



Moleculair biologische technieken voor de detectie van CYP2D6- en CYP2C19-allelen

S.A. van der Vlies¹ en J.F.M. Roijers².

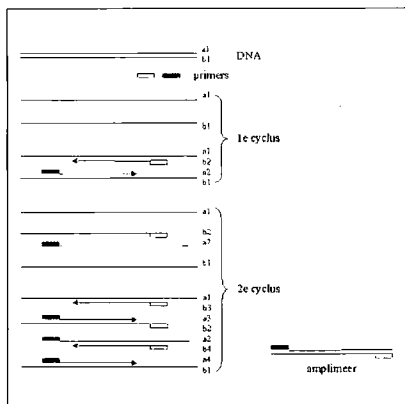
¹ ZiekenhuisApotheek Midden-Brabant (ZAMB) en ² Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium (CKCHL)

TweeSteden Ziekenhuis,
Dr. Deelenlaan 5, 5042 AD Tilburg.

De cytochrom P450 iso-enzymen CYP2D6 (debrisoquine-4-hydroxylase) en CYP2C19 (mefenytioïne-4-hydroxylase) zijn betrokken bij de omzetting en afbraak van veel geneesmiddelen. De activiteit van deze enzymen is, door de aanwezigheid van polymorfismen, voor een deel genetisch bepaald. Om de meest voorkomende allelen van de iso-enzymen CYP2D6 en CYP2C19 op DNA-niveau aan te tonen wordt gebruik gemaakt van een aantal verschillende moleculair biologische technieken: tetraprimer PCR, long PCR, PCR gevolgd door een digestie en real-time PCR. Dit artikel beschrijft de theoretische achtergrond van deze moleculair biologische technieken.

DNA-isolatie

Als uitgangsmateriaal voor de verschillende moleculair biologische technieken wordt DNA gebruikt dat geïsoleerd wordt uit kernhoudende bloedcellen, de leukocyten. Daartoe dienen deze cellen gescheiden te worden van de kernloze erythrocyten. Dit gebeurt door de rode bloedcellen uit volbloed selectief te lyseren. Na verwijdering van het lysaat wordt aan de overgebleven leukocyten een cell lysis oplossing toegevoegd waardoor ook deze cellen lyseren en het DNA uit de kernen vrij kan komen. Tijdens een eiwitprecipitatie stap worden alle vrijgekomen eiwitten en celwandresten neergeslagen. Door aan het supernatant isopropanol toe te voegen wordt het aanwezige DNA geprecipiteerd. Na een wasstap met 70%



Figuur 1. De figuur laat de verschillende stappen van de PCR zien, denaturatie, annealing en elongatie. Tijdens een PCR is de toename van het uitgangs DNA door herhaling van deze stappen exponentieel, met een factor 2ⁿ.

ethanol wordt het DNA opgelost en kan indien nodig de concentratie en de zuiverheid van het DNA bepaald worden.

PCR (PolymeraseChainReaction)

Tijdens een PCR wordt gebruik gemaakt van synthetische oligonucleotiden die in overmaat aan het DNA worden toegevoegd. Deze primers bestaan uit een stukje DNA van ongeveer 20 nucleotiden, die complementair zijn aan de gebieden aan weerszijden van het te onderzoeken, oftewel te amplificeren, DNA-gebied. Door het dubbelstrengs DNA te verhitten tot 95°C smelt het uit elkaar en ontstaat enkelstrengs DNA. Na deze denaturatiestap volgt de annealingstap. De temperatuur wordt weer verlaagd tot ongeveer 55°C (deze temperatuur is afhankelijk van de nucleotidevolg-orde en lengte van de primers) waardoor de primers aan hun complementaire stuk DNA hybridiseren. De stukken dubbelstrengs DNA (primer gebonden aan DNA) kunnen als startplaats dienen voor het enzym

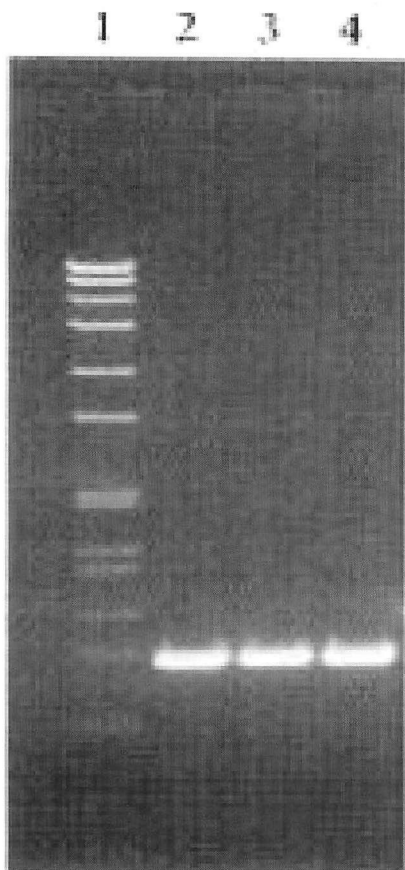
taq-polymerase, voor de synthese van de complementaire DNA-strengen, de zogenaamde elongatie-stap. Bij een herhaling van de denaturatie- en annealingstap zullen de primers niet alleen het oorspronkelijke DNA binden maar ook de nieuw gesynthetiseerde complementaire DNA-strengen. Vervolgens zal bij elke herhaling van deze cyclus het DNA gelegen tussen de twee primers opnieuw verdubbeld worden. Na 20-30 ronden is het te onderzoeken DNA-gebied dan ook enkele miljoenen malen geamplificeerd en is een hoeveelheid DNA ontstaan die gedetecteerd kan worden (zie Figuur 1).

