

Przydatność wybranych technik molekularnych w analizie mutacji genu *NF1* u chorych z nerwiakowłókniakowością typu I

Usefulness of chosen molecular techniques in analysis of mutation of *NF1* gene in patients with neurofibromatosis type I

Robert Świder¹, Zofia Szczerkowska², Waldemar Placek¹, Aneta Szczerkowska-Dobosz³, Krzysztof Rębała²

¹Katedra i Klinika Dermatologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Waldemar Placek

²Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku, kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. med. Zofia Szczerkowska

³Katedra i Klinika Chorób Skórnych i Wenerycznych Akademii Medycznej w Gdańsku, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Jadwiga Roszkiewicz

Post Dermatol Alergol 2006; XXIII, 1: 1–4

Streszczenie

Nerwiakowłókniakowość należy do schorzeń dziedziczących się w sposób autosomalnie dominujący. Chorobę charakteryzuje występowanie zmian barwnikowych w obrębie skóry typu *café-au-lait* i nerwiakowłókniaków ze współistnieniem zmian narządowych. Najczęstszym typem choroby jest nerwiakowłókniakowość typu I (NFI) – znana również jako choroba Recklinghausena.

W pracy podjęto badania DNA wyizolowanego z krwi i guzów pobranych od chorych na NFI w kierunku poszukiwania mutacji w zakresie eksonów 4b, 11, 22, 27a, 37 w obrębie genu neurofibrominy odpowiedzialnego za występowanie tej choroby.

W badaniach wykorzystano wybrane techniki molekularne: metodę SSCP (konformacyjny polimorfizm jednoniciowego DNA), metodę heterodupleksów (HD) oraz sekwencjonowanie.

W DNA ekstrahowanym z krwi chorych, podobnie jak z prób kontrolnych, nie wykazano mutacji, w przypadku DNA z guzów zidentyfikowano nową mutację w obrębie eksonu 4b.

Słowa kluczowe: techniki molekularne w analizie mutacji genu *NF1*, SSCP, HD, sekwencjonowanie.

Abstract

Neurofibromatosis is genetic disease with autosomal dominant inheritance. The most frequent form is neurofibromatosis type I (NFI). The onset of the disease is in early childhood or late. Clinical manifestations include macular lesions and neurofibromas of the skin, accompanied by internal organs involvement.

For searching mutations of 5 exons of *NF1* gene: 4b, 11, 22, 27, 37 with the most frequent mutations we have analyzed DNA isolated from blood and tumors patients with NFI. Chosen molecular techniques: SSCP, HD and sequencing were applied in the study.

No mutations in DNA isolated from blood patients with NFI and control group were detected. New mutation within exon 4b in one tumors sample which was sequenced.

Key words: molecular techniques in analysis of mutation of *NF1* gene, SSCP, HD, sequencing analysis.

Wprowadzenie

Nerwiakowłókniakowość typu I (NFI), określana również jako choroba Recklinghausena, jest schorzeniem zaliczanym do neuroektodermatoz. U podłoża choroby leżą zaburzenia rozwojowe w obrębie 3 listków zarodkowych [1–3].

Charakteryzuje ją obecność licznych plam i znamion na skórze i błonach śluzowych a także wiele malformacji rozwojowych. Zmiany w obrębie narządów nie wykazują równoległości z rozległością zmian skórnych. Ich ciężkość i przebieg mogą być bardzo różne. [4–7].

Adres do korespondencji: lek. med. Robert Świder, Katedra i Klinika Dermatologii, *Collegium Medicum* UMK w Toruniu, ul. Kurpińskiego 5, 85-096 Bydgoszcz, tel. +48 52 585 40 18, 585 45 68, e-mail: medicusbonus@interia.pl

Choroba jest uwarunkowana genetycznie, dziedziczy się w sposób autosomalnie dominujący. Występuje we wszystkich grupach etnicznych, jej częstość szacuje się na ok. 1/2500 do 1/4500 urodzeń. Choroba może się też ujawnić w późniejszym wieku. Zmiany układowe rozwijają się najczęściej przed 20. rokiem życia [3, 8].

