

Stanisław Zajączek, Jacek Podolski, Jan Lubiński, Anna Rosławska,
Zofia Krzystolik i Zygmunt Sagan

Technika RFLP-PCR w wykluczeniu nosicielstwa zmutowanego genu Rb

Exclusion of carrier status of mutated Rb gene by PCR-RFLP technique

Summary. Molecular-genetic analysis of DNA by PCR-RFLP technique in a family with a case of unilateral retinoblastoma was performed. The carrier status of mutated Rb gene in a sister of proband was excluded on the basis of molecular analysis despite unsynonymous pedigree data.

Hasła: retinoblastoma, analiza DNA, poradnictwo genetyczne
Key words: retinoblastoma, DNA analysis, genetic counselling

Technika RFLP-PCR w wykluczeniu nosicielstwa zmutowanego genu Rb — opis przypadku

W powstawaniu siatkówczaka decydującą rolę odgrywają mutacje w obrębie genu Rb (delecje, mutacje punktowe), zlokalizowanego w obrębie chromosomu 13q13-14 i powodujące utratę aktywności tego genu. Warunkiem transformacji nowotworowej komórki siatkówki jest inaktywacja obu kopii genu.

Siatkówczak występuje jako choroba sporadyczna i dziedziczna, w tej ostatniej postaci przynajmniej jedna zmutowana kopia genu pochodzi od ojca lub matki. W postaci sporadycznej choroba powstaje w wyniku nowych, somatycznych (nie odziedziczonych) mutacji genu Rb. Zdarzenie takie musi mieć jednocześnie miejsce w obu kopiach genu tej samej komórki siatkówki. Charakterystyczne dla postaci dziedzicznej jest występowanie guza obustronnie, wieloogniskowo, w młodszym wieku i u więcej niż jednej osoby w rodzinie. W postaci sporadycznej zmiana jest zazwyczaj jednostronna, jednoogniskowa, późniejsza i dotyczy pojedynczych osób w rodzinie. Powyższe cechy nie pozwalają jednak zawsze na odróżnienie postaci dziedzicznej od sporadycznej

z całkowitą pewnością, ponieważ około 10-15% przypadków klinicznie sporadycznych jest wynikiem zmian dziedzicznych, a cechy kliniczne charakterystyczne dla dziedzicznego siatkówczaka mogą wystąpić również w postaci sporadycznej^{4,5,6}.

Nosicielstwo odziedziczonego, zmutowanego genu Rb zwiększa wielokrotnie ryzyko siatkówczaka a także innych nowotworów takich jak mięsak kostny, szyszniak, rak płuca, czerniak złośliwy. Gen jest przekazywany połowie potomstwa a jego penetracja wynosi 90%. W postaci sporadycznej ryzyko wystąpienia następnego nowotworu u chorego z siatkówczakiem lub jego krewnych nie jest w sposób znaczący zwiększone^{5,6}.

Zarówno u nosicieli jak i podejrzanych o nosicielstwo zmutowanego genu Rb członków rodzin, zalecane są systematyczne badania profilaktyczne np. co 3 miesiące do drugiego roku życia a następnie co 6 miesięcy. Do negatywnych cech tych badań należą możliwości powikłań (np. związanych ze znieczuleniem ogólnym) i koszty^{2,3,4,5}. Wykluczenie nosicielstwa zmutowanego genu Rb pozwala w praktyce klinicznej na odstępianie od badań profilaktycznych. Jest ono również niezwykle istotne ze względów psychologicznych, uwalnia bowiem członka rodziny z siatkówczakiem od poczucia zagrożenia nowotworem u siebie jak i ewentualnego potomstwa; wiąże się także zatem z możliwością pominięcia w przyszłości diagnostyki prenatalnej.

