

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΡΟΥ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ (Protein Truncation Test, PTT)

Χρήστος Κρούπης, Βιοχημικός-Μοριακός Βιολόγος, MSc, PhD

1. Εισαγωγή

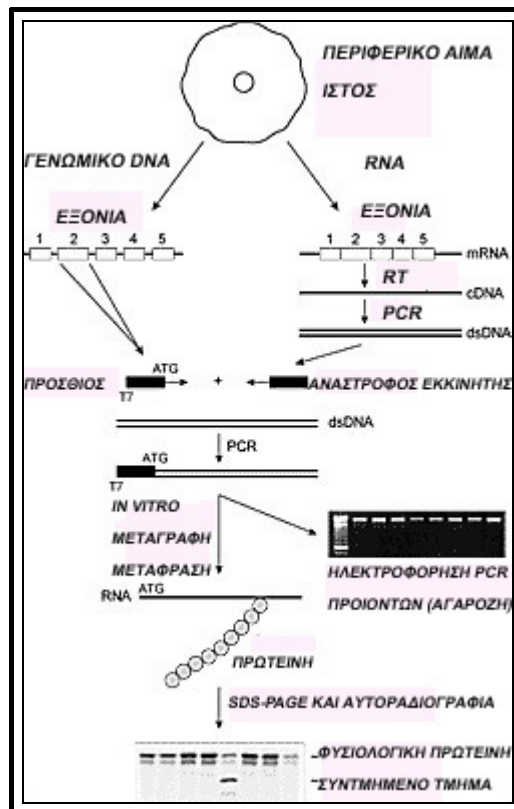
Με τον ολοένα αυξανόμενο ρυθμό εύρεσης καινούργιων γονιδίων χάρη στο Πρόγραμμα Χαρτογράφησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project) και τη συσχέτιση τους με ανθρώπινα νοσήματα, η ανίχνευση μεταλλάξεων αποτελεί πλέον ένα από τους βασικούς στόχους της Μοριακής Γενετικής. Όταν στοχεύουμε στην ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων για ένα συγκεκριμένο γονίδιο χρησιμοποιούνται ειδικές *μεθοδολογίες σάρωσης* σε τμήμα DNA μήκους 200–1000 βάσεων ταυτόχρονα σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων για να επιταχυνθεί η ανάλυση αλλά και για να αποφευχθεί το κόστος που συνεπάγεται η εφαρμογή της μεθόδου αναφοράς του DNA Sequencing σε ολόκληρο το γονίδιο. Στη περίπτωση αυτή οι κυριότερες τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που χρησιμοποιούνται είναι το Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Heteroduplex analysis (HA), Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) και άλλα παράγωγα τους που βασίζονται στη διαφορά ηλεκτροφορητικής ικανότητας μεταξύ φυσιολογικών και μεταλλαγμένων ακολουθιών είτε μονόκλωνου DNA (SSCP) είτε ετεροδιμερών μετά από PCR. Μια νέα πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι η αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (D-HPLC). Μια άλλη κατηγορία που χρησιμοποιείται ολοένα και πιο πολύ τελευταία απαιτεί τη διάσπαση των DNA ή RNA ετεροδιμερών που σχηματίζονται μετά την PCR με ενζυμικό ή χημικό τρόπο: Enzyme Mismatch Cleavage (EMC), Rnase A Cleavage Method (NIRCA η παραλλαγή), Chemical Cleavage Method (CCM) κλπ. Διαφορετική προσέγγιση ακολουθεί η δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνόςυνθεσης, μέθοδος που απαιτεί και χρήση τεχνικών πρωτεϊνών. Η κάθε μία από τις παραπάνω μεθόδους ανιχνεύει με διαφορετική ακρίβεια και ευαισθησία τα διάφορα είδη των μεταλλάξεων και ανάμεσά τους σημειακές μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς στο DNA με αμφίβολη παθογνομική αξία [1].