Molekularnym podłożem choroby Recklinghausena są mutacje w obrębie genu umiejscowionego w regionie przycentromerowym chromosomu 17 (17q11.2). Gen *NF1* składa się z ok. 60 eksonów i zajmuje obszar ok. 350 kb, ze względu na rozmiar analiza mutacji w obrębie tego genu jest bardzo trudna [9–12].

Celem niniejszej pracy było wykorzystanie wybranych technik molekularnych w celu poszukiwania mutacji w obrębie 5 eksonów genu neurofibrominy: 4b, 11, 22, 27, 37. W przesiewowych badaniach tkanek chorych na nerwiakowłóknikowość typu I dokonano optymalizacji warunków reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), technik SSCP i HD. Zmutowany fragment DNA eksonu 4b poddano sekwencjonowaniu [13–15].

Materiał i metody

Badaniom poddano DNA wyizolowany z krwi obwodowej pobranej na EDTA od 15 chorych z rozpoznaną klinicznie chorobą Recklinghausena. Wszyscy pacjenci posiadali przynajmniej 5 plam typu *café-au-lait* oraz licznie rozsiane guzy, histologicznie rozpoznane jako nerwiakowłókniki. Dodatkowo od 6 chorych przy okazji zabiegu chirurgicznego pobrano fragmenty 7 guzków.

Materiał kontrolny stanowiły próbki krwi 30 zdrowych, nie-spokrewnionych osób.

Do izolacji DNA z krwi zastosowano metodę nieenzymatyczną, DNA z guzków izolowano metodą ekstrakcji organicznej z użyciem fenolu i chloroformu [4, 12, 16, 17]. Stężenie DNA mierzono metodą fluorymetryczną przy użyciu aparatu Fluoriscan Ascent FL (ThermoLabsystems).

Amplifikację eksonów 4b, 11, 22, 27a i 37 genu neurofibrominy (*NF1*) prowadzono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) w całkowitej objętości 10 µl, zawierającej 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U polimerazy *Taq*, 40 ng matrycowego DNA oraz startery o stężeniu równym 0,2 µM i sekwencjach opisanych w piśmiennictwie [13].

Profil termiczny obejmował 3 min wstępnej denaturacji w temp. 95°C, 35 cykli amplifikacji (30 s w 95°C, 30 s w specyficznej dla każdej pary starterów temperaturze hybrydyzacji, 50 s w 72°C) oraz 10 min końcowego wydłużania w 72°C. Hybrydyzację starterów prowadzono w 51°C w przypadku eksonu 37, w 52°C w eksonach 4b i 11, w 54°C w przypadku eksonu 27a oraz w 59°C w eksonie 22.

Efektywność i specyficzność amplifikacji weryfikowano poprzez elektroforezę w aparacie Multiphor II (Pharmacia LKB) w 5,8-% natywnym żelu poliakrylamidowym o grubości 0,45 mm, usieciowanym w 3-% 1,4-diakryloilopiperazyną [18, 19].

Przed analizą polimorfizmu konformacyjnego jednonicowego DNA i heterodupleksów (SSCP/HD) do produktów amplifikacji badanych eksonów dodawano w odpowiedniej ilości roztwór denaturujący (95% formamid, 20 mM wersenian, 0,05% błękit bromofenolowy, 0,05-% ksylencyjanol FF). Tak przygotowane próbki denaturowano przez 10 min w temp. 98°C, szybko schładzano w lodzie, po czym poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w wyżej wspomnianym aparacie w warunkach opisanych w piśmiennictwie [20, 21]. Elektroforezę w warunkach denaturujących prowadzono w aparacie SA-32 (GibcoBRL Life Technologies) w 6-% żelu poliakrylamidowym Gene-PAGE PLUS (f-ma Amresco). Żele po rozdziale elektroforetycznym barwiono srebrem [19, 22].