Do metod stosowanych w wykrywaniu nosicielstwa mutacji Rb należą: ocena danych klinicznych w tym rodowodzie, badania cytogenetyczne, ocena sprzężenia z sąsiednim dla genu Rb genem esterazy D oraz badania molekularno-genetyczne. Te ostatnie

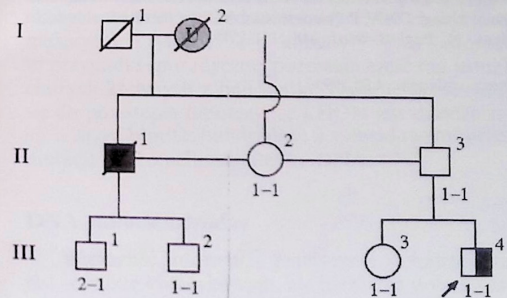
są najbardziej precyzyjną metodą diagnostyczną. Techniki molekularne stosowane w diagnostyce siatkówczaków to: tzw. RFLP (polimorfizm fragmentów restrykcyjnych) — Southern, RFLP-PCR (polymerase chain reaction), PCR-VNTR, sekwencjonowanie, „mis-match RNase probing”. Względna prostota, stosunkowo niski koszt i precyzja powodują, że szczególnie przydatne w praktyce są testy RFLP-PCR i PCR-VNTR^{2,3,7,8,9,11,12}.

W pracy przedstawiono przypadek wykluczenia zmutowanego genu Rb u siostry chorego z jednostronnym siatkówczakiem przy zastosowaniu RFLP-PCR.

Opis przypadku i analiza rodowodu

Chłopiec G.K., urodzony z IV prawidłowej ciąży, zgłosił się do Kliniki Okulistycznej w Szczecinie w 3 r. z. (nr hist. chor. 6525/85) po zauważeniu przez matkę szarego refleksu w źrenicy oka prawego. Do chwili zgłoszenia nie chorował. Przy zgłoszeniu oko prawe bez poczucia światła. VOL = 1.0. W skłisticie oka prawego, zlokalizowane głównie w kwadracie dolno-nosowym widoczne szarawobiałe masy wielkości fasoli i mniejsze liczne skupiska brunatnego barwnika. Dno oka niewidoczne. W TK ok. 2/3 tylnej części gałki ocznej o zwiększonej pochłalności, w największym wymiarze 0,8 x 1,1 cm. Nie stwierdzono naciekania n. wzrokowego i oczodołu. Usunięto prawą gałkę oczną. W badaniu hist. pat. (5100-2/85): „retinoblastoma bez cech naciekania n. wzrokowego i oczodołu”. W przebiegu 7-letniej obserwacji brak objawów wznowy miejscowej i przerzutów. U rodziców i starszej siostry chorego nie stwierdzono badaniem okulistycznym odchyłań od normy.

W związku z podjęciem programu diagnostyki genetycznej i poradnictwa u rodzin z siatkówczakiem, rodzinę K. poddano ponownej analizie. Rodowód rodziny przedstawia ryc. 1. Rodzina



Ryc. 1. Rodowód rodziny K. ■ chory; ■ zgon z powodu czerniaka; ⊙ zgon z powodu nowotworu dróg moczowych; □ badani osobiście; 1-1 fenotyp elektroforetyczny EsD.

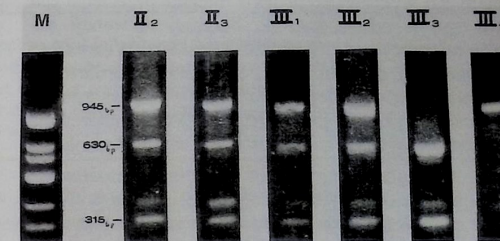
negatywnie nastawiona do poradnictwa genetycznego. W wywiadzie obciążenie nowotworowe rodziny: babka chorego zmarła na niezidentyfikowany nowotwór dróg moczowych, brat ojca (jednocześnie pierwszy mąż matki i ojciec dwu starszych braci przyrodniczych) zmarł na czerniaka złośliwego. Bracia przyrodni i rodzice matki nie zgłosili się na badania.

U wszystkich badanych osób kariotyp z limfocytów krwi obwodowej (HR GTG) był prawidłowy, odpowiednio 46,XX lub 46,XY. W szczególności nie stwierdzono delecji 13q14, występującej niekiedy w siatkówczaku. Określenie fenotypu elektroforetycznego esterazy D okazało się w rodzinie K. badaniem nieinformacyjnym.