Η δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνόςυνθεσης (**Protein Truncation Test**, εν συντομία **PTT**) πρωτοεμφανίστηκε στη βιβλιογραφία το 1993 κυρίως για ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της δυστροφίνης [2]. Η μέθοδος PTT ανιχνεύει γρήγορα και με

αξιοπιστία μη νοηματικές μεταλλάξεις καθώς και μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης, διαταράσσουν την συνέχεια της μετάφρασης και κατά συνέπεια καταλήγουν σε κωδικόνιο τερματισμού με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή συντμημένης (truncated) πρωτεΐνης. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι κλινικά σημαντικές καθώς παράγεται μη λειτουργική πρωτεΐνη.

2. Αρχή μεθόδου PTT

Στην ουσία η μέθοδος PTT αποτελεί μια *in vitro*, *de novo* πρωτεϊνική σύνθεση από ένα ενισχυμένο τμήμα του υπό ανάλυση γονιδίου. Αποτελείται από τα κάτωθι τέσσερα κύρια στάδια: α) απομόνωση DNA ή RNA β) PCR ή RT-PCR και ηλεκτροφόρηση DNA σε αгарόζη γ) *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση και δ) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση σήματος (σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3. Διαγραμματική αναπαράσταση των σταδίων της μεθόδου PTT.

A) Απομόνωση DNA ή RNA

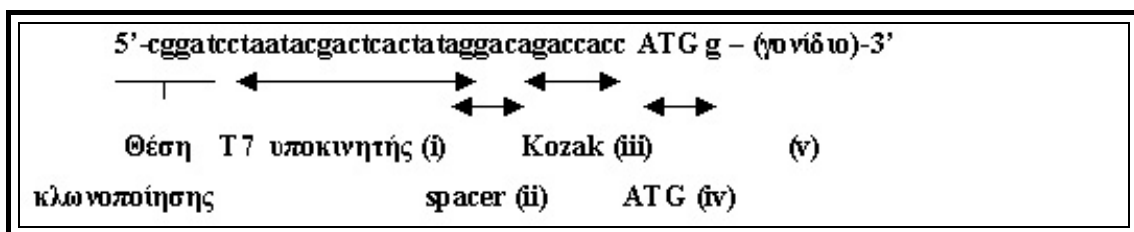
Η μέθοδος PTT μπορεί να εφαρμοσθεί σε σχετικά μεγάλο τμήμα γενετικού υλικού (μέχρι 2 kb) εν αντιθέσει με τις πιο κλασσικές μεθόδους που εφαρμόζονται σε μικρότερα τμήματα DNA όπως το SSCP που ιδανικά χρησιμοποιεί τμήματα 200-300 βάσεων και το DGGE που ιδανικά χρησιμοποιεί τμήματα 400-500 βάσεων. Εάν το προς εξέταση γονίδιο περιέχει μεγάλα εξόνια (π.χ. γονίδια APC, BRCA1/2 κλπ) τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενωμικό DNA και η μέθοδος PTT εφαρμόζεται σε αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα αυτών των εξονίων διαφορετικά εάν το προς εξέταση γονίδιο έχει πολλά μικρά εξόνια (π.χ. γονίδια DMD, ATM, hMSH2 κλπ) τότε απομονώνεται ολικό RNA ή mRNA και χρησιμοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση για να παραχθεί cDNA αντίγραφο. Η καλύτερη πηγή για το ζητούμενο RNA είναι τα συγκεκριμένα κύτταρα του ιστού που το παράγει σε μεγάλες ποσότητες ωστόσο για πρακτικούς λόγους χρησιμοποιούνται απομονωμένα λεμφοκύτταρα από πρόσφατη αιμοληψία.