Przed sekwencjonowaniem zmutowany fragment DNA rozdzielano elektroforetycznie od fragmentu typu dzikiego i po wybarwieniu srebrem badany prążek wycinano z żelu, dodawano 200 µl 5-% zawiesiny żywicy Chelex i DNA poddawano elucji poprzez 30-minutową inkubację w temp. 56°C [23]. DNA poddawano ponownej amplifikacji, zaś otrzymany produkt oczyszczano na kolumnie Microcon YM-100 (Millipore) poprzez 2-krotny cykl rozcieńczania w wodzie do objętości 500 µl i zagęszczania do ok. 10 µl. Stężenie oczyszczonego produktu PCR oznaczono spektrofotometrycznie [23, 24]. Sekwencjonowanie obu nici DNA prowadzono za pomocą zestawu ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit w obecności 5 ng produktu PCR oraz 1,6 pmol startera w łącznej objętości 10 µl. Profil termiczny obejmował 2 min wstępnej denaturacji w temp. 96°C oraz 30 cykli reakcji wydłużania startera (30 s w 96°C, 15 s w 50°C, 4 min w 60°C).

Produkty sekwencjonowania oczyszczano poprzez precipitację, dodając 25 µl 95-% etanolu i 1 µl 3 M octanu sodu o pH 5,2, wirowano przez 20 min przy 15 000 rpm, przemywano 70-% etanolem i suszono przez 1 min w temp. 90°C, po czym zawieszano w 10 µl dejonizowanego formamidu. Po 2-minutowej denaturacji w 95°C próbkę schładzano w lodzie i poddawano elektroforezie kapilarnej przy użyciu automatycznego sekwencjatora ABI Prism 310 (Applied Biosystems) po 15-sekundowym nastrzyku przy 2 kV z użyciem polimeru POP6 (Applied Biosystems), modułu szybkiego sekwencjonowania i zestawu filtrów E. Rozdział prowadzono przez 30 min w 50°C przy 15 kV. Do analizy wyników wykorzystano program komputerowy Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems). Zidentyfikowaną mutację nazwano w oparciu o sekwencję cDNA genu *NF1* dostępną w GenBanku (nr M82814) zgodnie z obowiązującą nomenklaturą, zaś jej wpływ na sekwencję i strukturę białka zbadano przy użyciu programu Clone Manager for Windows 4.01.

Wyniki badań i dyskusja

W pracy analizowano polimorfizm 5 eksonów genu *NF* – 4b, 11, 22, 27a i 37, ich wybór wynikał z faktu, że w obrębie tych właśnie eksonów obserwowano najczęstsze mutacje [4, 13]. We wstępnym etapie pracy testowano różnorodne warunki mogące mieć wpływ na wyniki analizy SSCP/HD. Oceniano m.in. czas i temperaturę denaturacji, procentowość i stopień usieciowania poliakrylamidu, skład żelu i buforów do elektroforezy, przyłożone napięcie i czas rozdziału elektroforetycznego [21, 25].

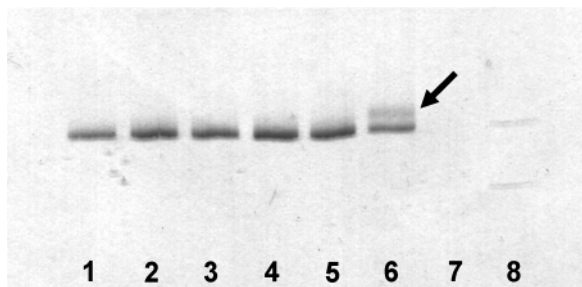
Wielkości obserwowanych produktów amplifikacji po rozdiale elektroforetycznym odpowiadają podanym przez Fahsolda i wsp. [13] i wynoszą w stosunku do markera wielkości dla eksonu 4b – 209 pz, dla eksonu 11 – 205 pz i odpowiednio dla eksonów 22, 27a i 37 po 262 pz, 263 pz i 203 pz.

