond van erfelijke ziekten spectaculair toegenomen. Dagelijks worden nieuwe genen gelokaliseerd op een der chromosomen en kandidaatgenen voor specifieke ziekten worden vastgesteld d.m.v. mutatieonderzoek. Deze vooruitgang vormt de basis voor ontwikkeling van nauwkeurige diagnostiek, zelfs voordat er klinische of biochemische symptomen zijn. Naast een dergelijke presymptomatische diagnostiek, geeft het moleculaire inzicht nieuwe dimensies aan behandeling en preventie. In dit hoofdstuk wordt in het kort een overzicht gegeven van moleculair-genetische diagnostiek, waarbij als voorbeelden dienen familiale hypercholesterolemie (FH) en familiale dysbetalipoproteinemie (FD).

Het humane genoom

Het genetisch materiaal (DNA) is opgeborgen in twee subcellulaire structuren. Alhoewel het meeste DNA zich in de kern bevindt, moeten wij er rekening mee houden dat de mitochondrieën eveneens DNA bevatten. Met name de energiehuishouding wordt gestuurd door genen uit beide organellen. De meeste genetische aandoeningen berusten echter op defecten in het kern DNA. Het kern DNA is verdeeld over een diploide set van 46 chromosomen: 22 autosomale paren en twee geslachtschromosomen (X en Y). Van elk paar is er één afkomstig van de moeder (ei-cel) en één van de vader (sperma-cel). Deze z.g. haploide geslachtscellen ontstaan tijdens de meiose, de reductie deling, terwijl de gewone celdeling, mitose de diploide chromosomenset in stand houdt in de somatische cellen.

Het Humane Genoom Project (HGP) heeft het inzicht in de genenkaart van de mens snel doen toenemen. Het genoom bevat naar schatting 75.000 genen. De grootte en organisatie van genen verschillen sterk. Toch is de fundamentele structuur gelijk, figuur 1. Elk gen is opgebouwd uit exonen en intronen. Exonen bevatten de voor eiwit coderende sequenties. Bij de transcriptie wordt het gehele gen afgeschreven in pre-mRNA, waarna de exonen voor de translatie (eiwitsynthese) aan elkaar worden geknoopt door het uitknippen van intron-sequenties. Het gen, en ook het mRNA bevat aan de voorkant (5') en achterkant (3') niet coderende sequenties. Regulerende sequenties (promotor) bevinden zich meestal aan het begin (5') van het gen. Duidelijk is geworden dat sequenties elders, zoals in de intronen en 3'-uiteinde, eveneens belangrijk kunnen zijn voor een optimale expressie regulatie.

TNO

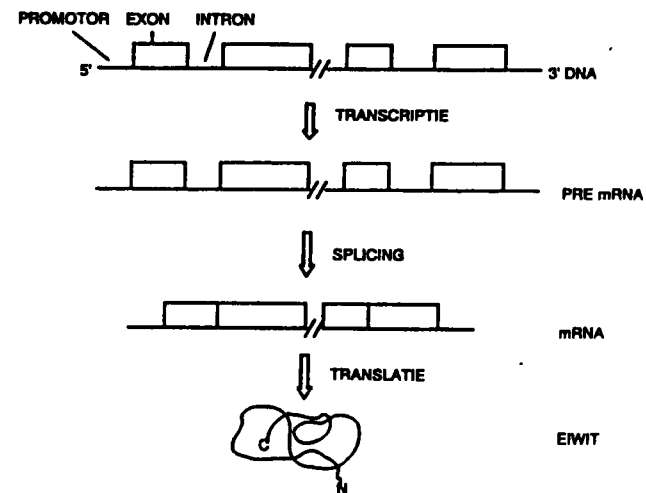
17201

* Vakgroep Genetica, Sectie Anthropogenetica, Medisch Genetisch Centrum, Rijksuniversiteit Leiden.

** TNO-PG Gaubius Laboratorium, Leiden

GEN STRUCTUUR EN FUNKTIE; VAN GEN TOT EIWIJ

2857.