Badania molekularno-genetyczne

DNA uzyskano z limfocytów krwi obwodowej dziecka z siatkówczakiem, jego rodziców i siostry. Amplifikację badanej próbki przeprowadzono w reakcji PCR, stosując „primery” zlokalizowane w intronie 17 genu Rb. Produkty reakcji poddano działaniu enzymów restrykcyjnych Xba I i Bam H (Boehringer) i rozdzielono na 2% agarozie z bromkiem ctydyny, uwidaczniając je następnie w świetle UV^{8,9}.

Produkty reakcji dla „primerów” Rb-Xba miały długość ok. 945 par zasad. W przypadku istnienia miejsca restrykcyjnego uzyskiwano dwa fragmenty, odpowiednio długości 630 i 315 par zasad. Produkty reakcji z primerami Rb-Bam nie posiadały miejsca restrykcyjnego, a więc były nieinformacyjne.



Ryc. 2. Produkty amplifikacji PCR fragmentu genu Rb z polimorficznym miejscem restrykcyjnym Xba-I w rodzinie K. Oznaczenia linii jak w rodowodzie na ryc. 1. M — marker długości. Długości fragmentów restrykcyjnych podano w parach zasad (bp).

Jak wskazuje ryc. 2 oboje rodzice chorego są heterozygotycznymi nosicielami miejsca restrykcyjnego dla Xba I. Proband jest homozygotą, pozbawionym miejsca restrykcyjnego, jego siostra natomiast jest homozygotyczną posiadaczką tego miejsca.

Omówienie

W opisanej rodzinie zarówno zastosowanie klasycznych technik analizy genetycznej jak i ocena markerowego sprzężenia z esterazą D nie pozwalała na ostateczne wykluczenie nosicielstwa zmutowanego genu^{5,11}. Wiąże się to z koniecznością nadzoru profilaktycznego, szczególnie w odniesieniu do starszej siostry probanda. Jej wiek zmniejsza wprawdzie ryzyko wystąpienia siatkówczaka do wartości znikomych, otwarta natomiast pozostaje sprawa ryzyka pozostałych nowotworów związanych ze zmutowanym genem Rb oraz ryzyko siatkówczaka dla jej przyszłego potomstwa. Poradnictwo genetyczne komplikuje zgon z powodu czerniaka złośliwego u brata ojca. Ryzyko wystąpienia mięsaka kostnego u potencjalnych nosicieli zmutowanego genu Rb 400-krotnie przewyższa wartości dla populacji standardowej, ryzyko czerniaka złośliwego jest także wyższe, chociaż nie zostało dotąd ilościowo określone⁵.

Informacyjne wyniki w odniesieniu do siostry probanda przyniosło badanie metodą RFLP-PCR. Technika ta pozwoliła na zwielokrotnienie badanej próbki DNA, przy jednoczesnym zabezpieczeniu swoistości reakcji poprzez użycie odpowiednich primerów (sekwencji zapoczątkowujących reakcję). Zwielokrotnienie interesujących nas wewnątrzgeno-

Z Zakładu Genetyki i Patomorfologii Instytutu Patologii Pomorskiej AM

Kierownik: prof. dr hab. Jan Lubiński

Z Kliniki Okulistyki Pomorskiej AM

Kierownik: prof. dr hab. Olgierd Palacz

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Pomorskiej AM

P.o. kierownika: dr Danuta Deboa

Reprint requests to:

Dr med. Stanisław Zajączek

Zakład Genetyki i Patomorfologii PAM

Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

wych fragmentów redukuje do wartości nieistotnych klinicznie możliwości rekombinacji meiotycznej — czynnika, który może zacierać prawdziwe stosunki genetyczne w rodzinie. Dla sond tego rodzaju odpowiednie sumaryczne wskaźniki wynoszą: logarytm ilorazu szans (tzw. lod score) 16,567 przy Θ (frakcja rekombinacji) = 0,000^{7,8}. Zastosowane primery były uprzednio testowane w rodzinach z siatkówczakiem przez *Onadima* i *Cowella*^{7,8}.