Zastosowane przez nas warunki wykazały, że we wszystkich 5 badanych eksonach genu *NF1* w materiale genetycznym wyizolowanym z krwi chorych, podobnie jak w DNA prób kontrolnych, nie obserwowano obecności polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA.

Metodę SSCP wykorzystuje się do poszukiwania różnego typu mutacji DNA, takich jak mutacje punktowe, delecje, insercje, translokacje czy duplikacje. Valero i wsp. [12], stosując metodę SSCP w różnych warunkach (0,5 x MDE Gel), wykazali możliwość ujawnienia mutacji w obrębie eksonu 9 u chorych z *NF1* w postaci nowego prążka w stosunku do próby kontrolnej. W badaniach własnych uzyskano podobne rezultaty w zakresie eksonu 4b.

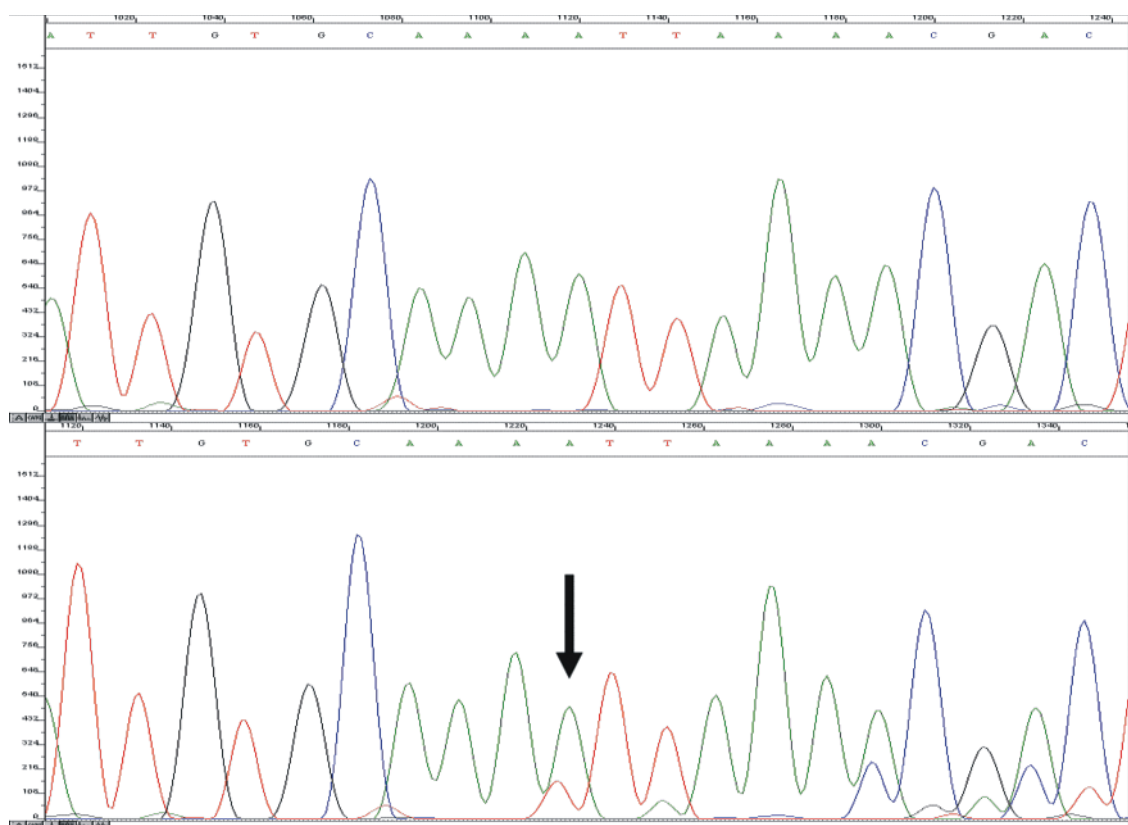
W naszych badaniach prążek mutacyjny eksonu 4b genu *NF1* obserwowano jedynie w DNA wyizolowanym z nerwiakowłóknika, gdzie zaobserwowano wyraźny prążek tuż poniżej fragmentu odpowiadającego prawidłowemu, dwuniciowemu produktowi PCR (ryc. 1).