B) PCR (ή RT-PCR) και ηλεκτροφόρηση DNA σε αγαρόζη

Ανάλογα εάν απομονώθηκε DNA ή RNA, ακολουθεί PCR ή RT-PCR. Στη δεύτερη περίπτωση μπορεί να χρειασθεί διπλή (nested) PCR στο cDNA καθώς η έκφραση του προς εξέταση γονιδίου μπορεί να είναι χαμηλή στα λεμφοκύτταρα.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη σχεδίαση των εκκινητών του τελικού ενισχυμένου προϊόντος. Ειδικά ο 5'-εκκινητής οφείλει να περιέχει τις ακόλουθες πέντε ειδικές περιοχές:

- i) στο 5'-άκρο υποκινητή για T7 (ή SP6 ή T3) RNA πολυμεράση για το ξεκίνημα μεταγραφής (18 βάσεις)
- ii) 5-7 τυχαίες βάσεις (spacer)
- iii) αλληλουχία Kozak που διευκολύνει το ξεκίνημα της μετάφρασης σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- iv) κωδικόνιο αρχής ATG και στη συνέχεια
- v) στο 3' άκρο-προσέχοντας να είναι ίδιο το πλαίσιο ανάγνωσης- ειδική ακολουθία 17-20 βάσεων για το γονίδιο προς εξέταση (σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4. Αλληλουχία 5'-εκκινητού ειδικού για PTT σε συνδυασμό με T7 Πολυμεράση.

Προαιρετικά μπορεί να τοποθετηθεί και ακολουθία περιοριστικής ενδονουκλεάσης πριν τον υποκινητή του φάγου σε περίπτωση που το ενισχυμένο προϊόν χρειάζεται να κλωνοποιηθεί. Τελευταία επίσης χρησιμοποιείται μεταξύ των περιοχών iv) και v) του πρόσθιου εκκινητή αλληλουχία που μεταφράζεται σε επίτοπο π.χ. του myc ή της αιμαγλουτινίνης (HA) διευκολύνοντας έτσι την μη ραδιενεργή ανίχνευση του τελικού προϊόντος με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των πρωτεϊνών αυτών (σχήμα 1.5) [3]. Επίσης η ειδικότητα του προϊόντος αυξάνεται με την προσθήκη και στον 3' εκκινητή αντίστοιχων επιτόπων όπως π.χ. του C5 ή του V5 [4].

<p>ggatcctaatacgaactactataggaacagaccacc ATGGAA CAAA TTAATA TCGGAAGAGGATTG AAT-γονίδιο</p> <p style="font-weight: bold; letter-spacing: 0.5em;">M E Q K L I S E E D L N</p> <p><i>myc</i> – tag</p>
--

Σχήμα 1.5. Αλληλουχία 5'-εκκινητού ειδικού για PTT σε συνδυασμό με επίτοπο από την *myc* πρωτεΐνη.

Εάν η περιοχή που εξετάζεται είναι πολύ μεγάλη για να επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα, χωρίζεται σε τμήματα μεγέθους το πολύ μέχρι 2 kb με αλληλοεπικάλυψη 200-300 βάσεων μεταξύ τους.

Μετά την ενίσχυση με PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη και έλεγχος των προϊόντων ως προς την καθαρότητα και το σωστό μέγεθος. Ύπαρξη και άλλου κυρίου προϊόντος καταδεικνύει γενετικό ανασυνδυασμό (deletions, duplications) στο ένα από τα δύο αλληλία και εάν το αρχικό υλικό ήταν το RNA τότε υπάρχει και η περίπτωση της παράλειψης ενός εξονίου λόγω προβλήματος στο μάτισμα του RNA (RNA splicing). Γι' αυτό είναι προτιμότερο οι εκκινητές πέραν του να τοποθετούνται σε διαφορετικά εξόνια, να μην ευρίσκονται επίσης στο τέλος του ενός και την αρχή του επομένου εξονίου (exon junction).