Figuur 1. Schematische weergave van de structuur van een gen. De exonen (box) bevatten de informatie voor de aminozuur volgorde van een eiwit (polypeptide). De functie van intronen (tussen de exonen) is grotendeels onbekend, maar bevat wel vaak expressie regulerende elementen. De promotor aan het begin (5'-kant) van het gen is van essentieel belang voor de transcriptie (RNA synthese).

In de translatie stap worden de aminozuren aan elkaar verbonden op basis van de genetische code in het DNA/mRNA.

Mutaties; van normale variatie tot pathologie

Het DNA moet zich vermenigvuldigen bij elke celdeling. Hiervoor dient de dubbelstrengs en complementaire structuur van het DNA als uitstekende basis. Toch gaat het bij de DNA replicatie - zowel in de meiose als mitose - wel eens fout. De twee meest voorkomende typen mutaties zijn: herrangschikkingen en puntmutaties.

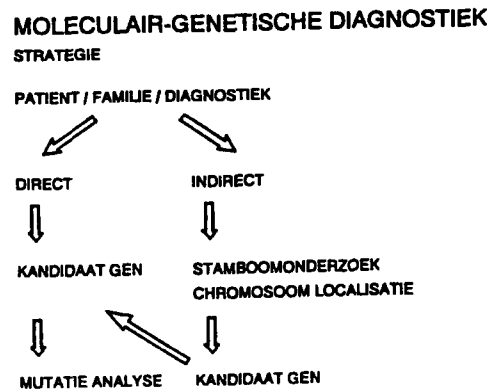
Herrangschikkingen veroorzaken vaak vrij grote veranderingen in het genoom. Translocaties, uitwisselingen tussen niet homologe chromosomen, gaan meestal gepaard met ernstige afwijkingen en de selectie ertegen is sterk. Deleties, duplicaties en inserties in de grootte van orde van een gen of een gedeelte ervan komen vaak voor en hebben geen duidelijk nadelige invloed op de celdeling en resulteren vaak in de productie van een niet-functioneel genproduct.

Puntmutaties zijn 'kleine' fouten - meestal is slechts een nucleotide betrokken - en worden geclassificeerd als missense of nonsense mutaties. Missense mutaties veranderen de genetische code zodanig dat een ander aminozuur wordt ingebouwd in het eiwit. Hierdoor kunnen de eigenschappen van het eiwit veranderen. De gevolgen variëren van geen tot een ernstige dysfunctie

waardoor een ziekte ontstaat. Een nonsense mutatie veroorzaakt een zgn. stop-codon. Hierdoor ontstaat een verkort eiwit; soms is zo'n eiwit instabiel en wordt afgebroken, in andere gevallen ontstaat een stabiele maar toch inactief of zelfs 'giftig' eiwit met alle gevolgen van dien.

Moleculair-genetische diagnostiek bij Familiaire Hypercholesterolemie (FH) en Familiaire Dysbetalipoproteinemie (FD)

In figuur 2 worden verschillende strategieën weergegeven. De te volgen benadering is afhankelijk van de kennis omtrent de afwijking, en kan variëren van mutatie-onderzoek in individuele patiënten (directe benadering) tot marker (koppelings) analyse in families (indirecte benadering). De verschillende strategieën worden besproken aan de hand van FD en FH.



Figuur 2. Algemene strategie bij moleculair-genetische diagnostiek. Bij de directe benadering wordt de ziekteveroorzakende mutatie vastgesteld. Bij de indirecte benadering wordt slechts het kandidaat gen als zodanig aangewezen; de exacte mutatie is niet bekend.