Westermeier [21] do poszukiwania mutacji genu *NF1* modyfikował skład żelu poprzez zwiększenie stężenia



Ryc. 1. Wynik elektroforezy produktów amplifikacji eksonu 4b genu *NF1* (wybarwiony srebrem żel poliakrylamidowy). Ścieżki 1–6: DNA izolowany z nerwiakowłókników pobranych od sześciu pacjentów; 7: kontrola ujemna amplifikacji; 8: standard wielkości DNA (222 bp, 179 bp). Strzałka wskazuje prążek zidentyfikowany jako heterodupleks

glicerolu, jednak nie obserwowat istotnych różnic między wynikami uzyskanymi przy standardowym i zmodyfikowanym składzie żelu. Badania Bittner-Kowalczyk i wsp. [1] nad poszukiwaniem mutacji genu *NF1* w eksonach 1–7 wykazały brak mutacji w analizowanych regionach w stosunku do prób kontrolnych.



Ryc. 2. Porównanie wyników sekwencjonowania nici antysensownej eksonu 4b genu *NF1* w przypadku kontroli (góra) i DNA izolowanego z nerwiakowłóknika (dół). Strzałka wskazuje początek przesunięcia fazy sekwencji, widoczny jako dodatkowy pik poniżej pików prawidłowych, wynikający z obecności zmutowanego allelu z delecją jednego nukleotydu

Jako że z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że prążka mutacyjnego w obrębie eksonu 4b genu *NF1* nie stwierdzono w przypadku DNA izolowanego z krwi pacjenta, od którego pochodził opisywany guzek, należy przypuścić, że obserwowana mutacja miała charakter somatyczny. Identyfikacja elektroforetogram uzyskiwano bez poprzedzającej elektroforez denaturacji produktów PCR, co wykluczało polimorfizm SSCP, sugerowało natomiast insercję co najmniej kilku nukleotydów. Próba izolacji zmutowanego eksonu przy użyciu metod elektroforetycznych i elucji z żelu poliakrylamidowego nie przyniosła jednak efektu, gdyż za każdym razem po reamplifikacji eluowanego DNA obserwowano oba prążki, co wskazywało na obecność prawidłowego i zmutowanego eksonu w eluacie, a tym samym na ich różną migrację w żelu.

Opóźnienie migracji w postaci dodatkowego prążka najprawdopodobniej wynikało z tworzenia heterodupleksów, których detekcja stanowi podstawę metody wykrywania mutacji zwanej testem ruchliwości heterodupleksów (HD).

Brak różnic między produktami amplifikacji eksonu 4b guza i kontrolnego DNA w obrazie elektroforetycznym po rozdiale w warunkach denaturujących potwierdził obecność heterodupleksów wśród produktów amplifikacji DNA izolowanego z badanego nerwiakowłókniaka.

W związku z powyższym zaniechano dalszych prób oddzielenia zmutowanego fragmentu od DNA niezmutowanego i sekwencjonowaniu poddano bezpośrednio produkt amplifikacji eksonu 4b tkanki nowotworowej oraz DNA kontrolnego.

W przypadku eksonu 4b nerwiakowłókniaka stwierdzono obecność 2 różnych alleli: dominującej ilościowo sekwencji prawidłowej oraz sekwencji przesuniętej w fazie o jeden nukleotyd (ryc. 2.). Początek tego przesunięcia był identyczny niezależnie od nici DNA, którą poddano sekwencjonowaniu, jednoznacznie potwierdzając delecję jednego nukleotydu.