Γ) **In vitro** μεταγραφή και μετάφραση

Για το επόμενο στάδιο της μεθόδου PTT απαιτούνται 50-500 ng προϊόντος PCR, για το οποίο συνήθως δεν απαιτείται καθαρισμός. Η μεταγραφή σε RNA πραγματοποιείται με τη χρήση της -αντίστοιχης του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε στον 5' εκκινητή- RNA πολυμεράσης (προαιρετικά σε αυτό το σημείο μπορεί να ελεγχθεί το παραγόμενο RNA σε ηλεκτροφόρηση

αγαρόζης). Στην συνέχεια ακολουθεί *in vitro* μετάφραση σε πρωτεΐνη με τη χρήση συστήματος δικτυοκυττάρου κονίκλου (rabbit reticulocyte) ή εκχυλίσματος φύτρου του σίτου (wheat germ lysate). Υπάρχουν πλέον εμπορικά διαθέσιμα συστήματα που συνδυάζουν στο ίδιο σωληνάριο τις δύο αντιδράσεις και το μόνο που απαιτούν είναι την προσθήκη του προϊόντος PCR και ενός επισημασμένου αμινοξέος (ανάλογα με το είδος της ανίχνευσης που ακολουθεί). Η αντίδραση είναι πολύ σύντομη: 1-1,5 ώρα στους 30-37°C. Τα συστήματα αυτά περιέχουν μίγματα με όλα τα απαραίτητα νουκλεοτίδια, αμινοξέα, ένζυμα, ριβοσώματα και ρυθμιστικά διαλύματα για τις αντιδράσεις της μεταγραφής και μετάφρασης και φυλάσσονται αυστηρά στους -70°C.

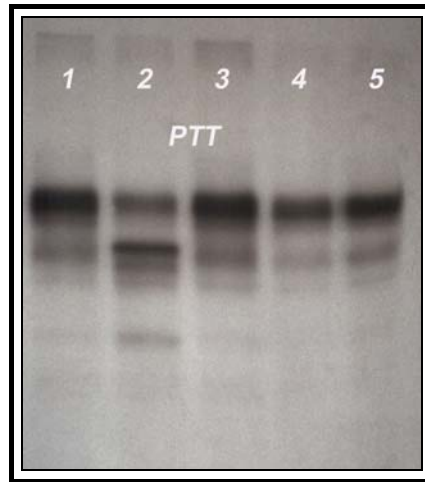
Δ) Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση πρωτεϊνών

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνικών προϊόντων της μετάφρασης πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες στην SDS ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ώστε να ανιχνεύονται ταυτόχρονα και το πλήρες μεγάλο μέγεθος του κανονικού αλληλίου αλλά και τα πιθανά μικρά συντημημένα προϊόντα που προκύπτουν από τις μεταλλάξεις που προκαλούν πρόωρο τερματισμό. Συνήθως σε πήκτωμα συγκέντρωσης 12-15% σε πολυακρυλαμίδιο μπορούν να διαχωριστούν εύκολα πρωτεϊνικά προϊόντα της μεθόδου PTT μεγέθους μέχρι 60-75 kDa σε περίπου 1-1.5 ώρα.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών προϊόντων της PTT στο ηλεκτροφόρημα SDS-PAGE μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

i) Ραδιοϊσοτοπικά. Είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιδιαίτερα όταν το εργαστήριο διαθέτει εμπειρία χρηστών και άδεια χρήσης ραδιοϊσοτόπων. Σ' αυτή την περίπτωση ενσωματώνεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης της μετάφρασης ραδιενεργό αμινοξύ στην πρωτεΐνη που συντίθεται: είτε [³⁵S]-μεθειονίνη είτε [³⁵S]-κυστεΐνη είτε [³H]-λευκίνη (οποιοδήποτε αρκεί να είναι συχνό στο τμήμα που συντίθεται). Μετά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ακολουθεί μονιμοποίηση των ζωνών στο πήκτωμα (fixation), ενίσχυση ~10 φορές του ραδιενεργού σήματος με φθορισμογραφία φθοριζουσών ουσιών που εκπέμπουν φωτόνια κατά την επαφή με ραδιενεργά ισότοπα [5] και τέλος ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Έκθεση του φιλμ για 15-18 ώρες συνήθως δίνει ένα ικανοποιητικό σήμα κατά την εμφάνιση. Στο σχήμα 1.6 δίνεται ένα σχετικό παράδειγμα τελικού σταδίου ανίχνευσης με τη μέθοδο PTT από τη δική μας εμπειρία στο γονίδιο BRCA1 [6]. Εύκολα μπορεί να εντοπίσει κανείς το μεταλλαγμένο δείγμα καθώς σε αυτά υπάρχουν δύο κυρίως σήματα: αυτό του κανονικού αλληλόμορφου που εντοπίζεται στο πάνω μέρος του