Gel elektroforese

De PCR-producten kunnen gedetecteerd worden op een agarose-gel waarin scheiding op basis van fragmentgrootte plaatsvindt. Een kleiner fragment kan sneller door het agarosenetwerk heen migreren en zal daardoor in de gel een grotere afstand afleggen dan een groter fragment. Het migratiepatroon en de fragmentscheiding is afhankelijk van het agarose-percentage in de gel. Aan de gel wordt ethidiumbromide toegevoegd dat zich hecht aan de binnenzijde van de α -helix van het DNA tussen de organische basen, met name guanine. Door na de elektroforese de gel aan te stralen met UV-licht gaat het gebonden ethidiumbromide fluoresceren. Dit bandenpatroon wordt middels een polaroid foto vastgelegd. Om de fragmentgrootte van het PCR-product te kunnen bepalen wordt op de gel een marker aangebracht. Deze marker bestaat uit een aantal DNA-fragmenten van bekende grootte die na elektroforese een bekend migratiepatroon vertonen (zie Figuur 2).

Tetraprimer PCR

Een tetraprimer PCR is een PCR die



Figuur 2. Voorbeeld van een polaroid foto van een 1%-agarose-gel uitgevoerd als detectie van een PCR-product. In laan 1 is een bekende DNA-marker (marker III van Roche Applied Science) opgebracht en laan 2 t/m 4 laten een PCR-product zien.

uitgevoerd wordt met 4 primers, die specifiek of het normale of het afwijkende allel amplificeren. Zoals figuur 3 laat zien, zullen de zogenoemde allel-specifieke primers A en G alleen aan het DNA kunnen binden bij aanwezigheid van respectievelijk allel A of allel G. Deze binding komt namelijk alleen tot stand als de primers volledig complementair zijn met het DNA van het uitgangsmateriaal. In het geval van allel A is het uiteinde van primer G niet complementair waardoor geen binding aan het DNA volgt en *taq*-polymerase geen nieuwe DNA streng kan amplificeren. Hetzelfde geldt voor primer A bij allel G. Bij homozygotie voor allel A (dus 2 allelen A) zal het controle PCR-product van primer P1 en P2 ontstaan en het allel A-specifieke

product geamplificeerd worden met primers P1 en A. Indien er sprake is van homozygotie voor allel G ontstaat hetzelfde controle fragment en het G allel-specifieke fragment dat wordt geamplificeerd door primers G en P2. Bij heterozygotie, zowel allel A als allel G zijn aanwezig, zullen alle drie eerdergenoemde producten ontstaan. De ontstane PCR-producten worden gevisualiseerd d.m.v. gel-elektroforese waarbij aan de hand van de bandenpatroon geconcludeerd kan worden welke allelen aanwezig zijn in de cellen van de patiënt (zie Figuur 3).

Long PCR

Het aantonen van een grote deletie of duplicatie wordt gedaan m.b.v. een zogenaamde long PCR. Afhankelijk van de aanwezigheid van een deletie of duplicatie wordt er een extra PCR product gevormd. Het verschil tussen een standaard PCR en een long PCR is het gebruik van een ander DNA-polymerase, dat geschikt is voor de amplificatie van een lang PCR-product.