Mutację tę zidentyfikowano jako c.567delA. Powoduje ona przesunięcie ramki odczytu i przedwczesną terminację translacji tuż za miejscem mutacji, prowadząc do syntezy niefunkcjonalnego białka o długości 189 aminokwasów (prawidłowa neurofibromina 1 składa się z 2 818 aminokwasów).

Autorzy pragną podziękować kierownictwu Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku za umożliwienie wykonania badań molekularnych.

Piśmiennictwo

- Bittner-Kowalczyk A, Kowalczyk D, Pawlaczyk B. Próba analizy genetycznej 7-letniego chłopca z chorobą Recklinghausena. Przegląd Pediatryczny 1999; 29: 150-2.
- Chimenti S. A new insight into our understanding of neurofibromatosis type 1? J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 261.
- Wąsik F. Dermatologia pediatryczna. Volumed, Wrocław 2000; t. 2: 445-80.
- Ars E, Kruyer H, Morell M, et al. Recurrent mutations in the NF 1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. J. Med Genet 2003; 40: e82.
- Braun-Falo O. Dermatology. Springer, Heidelberg 1996: 841-7.
- Gutmann DH. The neurofibromatoses: when less is more. Hum Mol Genet 2001; 10: 747-55.
- Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, et al. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF 1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and development delay. Hum Genet 1998; 102: 591-7.
- Ruggieri M, Huson SM. The neurofibromatoses. An overview. Ital J Neurol Sci 1999; 20: 89-108.
- Devon RS, Chopra V, Van Raamsdonk JM. Sixty-three bases of DNA affects learning ability: using mouse models to dissect the complex components of neurofibromatosis. Clin Genet 2001; 60: 99-103.
- Legius E, Marchuk DA, Collins FS, et al. Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. Nat Genet 1993; 3: 122-6.
- Szudek J, Evans DG, Friedman JM. Patterns of associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF 1). Hum Genet 2003; 112: 289-97.
- Valero CM, Pascual-Castroviejo I, Velasco E, et al. Identification of de novo deletions at the NF 1 gene: no preferential parental origin and phenotypic analysis of patients. Hum Gene 1997; 99: 720-6.
- Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, et al. Minor mutational spectrum of the entire NF 1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. Am J Hum Genet 2000; 66: 790-818.
- Upadhyaya M, Maynard J, Osborn M, et al. Characterisation of germline mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF 1) gene. J Med Genet 1995; 32: 706-10.
- Upadhyaya M, Shen M, Cherryson A, et al. Analysis of mutations at the neurofibromatosis 1 (NF 1) locus. Hum Mol Genet 1992; 1: 735-40.
- Lopez-Correa C, Dorschner M, Brems H, et al. Recombination hotspot in NF 1 microdeletion patients. Hum Mol Genet 2001; 10: 1387-92.
- Maynard J, Krawczak M, Upadhyaya M. Characterization and significance of nine novel mutations in exon 16 of the neurofibromatosis type 1 gene. Hum Genet 1997; 99: 674-6.
- Allen R, Graves G, Budowle B. Polymerase chain reaction amplification product separated on rehydratable gels end stained with silver. Biotechniques 1989; 7: 736-44.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2766-70.
- Ars E, Serra E, Garcia J, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. Hum Mol Genet 2000; 9: 237-47.
- Westemeier R. Electrophoresis in Practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations. 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim 2003.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting of bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 1992; 38: 70-6.
- Gusmao L, Gonzalez-Neira A, Pestoni C, et al. Robustness of the Y STRs DYS19, DYS389 I and II, DYS390 and DYS393: optimization of a PCR pentaplex. Forensic Sci Int 1999; 10: 163-72.
- Rębała K, Szczerkowska Z. Identification of a very short YCA-II allele in the northern Polish population. Arch Med Sąd i Krym 2004; 54: 17-24.
- Ślomski R. Wykrywanie mutacji punktowych i polimorfizmu DNA metodą SSCP. Przykłady analiz DNA. Wyd. Akademia Rolnicza Poznań 2004; 2: 95-101.