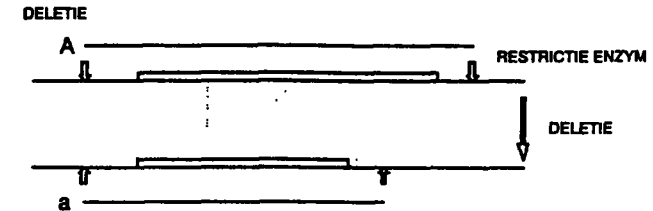
Genetische heterogeniteit, 'hetzelfde syndroom' met verschillende oorzaken, komt vaak voor. Dit fenomeen kan berusten op twee mechanismen: defecten in verschillende genen of verschillende defecten in hetzelfde gen. Familiaire hypercholesterolemie is hiervan een uitstekende voorbeeld. FH wordt meestal veroorzaakt door afwijkingen in het LDL-receptor gen. Een vergelijkbaar klinisch fenotype wordt eveneens veroorzaakt door mutaties in het APOB-gen; dus in de receptor en/of de ligand.

Tot op heden zijn meer dan 200 verschillende LDLR mutaties gevonden. Slechts in populaties met een uitgesproken bevolkingsstructuur, zoals Zuid-Afrika, Finland en Frans Canada, is het aantal verschillende mutaties heel klein.

Herrangschikkingen; Southern analyse bij FH patiënten

Bij ca 5% van de FH patiënten wordt een structurele verandering in het LDLR-gen gevonden. M.b.v. Southern analyse, zoals in figuur 3 kort beschreven, zijn veranderingen ter grootte van 500 nucleotiden makkelijk te detecteren als een veranderd fragment lengte gebruikmakend van LDLR-gen cDNA als probe.

SOUTHERN ANALYSE VAN DNA HERRANGSCHIKKING

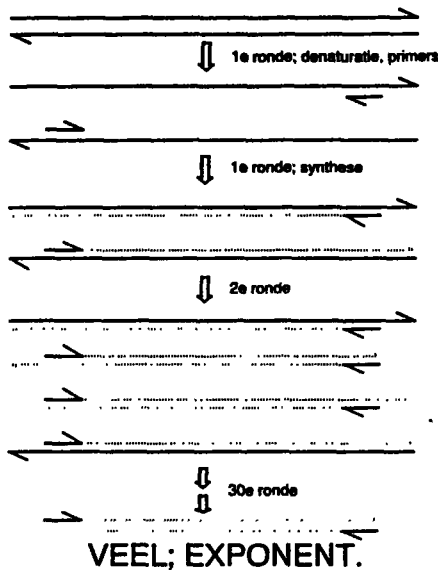


ELECTROFORESE OP LENGTE; HYBRIDISATIE MET PROBE



Figuur 3. Detectie van herrangschikking (deletie) d.m.v. Southern analyse. In de bovenste gedeelte wordt aangegeven hoe een deletie in een gen (box) de relatieve afstand tussen twee restrictie enzym knipplaatsen (pijlen) verkleint. In het onderste gedeelte worden de fragmenten gescheiden m.b.v. elektroforese en zichtbaar gemaakt m.b.v. hybridisatie met een radioactieve probe (een stuk complementair DNA). AA: homozygoot voor de normale situatie, Aa: heterozygoot voor deletie, aa: homozygoot voor de deletie.

PCR; POLYMERASE KETTING REACTIE
VERMENIGVULDIGEN VAN DNA FRAGMENT



Figuur 4. Schematische weergave van de PCR reactie; het enzymatisch vermenigvuldigen van DNA. Een PCR ronde bestaat uit drie fasen: het uit elkaar smelten (denaturatie) van de dubbelstrengs DNA keten, het hybridiseren van de primers aan het enkelstrengs DNA en het enzymatisch verlengen (synthese) van de complementaire streng. Omdat het DNA polymerase (synthese) enzym zeer hittestabiel is kunnen 10-tallen ronden in een automaat uitgevoerd worden, waardoor enorme hoeveelheden van het DNA tussen de twee primers verkregen wordt. Vervolgens worden allerlei analyses (restrictie enzym knippen, seconde analyse etc.) veel eenvoudiger.