PCR gevolgd door digestie

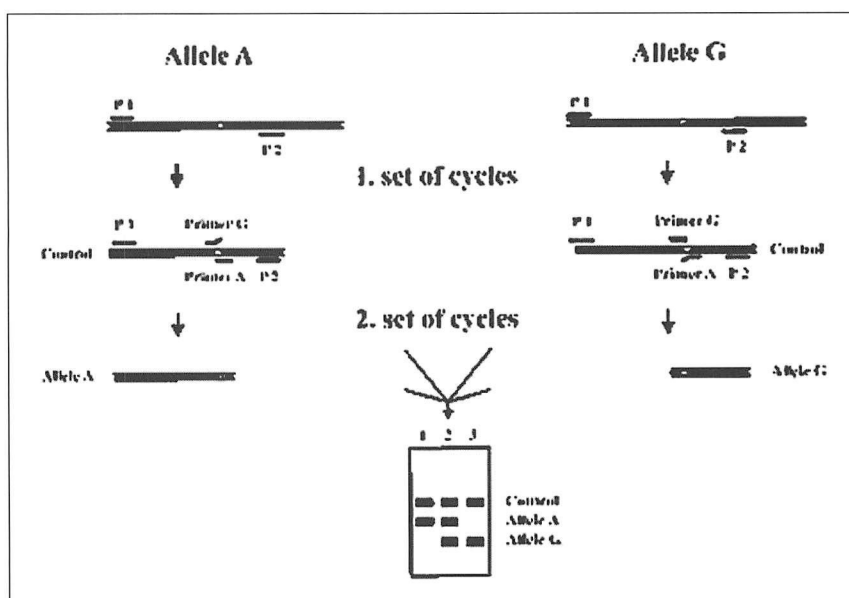
Het wel of niet aanwezig zijn van een puntmutatie wordt aangetoond d.m.v. een PCR-amplificatie gevolgd door een digestie van het gevormde PCR-product. Een digestie wordt uit-

gevoerd m.b.v. restrictie-enzymen. Restrictie-enzymen zijn bacteriële enzymen die specifieke nucleotiden-volgorde van vier, vijf of zes basen in het DNA kunnen herkennen en knippen. Wanneer een restrictie-enzym een 'knipplaats' in het DNA herkent, bindt het enzym zich op die specifieke plaats en verbreekt de beide suiker-fosforzuurketens van de dubbelstreng. Door een enzym te selecteren, dat afhankelijk van de aan- of afwezigheid van een mutatie wel of niet knipt, kan met deze methode de aanwezigheid van een bepaalde mutatie worden aangetoond. De verschillende fragmenten die tijdens de digestie ontstaan kunnen op een agarose-gel op basis van het bandenpatroon gedetecteerd worden.

Real-time PCR

Met dit type PCR worden puntmutaties aangetoond door een PCR amplificatie, gevolgd door een smeltcurve-analyse uitgevoerd met sequentie-specifieke hybridisatie probes (zie figuur 4). Een probe is een stuk enkelstrengs DNA, dat gelabeld is en door hybridisatie complementaire nucleotidenvolgorde in het DNA kan herkennen.

Voor de uitvoering van de real time PCR wordt gebruik gemaakt van een



Figuur 3. Tetra-primer PCR met primers P1, P2, A en G.

gen, aan het enkelstrengs DNA binden. Indien de Fluoresceïn gelabelde probe en de LC Red gelabelde probe op de juiste posities aan het enkelstrengs DNA binden, wordt er een lichtsignaal uitgezonden. De sterkte van dit lichtsignaal wordt gemeten m.b.v. de Fluorimeter in de Light Cyclor. Vervolgens wordt de temperatuur heel langzaam ($0,1^{\circ}\text{C/s}$) verhoogd tot 85°C . Gedurende deze temperatuurstijging wordt het lichtsignaal continu gemeten. Afhankelijk van het feit of de sensor/mutation probe exact past of niet zal de probe bij een lagere cq. hogere temperatuur van de DNA-streng loslaten. Zodra dit gebeurt verdwijnt ook het lichtsignaal. De temperatuur waarbij het lossmelten van de sensor/mutation probe plaatsvindt wordt de smeltemperatuur genoemd.

Figuur 4. Schematische weergave van een mutatie analyse experiment.

LightCyclor Systeem. Van de smeltcurve wordt de 1° afgeleide genomen waarmee specifieke smeltemperaturen worden uitgerekend (zie figuur 5). In eerste instantie wordt een standaard PCR uitgevoerd met specifieke primers voor het te amplificeren DNA-gebied. Na de laatste

PCR-cyclus volgt meteen de smeltcurve-analyse. Het PCR-product wordt verhit tot 95°C , waardoor al het dubbelstrengs DNA enkelstrengs wordt. Vervolgens wordt de temperatuur verlaagd tot 40°C , waardoor de toegevoegde fluorescente probes, die over de mutatieplaats lig-

De in dit artikel beschreven analyse-technieken worden in het artikel 'Genotypering als hulpmiddel bij de verklaring van onverklaarbare dosis spiegel relaties' (ook dit nummer) verder vertaald naar de dagelijkse praktijk van het genotyperen. Dit laatstgenoemde artikel beschrijft de toepassing van de moleculair biologische technieken en twee patiënten die middels deze bepalingen genotyped zijn.

Figuur 5. De figuur laat de smeltcurve zien (bovenste figuur) en de 1° afgeleiden hiervan. Het ontstaan van een piek bij een specifieke temperatuur refereert aan de aanwezigheid van een bekende nucleotide (behorend bij het wildtype of het gemuteerde allel) op die positie in het te onderzoeken gen.