πηκτώματος και αυτό του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου που τρέχει γρηγορότερα σε χαμηλότερη θέση.



Σχήμα 1.6. Παράδειγμα ανίχνευσης μεταλλάξεων με PTT (αυτοραδιογραφία) –θέσεις 1, 3-5 φυσιολογικά δείγματα, θέση 2, μεταλλαγμένο δείγμα.

ii) Μη ραδιοϊσοτοπικά. Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιείται βιοτινυλιωμένη λυσίνη στη θέση του επισημασμένου αμινοξέος. Μετά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ακολουθεί αποτύπωση σε μεμβράνη (Western blot) και ανίχνευση με σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης με ένζυμο (π.χ. HRP, ALP κλπ) είτε με χρωματικό τρόπο (ενζυμικό υπόστρωμα: BCIP/NBT) είτε με χημειοφωταύγεια (ενζυμικό υπόστρωμα: λουμινόλη). Στη μέθοδο αυτή το στάδιο της έκθεσης και εμφάνισης είναι πιο σύντομο (μερικά λεπτά αντί για ώρες) αλλά και πιο ελεγχόμενο ως προς την ένταση του σήματος. Ο τρόπος αυτός πλεονεκτεί ως προς την αποφυγή χρήσης ισοτόπων ωστόσο απαιτεί περισσότερη εργασία συνολικά. Η χρήση αμινοξέων επισημασμένων με φθορισμό ή χημειοφωταύγεια (κυρίως λυσίνη) δίνει τη δυνατότητα άμεσης ανίχνευσης των μεταλλάξεων με το πέρας της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης. Ήδη κυκλοφορεί εμπορικό κιτ που χρησιμοποιεί tRNA με λυσίνη επισημασμένη με την φθορίζουσα ουσία BIODIPY-FL. Μειονεκτήματα αποτελούν η χρήση ιδιαίτερα ακριβού εξοπλισμού με laser ειδικού για τη σάρωση πηκτωμάτων με φθορισμό και η χρήση αποκλειστικά της λυσίνης.

3. Εφαρμογές της μεθόδου PTT

Η μέθοδος PTT αυτή τη στιγμή εφαρμόζεται σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων των οποίων το κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων οδηγούν σε συντημημένη πρωτεΐνη. Η μέθοδος PTT είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μοριακή διαγνωστική του καρκίνου

όπου είναι πολύ σύνηθες φαινόμενο η απώλεια της λειτουργικότητας (loss of function) των ογκοκατασταλτικών γονιδίων εξαιτίας αυτού του είδους των μεταλλάξεων όπως π.χ. στα γονίδια του καρκίνου μαστού/ωοθηκών και του παχέος εντέρου. Επίσης χρησιμοποιείται σε X-φυλοσύνδετα νοσήματα (DMD, Hunter κλπ) όπου και η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε άρρενες ασθενείς είναι πιο εύκολη καθώς υπάρχει ένα μόνο αλληλόμορφο είτε φυσιολογικό (wild type) είτε μεταλλαγμένο. Στον πίνακα 1.2 παρατίθενται νοσήματα και τα αντίστοιχα γονίδια στα οποία χρησιμοποιείται η μέθοδος PTT. Πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών υπάρχουν ήδη για τις εφαρμογές της μεθόδου PTT στα γονίδια APC [7,8], ATM [9], BRCA1/2 [10-15], στα γονίδια του κληρονομούμενου μη-πολυποδιασικού καρκίνου του παχέος εντέρου [16] της νευρινωμάτωσης [17] και της μυϊκής δυστροφίας [18-20].