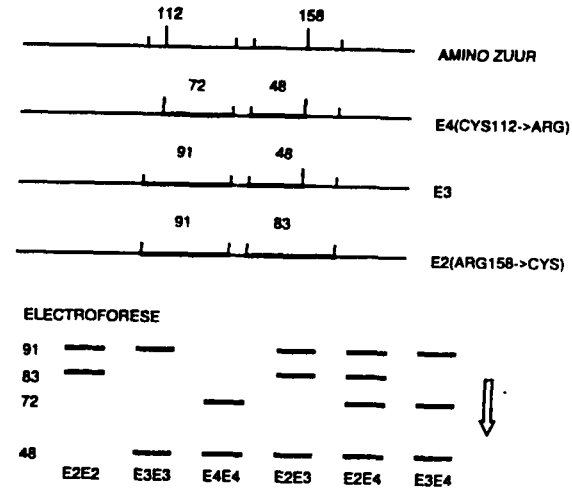
Puntmutaties

Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen: i) het detecteren van bekende mutaties en ii) het karakteriseren van nieuwe mutaties.

i) *Bekende mutaties; E2, E3 en E4.*

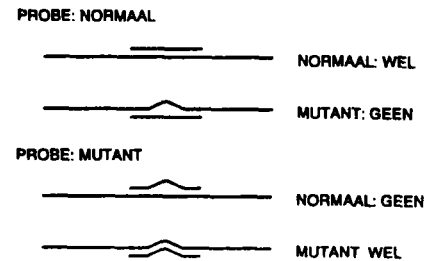
Om de analyse te vergemakkelijken wordt het DNA rondom de mutatie vermenigvuldigd m.b.v. PCR, figuur 4. Vervolgens wordt een van de volgende analyses uitgevoerd: a) de puntmutatie heeft een knipplaat voor een restrictie enzym doen ontstaan of verdwijnen. Behandeling met het desbetreffende enzym en elektroforese zal een karakteristiek fragmentenpatroon opleveren, figuur 5.

APOE GENOTYPERING
RESTRICTIE ENZYM KNIPPLAATSSEN



Figuur 5. APOE genotypering m.b.v. restrictie enzym knippen. Het verschil tussen E3 en E4 ligt in codon 112 (TGC vs CGC); het verschil tussen E3 en E2 ligt in codon 158 (CGC vs TGC). Deze subtiële verschillen veranderen de herkenningssequentie voor het restrictie enzym *HhaI*, zodat specifieke fragmenten ontstaan, die m.b.v. elektroforese gescheiden kunnen worden.

ALLEL-SPECIFIEKE HYBRIDISATIE



Figuur 6. Het principe van mutant-specifieke hybridisatie met korte (ca 20 nucleotiden) synthetische probes. Een enkel nucleotide verschil (v) is voldoende om bij een specifieke hybridisatie temperatuur een alles of niets reactie te geven. NB! Door twee probes (normaal en mutant) te gebruiken is het dus mogelijk ook heterozygoten te detecteren.

b) Allel-specifieke oligonucleotide (ASO) hybridisatie. De interactie tussen twee complementaire DNA strengen is zeer specifiek; één enkel nucleotideverschil zal de sterkte van de interactie

(hybridisatie) voldoende verzwakken dat er geen hybridisatie ontstaat. Vervolgens zal een probe ontworpen tegen de mutatie geen signaal geven bij de normale seconde, figuur 6.

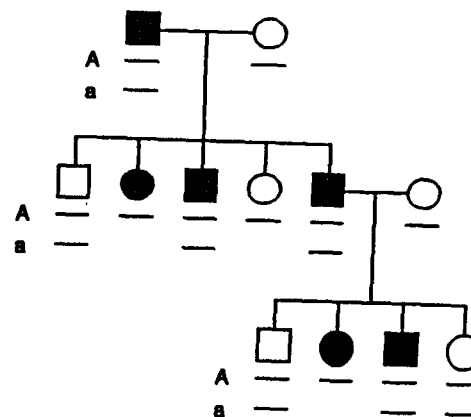
(j) Nieuwe mutaties.