Dalsze opracowanie materiału opiera się na technice RFLP. Zmienne sekwencje DNA, będące markerami wewnątrzgenowymi sprzężonymi z badanym genem Rb wykrywane są jako miejsca przecięcia dla swoistego w odniesieniu do badanej sekwencji enzymu restrykcyjnego. Technika ta nie wykrywa zatem bezpośrednio defektu genu, pozwala natomiast na obserwację sprzężonej ściśle cechy — wystąpienia miejsca restrykcyjnego lub jego braku. Interpretacja uzyskanych wyników przedstawia się następująco:

— w najbardziej prawdopodobnej możliwości mutacji somatycznej u chorego, nie istnieje podwyższone zagrożenie nowotworowe dla rodzeństwa i następnego pokolenia potomków.

—, przyjmując alternatywną możliwość istnienia zmutowanego genu Rb w rodzinie K, jest on sprzężony z cechą „brak miejsca restrykcyjnego Xba I”. Proband jest homozygotą dla tej cechy.

— oboje rodzice są heterozygotyczni dla istnienia miejsca restrykcyjnego, istnieje zatem potencjalna możliwość wniesienia patologicznego genu przez każdego z nich.

— siostra probanda jest homozygotą dla miejsca restrykcyjnego Xba I, nie posiada zatem genu patologicznego. Jej ryzyko nowotworu nie różni się od standardowego dla populacji zdrowej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że powyższą informację udało się uzyskać mimo trudnej współpra-

cy z rodziną i wyłączenia się części jej członków z badań przy jednoczesnym złożonym genetycznie rodowodzie i dodatkowym obciążeniu nowotworowym rodziny. Analiza omawianej rodziny dobrze ilustruje wartość badań genetyczno-molekularnych w rutynowej pracy klinicznej z rodzinami obciążonymi potencjalnie dziedzicznym nowotworem.

Piśmiennictwo

1. *Cowell J.K.*: An Assessment of the Usefulness of Electrophoretic Variants of Esterase D. Br. J. Cancer 55: 661-664 (1987).
2. *Dryja T.P.*: DNA Testing for Retinoblastoma. Arch. Ophthalmol. 109: 1210 (1991).
3. *Gallie B.W.* i *wsp.*: Identification of Mutations in the Rb 1 Gene. Proc. Int. Symp. „Tumors of the Eye”, Essen 1989, Barnfield N. i *wsp.* (eds), Amsterdam - New York, Kugler Publ. (1991).
4. *Gallie B.* i *wsp.*: Mechanism of Oncogenesis in Retinoblastoma. Lab. Invest. 62: 394-418 (1990).
5. *Gallie B.* i *wsp.*: The Genetics of Retinoblastoma-Relevance to the Patient. Ped. Clin. North Am. 38: 299-315 (1991).
6. *Goodrich D., Lee W.H.*: The Molecular Genetics of Retinoblastoma. Cancer, Surv. 9: 529-554 (1990).
7. *Onadim Z.O.* i *wsp.*: Application of Intragenic DNA Probes in Prenatal Screening for Retinoblastoma Gene Carriers. Arch. Dis. Child.: 65: 651-656 (1990).
8. *Onadim Z.O., Cowell J.K.*: Application of PCR Amplification of DNA from Paraffin Embedded Tissue Sections to Linkage Analysis in Familial Retinoblastoma. J. Med. Genet.: 28: 312-316 (1991).
9. *Scharf S.J.* i *wsp.*: Amplification and Characterisation of the Retinoblastoma Gene VNTR by PCR. Am. J. Hum. Genet. 50: 371-381 (1992).
10. *Sparkes R.S., Sparkes M.C.*: Esterase D Studies in Human Retinoblastoma. W: „Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research”, Vol. 11, pp. 173-182, A. Liss. Ed. New York 1983.
11. *Wiggs J.L., Dryja T.P.*: Predicting the Risk of Hereditary Retinoblastoma. Amer. J. Ophthalmol. 106: 346-351 (1988).
12. *Wiggs J.L.* i *wsp.*: Prediction of the Risk of Hereditary Retinoblastoma Using DNA Polymorphisms Within the Retinoblastoma Gene. N. Engl. J. Med. 318: 151-157 (1988).

Praca wpłynęła: 4.05.1993.