Πίνακας 1.2. Εφαρμογές της μεθόδου PTT στη Μοριακή Γενετική.

Νόσημα	% Μεταλλάξεων που οδηγούν σε συντημημένη πρωτεΐνη	Γονίδιο
Duchenne Μυϊκή Δυστροφία (DMD)	>95	DMD
Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP)	>95	APC
Νόσος πολυκυστικών νεφρών	95	PKD1
Αταξία-τελεαγγειεκτασία	90	ATM
Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού-ωοθηκών	87	BRCA1
Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού	87	BRCA2
Emery-Dreifuss Μυϊκή Δυστροφία	80	EMD
Αναιμία Fanconi	80	FAA
Κληρονομούμενος μη-πολυποδιασικός καρκίνος παχέος εντέρου, τύπος 1	80	hMSH2
Κληρονομούμενος μη-πολυποδιασικός καρκίνος παχέος εντέρου, τύπος 2	70	hMLH1
Νευρινωμάτωση τύπος 1	50	NF1
Νευρινωμάτωση τύπος 2	65	NF2
Σύνδρομο Hunter	50	IDS

4. Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα της μεθόδου PTT

Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου PTT είναι η δυνατότητα άμεσης ανίχνευσης μεταλλάξεων με παθογνωμική αξία σε ένα μεγάλο τμήμα DNA. Το είδος των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται μέσω της PTT στις νόσους που προαναφέρθηκαν, αντιστοιχούν σε ασθενείς με βαριά μορφή της νόσου ενώ είναι γνωστό ότι ασθενείς με παρανοηματικές μεταλλάξεις –τις οποίες δεν ανιχνεύει η μέθοδος- έχουν ηπιότερη μορφή της νόσου ή και δεν νοσούν καθόλου: αυτό εξαρτάται και από το είδος (συντηρητική–μη συντηρητική) και από τη θέση της νοηματικής μετάλλαξης π.χ. αν εντοπίζεται σε λειτουργική περιοχή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Ένα άλλο μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου PTT είναι η δυνατότητα σχετικά εύκολου εντοπισμού της θέσεως της μετάλλαξης με τη βοήθεια της ένδειξης του πρωτεϊνικού μεγέθους του συντμημένου μεταλλαγμένου αλληλίου. Έτσι παρέχεται η δυνατότητα να ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη με τη μέθοδο ανάγνωσης αλληλουχίας συνήθως με μια μόνο αντίδραση.

Κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου PTT αποτελούν η αδυναμία ανίχνευσης παρανοηματικών και σιωπηλών μεταλλάξεων στην κωδικοποιούσα περιοχή καθώς και πολυμορφισμών σε μη κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων καθώς δεν υπάρχει τρόπος να σαρωθούν οι περιοχές αυτές των ιντρονίων με τη μέθοδο PTT. Τα παραπάνω μειονεκτήματα σε ορισμένα γονίδια αποτελούν σε τελική ανάλυση πλεονεκτήματα καθώς δεν καθυστερεί η ανάλυση με την ανίχνευση μη σημαντικών γενετικών αλλαγών. Μικρές προσθήκες ή απαλοιφές που διατηρούν το πλαίσιο ανάγνωσης –πολλαπλάσια του 3- ή το αλλάζουν αλλά δεν καταλήγουν σε κωδικόνιο τερματισμού μέσα στο πρωτεϊνικό τμήμα που εξετάζεται επίσης περνούν απαρατήρητες με τη μέθοδο PTT.