Uiteindelijk moet een nieuwe mutatie worden vastgesteld m.b.v. sequentie bepaling. Bij grote genen, zoals het LDL-receptor gen is sequencing van alle exonen een zeer arbeidsintensieve benadering. Daarom wordt een voorscreening uitgevoerd om de te sequencen exon te identificeren. De voorscreening kan uitgevoerd worden met verschillende op PCR-gebaseerde technieken. De meeste technieken zijn gebaseerd op verschillende fysische eigenschappen van DNA met en zonder mutatie. Voor het opsporen van nieuwe mutaties in het LDLR-gen maken wij gebruik van 'denaturing gradient gel electrophoresis' (DGGE) (voor details zie Top *et al.* en Lombardi *et al.*). Het uitsmeltgedrag (denaturatie) van dubbelstrengs DNA wordt bepaald door nucleotide volgorde en samenstelling. Eén nucleotide verschil per 300 veroorzaakt in het algemeen een detecteerbaar verschil in denaturatie temperatuur. Wanneer men in de PCR-stap één van de primers voorziet van een z.g. GC-clamp, een serie van ca 40 G's of C's ontstaat een DNA fragment met een makkelijk (testgebied) en een moeilijk (GC-clamp) uitsmeltend domein. M.b.v. electroforese door een gradient van temperatuur of denaturerend agens zoals een mengsel van ureum en formamide, zal een normaal en gemuteerd fragment op verschillende niveaus denatureren en vervolgens in de gel blijven steken. Bij het analyseren van een 50-tal FH-patiënten werd bij ruim 80% met deze techniek een mutatie gevonden. Vervolgens wordt de exacte mutatie vastgesteld m.b.v. sequencing en wordt een mutatie-specifieke test ontwikkeld voor familie en populatieonderzoek.

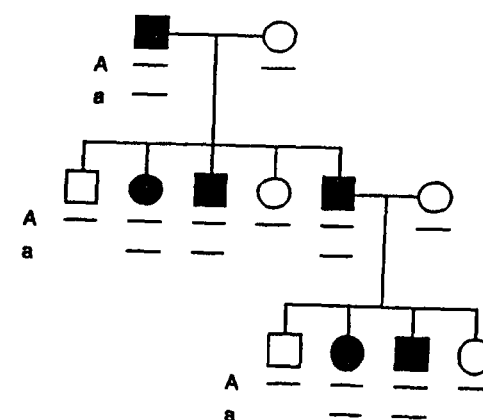
Wanneer is een mutatie ziekteveroorzakend?

Zoals eerder genoemd kunnen puntmutaties soms grote en soms zelfs geen consequenties voor het genproduct hebben. Wanneer een puntmutatie leidt tot een stop-codon is de discussie eenvoudig; geen eiwit geen functie. Eveneens, aangezien de genetische code redundant is, d.w.z. meerdere codon tripletten coderen voor dezelfde aminozuur, zullen veel mutaties slechts een andere code voor dezelfde aminozuur opleveren; weer geen reden te denken aan functionele veranderingen. Echter, soms ontstaat een code voor een andere aminozuur. Kan zo'n aminozuur substitutie straffeloos? Is de verandering van functionele betekenis of slechts een deel van de normale variatie? Enkele vuistregels voor relevantie: er worden geen andere mutaties gevonden, de mutatie wordt niet gevonden in een gezonde controle populatie, de mutatie heeft consequentie voor de proteïestructuur (computeralgoritmes). Dit soort indirecte aanwijzingen moeten eigenlijk gesteund worden door functionele proeven op het mutante eiwit. In het geval van een LDL receptor mutatie wordt het eiwit tot expressie gebracht in een *in vitro* celweefsel systeem waarin processing en bindings eigenschappen onderzocht kunnen worden. Het genereren van transgene diermodellen is een recente krachtige methode; hiermee is men in staat de effecten op organisme niveau te bestuderen, b.v. de ontwikkeling van atherosclerose.

KOPPELINGS-ONDERZOEK LDL RECEPTOR POLYMORFISME



APOB POLYMORFISME



Figuur 7. Stamboom waarin hypercholesterolemie segregert als een autosomaal dominant eigenschap. 7a. Een LDL receptor gen polymorfisme (allelen A en a) segregert onafhankelijk van de hyperlipidemie fenotype. 7b. Een APOB gen polymorfisme toont een volledige cosegregatie.