Maciej R. Krawczyński i Krystyna Pecold

Podłoże genetyczne zaniku nerwów wzrokowych typu Lebera

Genetic basis of Leber's hereditary optic neuroretinopathy

Summary. Basic information about mitochondrial inheritance have been presented. The nature of inheritance of Leber's hereditary optic neuroretinopathy (LHON) has been described. The recent reports about heterogeneity of mutations, heteroplasm and nucleo-mitochondrial interaction have been taken into consideration. Principles of modern genetic diagnostics and counselling of LHON have been described.

Hasła: zanik nerwów wzrokowych typu Lebera, genetyka, poradnictwo genetyczne
Key words: Leber's hereditary optic neuroretinopathy, genetics, genetic counselling

Zanik nerwów wzrokowych typu Lebera (Leber's Hereditary Optic Neuroretinopathy, LHON) powoduje podostą, obustronną utratę wzroku, zwykle u młodych mężczyzn. Stwierdzono, że ta dziedziczna choroba nie spełnia zasad dziedziczenia mendelowskiego. Jest ona zawsze przekazywana przez chore lub przenoszące chorobę kobiety, ale nigdy przez chorych mężczyzn. Jednocześnie, 85% chorych to mężczyźni, a tylko 15% — kobiety¹⁶⁻¹⁸. 1/7 chorych to przypadki sporadyczne, pozostała część ma jednak chorych krewnych z linii matki. Dane te przyczyniły się do powstania hipotezy, że LHON jest dziedziczony w sposób mitochondrialny, a powodowany przez mutację w mitochondrialnym DNA.

DNA mitochondrialny

Większość informacji genetycznej zlokalizowana jest w jądrze komórkowym, ale niewielka ilość kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), znajduje się również w obrębie mitochondriów. Mitochondria człowieka zawierają około 2-10 małych, kolistych, dwuniciowych cząsteczek DNA, zorganizowanych podobnie jak DNA jądrowy w postaci podwójnej helisy. Każda z tych cząsteczek zbudowana jest z 16569 par

nukleotydów, których sekwencja została określona przez *Andersona* i *wsp.* w 1981 roku¹.

DNA mitochondrialny (mtDNA) zawiera geny pozajądrowe (cytoplazmatyczne), które kodują dwa typy rybosomalnego RNA (rRNA), 22 typy transportowego RNA (tRNA) oraz 13 z 67 podjednostek (peptydów) mitochondrialnych enzymów łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej. Pozostałe 54 podjednostki kodowane są przez geny jądrowe. mtDNA różni się od jądrowego DNA pod względem kodonów i odpowiadających im wielu aminokwasów (np. UGA koduje raczej tryptofan, niż terminację łańcucha). Nie jest jednak jasne, jak doszło do tych różnic⁶.

mtDNA przekazywany jest dzieciom wyłącznie przez matkę (tzw. dziedziczenie matczyne, czyli mitochondrialne lub cytoplazmatyczne). Związane jest to z faktem, że mitochondria znajdują się w cytoplazmie i są przekazywane w komórce jajowej przez matkę wszystkim dzieciom. Ojcowskie mitochondria nie wchodzi w skład zygoty, gdyż skąpa cytoplazma plemnika pozostaje w trakcie zapłodnienia na zewnątrz komórki jajowej (do jej wnętrza przedostaje się wyłącznie zawartość jądra komórkowego) i ulega zniszczeniu zaraz po zapłodnieniu. W efekcie, wszystkie dzieci posiadają mtDNA identyczny z matczynym, ale nie jest to równoznaczne z faktem, że muszą zachorować na dotykającą matkę chorobę, dziedziczoną w sposób mitochondrialny.

Patologia mtDNA

W ostatnich latach, rozmaite duże delekcje i mutacje punktowe mtDNA zostały skojarzone z jednostkami chorobowymi — głównie z miopatią i en-

Z Pracowni Genetyki Medycznej
IV Kliniki Chorób Dzieci
Instytutu Pediatrii AM w Poznaniu
Kierownik: dr hab. Anna Latos-Bieleńska;
Z Kliniki Okulistycznej AM w Poznaniu,
Kierownik: prof. dr hab. Krystyna Pecold

Reprint requests to:
Dr Maciej R. Krawczyński
ul. Dąbrowskiego 30/15, 60-841 Poznań