Δυσκολίες στην ανίχνευση μεταλλάξεων με την μέθοδο PTT μπορεί να προκύψουν: α) όταν η μετάλλαξη εντοπίζεται στην αρχή του DNA τμήματος που μεταφράζεται και κατά συνέπεια το συντμημένο πρωτεϊνικό κομμάτι έχει πολύ μικρό MB και εξέρχεται νωρίς από το πήκτωμα και β) όταν η μετάλλαξη είναι στο τέλος του οπότε δεν διαχωρίζεται εύκολα από το κανονικό αλληλόμορφο. Τέτοιες ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις αποφεύγονται με την εμπειρία του χρήστη, την αλλαγή των πειραματικών συνθηκών της ηλεκτροφόρησης καθώς και με το σχεδιασμό καλά αλληλεπικαλυπτόμενων περιοχών προς PTT. Επίσης ψευδώς αρνητικά θα είναι τα δείγματα στα οποία η μετάλλαξη ευρίσκεται είτε στο αρχικό κωδικόνιο της μετάφρασης είτε στις περιοχές των εκκινητών της PCR. Ένα επίσης φαινόμενο που απαιτεί προσοχή όταν το αρχικό υλικό είναι RNA, είναι η αποικοδόμηση λόγω αστάθειας του μεταλλαγμένου RNA (nonsense-mediated decay). Στην περίπτωση αυτή η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου μετά την αιμοληψία μπορεί να βοηθήσει [21]. Βέβαια μείωση της ποσότητας

RNA και κατά συνέπεια και προϊόντος PCR από cDNA μπορεί να προκύψει και από μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου ή από άλλη αιτία γονιδιακής σίγασης (gene silencing) το οποίο πιθανόν να γίνει αντιληπτό από έμπειρο χρήστη. Ψευδώς θετικές αντιδράσεις στη μέθοδο PTT είναι σπάνιες και πρόκειται συνήθως για μεταλλάξεις πολύ κοντά στο COOH-τελικό άκρο της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να παραμένει λειτουργική και να μην αντιστοιχεί σε κλινικό φαινότυπο.

Η ευαισθησία της μεθόδου PTT είναι πολύ καλή: αγγίζει το 5-10% δηλαδή εάν αναμιχθούν 10 δείγματα εκ των οποίων το ένα είναι μεταλλαγμένο μπορεί και ανιχνεύσει το ένα μεταλλαγμένο αλληλίο [22].

Στις πρόσφατες εξελίξεις και βελτιώσεις της μεθόδου PTT αξίζει να επισημάνουμε τη δυνατότητα αξιοποίησης του c-myc ή άλλου αμινοτελικού επιτόπου ο οποίος ενσωματώνεται στην παραγόμενη πρωτεΐνη κατά το στάδιο της μεταγραφής και μετάφρασης. Με τον τρόπο αυτό τα αποτελέσματα είναι πολύ καθαρά, χωρίς αυξημένο μη ειδικό σήμα (background) καθώς ανιχνεύεται μόνο το πρωτεϊνικό προϊόν που ξεκινάει από την αρχή της μετάφρασης. Η παράλληλη χρήση και καρβοξυτελικού επιτόπου (ή επιτόπων σε διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης) δίνει τη δυνατότητα τελικής ανίχνευσης με τεχνική τύπου ELISA sandwich με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του c-myc επιτόπου να προσδένεται στα πλακίδια μικροτιλοδότησης και ένα δεύτερο έναντι του καρβοξυλικού επιτόπου να χρησιμοποιείται για την ανίχνευση [4]. Δοκιμάζονται επίσης νέα πρωτόκολλα PTT με επιλογή μετά από ομόλογο ανασυνδυασμό σε ζυμομύκητα [23], πολλαπλής PTT (multiplex PTT) όταν τα κομμάτια διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, PTT σε συνδυασμό με ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing, IEF) για την ανίχνευση παρανοηματικών μεταλλάξεων και τέλος λειτουργικά τεστ στη πρωτεΐνη που σχηματίζεται (ενζυμική δραστηριότητα, δέσμευση σε DNA ή άλλη πρωτεΐνη) που αποτελούν και το μέλλον της μεθόδου [22].