Opsporen van nieuwe genen d.m.v. koppelingsonderzoek in families

In figuur 7 wordt een grote familie, waarin een FH-achtige ziektebeeld zich manifesteert schematisch weergegeven. Wordt de ziekte veroorzaakt door een defect in het LDL receptor gen, in het ApoB gen of in een tot nu toe onbekend gen? Deze vraag kunnen wij redelijk goed beantwoorden m.b.v. koppelingsonderzoek, d.w.z. het analyseren van de overerving van de ziekte in relatie tot genetische markers in al dan niet bekende kandidaat-genen. Een genetische marker wordt gedefinieerd als een variatie in het DNA waardoor de segregatie van de twee chromosoom homologen gevolgd kunnen worden in een stamboom. Als ziekte-gen en marker vlak bij elkaar liggen, erven ze meestal over als een blok (haplotype), als ze ver van elkaar liggen, zelfs op verschillende chromosomen, erven ze onafhankelijk van elkaar over.

In figuur 7a wordt de overerving van een LDL receptor gen polymorfisme gegeven, in figuur 7b van een APOB gen polymorfisme. De LDL receptor gen polymorfisme segregert onafhankelijk van de hypercholesterolemie, terwijl de ApoB polymorfisme keurig co-segregeert met de hyperlipidemie. Conclusie: FH wordt veroorzaakt door een defect ApoB (of een ander gen in de nabijheid). Nader analyse zal naar alle waarschijnlijkheid de ApoB-3500 mutatie opleveren.

Genetische markers; microsatellieten. In het genoom komen verschillende soorten tandem repetitief DNA voor; de repeat-lengte kan variëren van één nucleotide tot enkele tientallen. Repeat-eenheden van twee, drie en vier nucleotiden worden collectief microsatellieten genoemd. Typisch voor deze is de uitgesproken interindividuele variatie in repeat aantallen. Deze variatie ontstaat door fouten bij de DNA-replicatie. Wanneer er bijv. 20 CA-eenheden achter elkaar voorkomen hebben de replicatie-enzymen moeite dit foutloos te doen, een mistelling van 1 CA-eenheid gebeurt vaak. Deze microsatellieten vormen een uitstekende bron van polymorfisme, genetische markers, voor genetisch (koppelings) onderzoek.

Wanneer geen bekend kandidaat-gen opgespoord kan worden, is het mogelijk het gehele genoom te 'scannen' zoals boven aangegeven. Het Humane Genoom Project heeft uitstekende genetische kaarten en oriëntatie punten op alle chromosomen opgeleverd.

Koppelingsonderzoek levert een kandidaatgebied waarin zich het gen zich bevindt. Als er geen 'lipiden-genen' bekend zijn in dat gebied wordt het isoleren en identificeren van het gen meestal zeer ingewikkeld en tijdrovend. Echter, ook hier heeft het Genoom Project verbazingwekkende hoeveelheden data en technologieën opgeleverd, waardoor gen isolatie via de computer binnen afzienbare tijd toenemend makkelijk wordt.

LITERATUUR

- Downton SB, Slauch RA. Diagnosis of human heritable diseases - laboratory approaches and outcomes. *Clin Chem* 1995; 41: 785-794.
- de Knijff P. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on lipoprotein metabolism. Thesis. Leiden University, 1992.
- Lombardi P, Hoffer MJV, Top B, de Wit E, Gevers Leven JA, Frants RR, Havekes LM. An acceptor splice site mutation in intron 16 of the low density lipoprotein receptor gene leads to an elongated, internalization defective receptor. *Atherosclerosis* 1993; 104: 117-128.
- van den Maagdenberg AMJM, Hofker MH, Krimpenfort PJA, de Bruijn IG, van Vlijmen B, van der Boom H, Havekes LM, Frants RR. Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem* 1993; 268: 10540-10545.
- Top B, van der Zee A, Havekes LM, van 't Hooft F, Frants RR. Identification of a splice-site mutation in the low density lipoprotein receptor gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Genet* 1993; 91: 480-484.