5. Βιβλιογραφία

- [1] Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. The IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem 1997;43:1114-28.
- [2] Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. Neuromuscul Disord 1993;3:391-4.
- [3] Rowan AJ, Bodmer WF. Introduction of a myc reporter tag to improve the quality of mutation detection using the protein truncation test. Hum Mutat 1997;172-6.

- [4] Kahmann S, Herter P, Kuhnen C, Muller KM, Muhr G, Martin D et al. A non-radioactive protein truncation test for the sensitive detection of all stop and frameshift mutations. *Hum Mutat* 2002;19:165-72.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, Boumba D, Lianidou ES et al. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. *Hum Mutat* 2000;16:272-3.
- [7] van der Luijt R, Khan PM, Vasen H, van Leeuwen C, Tops C, Roest P et al. Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994;20:1-4.
- [8] Frayling IM, Rowan AJ. Searching for mutations: familial adenomatous polyposis as a case study. In: Elles R, ed. *Molecular diagnosis of genetic diseases*. Totowa, NJ: Humana Press, 1996:63-98.
- [9] Broeks A, de Klein A, Floore AN, Muijtjens M, Kleijer WJ, Jaspers NG et al. ATM germline mutations in classical ataxia-telangiectasia patients in the Dutch population. *Hum Mutat* 1998;12:330-7.
- [10] Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995;10:208-12.
- [11] Plummer SJ, Anton-Culver H, Webster L, Noble B, Liao S, Kennedy A et al. Detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Hum Mol Genet* 1995;4:1989-91.
- [12] Ozcelik H, Antebi YJ, Cole DE, Andrulis IL. Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation. *Hum Genet* 1996;98:310-2.
- [13] Garvin AM. A complete protein truncation test for BRCA1 and BRCA2. *Eur J Hum Genet* 1998;6:226-34.
- [14] FitzGerald MG, MacDonald DJ, Krainer M, Hoover I, O'Neil E, Unsal H et al. Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med* 1996;334:143-9.
- [15] Lancaster JM, Cochran CJ, Brownlee HA, Evans AC, Berchuck A, Futreal PA et al. Detection of BRCA1 mutations in women with early-onset ovarian cancer by use of the protein truncation test. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:552-4.
- [16] Bapat BV, Madlensky L, Temple LK, Hiruki T, Redston M, Baron DL et al. Family history characteristics, tumor microsatellite instability and germline MSH2 and MLH1 mutations in hereditary colorectal cancer. *Hum Genet* 1999;104:167-76.
- [17] Klose A, Peters H, Hoffmeyer S, Buske A, Luder A, Hess D et al. Two independent mutations in a family with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Am J Med Genet* 1999;83:6-12.
- [18] Koning Gans PA, Ginjaar I, Bakker E, Yates JR, Den Dunnen JT. A protein truncation test for Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EMD): detection of N-terminal truncating mutations. *Neuromuscul Disord* 1999;9:247-50.
- [19] Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993;2:1719-21.

- [20] Tuffery-Giraud S, Chambert S, Demaille J, Claustres M. Genotypic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999;57:417-26.
- [21] Bateman JF, Freddi S, Lamande SR, Byers P, Nasioulas S, Douglas J et al. Reliable and sensitive detection of premature termination mutations using a protein truncation test designed to overcome problems of nonsense-mediated mRNA instability. *Hum Mutat* 1999;13:311-7.
- [22] Den Dunnen JT, van Ommen GJ. The protein truncation test: A review. *Hum Mutat* 1999;14:95-102.
- [23] Ishioka C, Suzuki T, FitzGerald M, Krainer M, Shimodaira H, Shimada A et al. Detection of heterozygous truncating mutations in the BRCA1 and APC genes by using a rapid screening assay in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2449-53.