

# Rol van DNA/PCR techniek in de oncologie vanuit klinisch-chemisch perspectief

Organisator en voorzitter: Dr. J. ten Kate, Heerlen

## Mutatie-detectie in BRCA1 en BRCA2, genen die predisponeren tot borstkanker

P. DEVILEE

*Anthropogenetica en Pathologie, Leids Universitair Medisch Cluster, Leiden*

Ongeveer 5% van alle borstkanker in Nederland wordt geschat een erfelijke achtergrond te hebben. Er zijn nu twee genen bekend die erfelijk borstkanker veroorzaken en deze zijn BRCA1 en BRCA2 genoemd (voor BREast CAncer 1 en 2). BRCA1 werd in 1990 gekarteerd op chromosoom 17, en op basis hiervan werd de genstructuur in 1994 ontrafeld. BRCA2 ligt op chromosoom 13 en werd eind 1995 ontdekt. Een vrouw die draagster is van een mutatie in BRCA1 heeft tot haar 70ste een kans van ca. 85% om een mammacarcinoom, en van ca. 60% om een ovariumcarcinoom te ontwikkelen. Men schat dat ongeveer 1 op de 800 vrouwen draagster is van zo'n mutatie. De borstkanker risico's van BRCA2 liggen vermoedelijk in dezelfde orde van grootte als die van BRCA1, maar het ovariumkanker risico lijkt echter veel lager. BRCA1 en BRCA2 zijn complexe genen, bestaande uit resp. 24 en 27 exonen, die eiwitten van resp. 1.863 en 3.418 aminozuren coderen. Inmiddels zijn wereldwijd in meer dan 300 families mutaties in

BRCA1, en in meer dan 100 families in BRCA2 gevonden. Veruit de meeste mutaties leiden tot een korter eiwit, dat vermoedelijk z'n normale cellulaire functie verloren heeft. Verder komen deze mutaties verspreid over beide genen voor, hetgeen een efficiënte en snelle opsporing ervan technisch zeer bemoeilijkt. De 'protein truncation test' (PTT), die specifiek translatie-terminerende mutaties oppikt, is zeer efficiënt gebleken als mutatie-screening module, vooral ook omdat beide genen zeer grote exonen (>3.3 kb) bevatten, die eenvoudig, met genomisch DNA als bron voor erfelijk materiaal, met behulp van PCR in enkele partieel overlappende fragmenten te onderzoeken zijn. Het toepassen van PTT op de kleinere exonen (ca. 40-50% van het totale coderende deel) lijkt minder robuust in een klinisch-genetische routine, waarbij men afhankelijk is van de expressie-niveaus van BRCA1 en BRCA2 in bloed-lymfocyten. De huidige stand van zaken hieromtrent zal geschetst worden.

## Kanker, een ziekte van het DNA

J. ten KATE

*Klinisch Chemisch Laboratorium, De Wever Ziekenhuis, Heerlen*

Gedurende de afgelopen 20 jaren is enorm veel onderzoek gedaan op het gebied van moleculaire biologie en kanker. Het is in die jaren duidelijk geworden dat kanker wordt veroorzaakt door de opeenstapeling van een aantal mutaties in genen van een bepaalde cel. Zo'n cel ontloopt zich na een jarenlang proces tot kanker. De publicaties van met name de groep van Vogelstein hebben veel inzicht gegeven in de opeenhoping van mutaties welke uiteindelijk aanleiding geeft tot kanker van de dikke darm. De genen die cruciaal zijn bij dit proces blijken voor het grootste deel betrokken te zijn bij (de regulatie van) de celcyclus. Mutaties in zogenaamde proto-oncogenen en tumor-suppressorgenen zijn onlosmakelijk verbonden met het ontstaan van kanker.

Tegen de bovengenoemde mutaties heeft een cel verdedigingsmiddelen. Deze verdedigingsmiddelen zijn apoptose enerzijds en de beperkte hoeveelheid celdelingen van een cel anderzijds. Ook mutaties in de genen die betrokken zijn bij deze verdediging werken carcinogeen.

Bij een genetisch niet belast persoon duurt de ontwik-

keling van een maligne tumor decades. Ten gevolge van genetische predispositie kan dit proces sterk worden versneld.

Naast de voornoemde mechanismen is er als wapen tegen mutaties ook het 'normale' DNA repair systeem, waardoor de meeste kankersoorten toch als ouderdomsziekte kunnen worden gezien. Afwijkingen in het DNA repair systeem kunnen ook aanleiding geven tot allerlei vormen van kanker. Mutaties die in verband gebracht zouden kunnen worden met tumorprogressie en metastasering zijn nog slecht gekend en begrepen. Spannende ontwikkelingen zijn er zeker op het gebied van angiogenese en cel adhesie.

De kennis die nu voorhanden is kan zeker diagnostisch worden toegepast, maar ook voor de follow up zijn er goede mogelijkheden. De zoektocht naar ideale tumormerkers op eiwit niveau heeft de afgelopen decennia, met uitzondering van PSA, relatief weinig opgeleverd. De DNA en RNA mogelijkheden van dit moment lijken vele uitdagende mogelijkheden te bieden, waarmee de 'ideale' tumormerker voor meer tumorsoorten in het zicht komt.

## Nieuwe ontwikkelingen in de diagnostiek van hematologische maligniteiten

E.J.B.M. MENSINK

*Centraal Hematologisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Nijmegen*

Er zijn veelbelovende ontwikkelingen op het terrein van de geautomatiseerde detectie en kwantificering van producten afkomstig van een polymerase ketting reactie (PCR). Ingenieuze biochemische technologie wordt gekoppeld aan nieuwe apparatuur ontwikkelingen waarbij van fluorescerende merkstoffen en lasertechnologie gebruik wordt gemaakt (Prism7700<sup>a</sup>).

De Taqman<sup>a</sup> technologie gebruikt een DNA probe die intern, d.w.z. tussen de PCR primers, is gelocaliseerd. Deze probe is uitgerust met twee speciale moleculaire groepen: aan de 5' kant een fluorescerende merkstof ('reporter') en aan de 3' kant een molecuul dat de uitgezonden fotonen opvangt en uitdooft ('quencher'). Het fluorescerende label wordt pas zichtbaar boven de achtergrond wanneer beide groepen ruimtelijk van elkaar worden gescheiden. Wanneer tijdens de PCR de dubbelstrengs DNA moleculen worden opgesmolten kan de Taqman probe binden aan de complementaire sequentie, mits aanwezig. Wanneer Taq polymerase tijdens de extensie fase van de PCR de Taqman probe ontmoet, wordt deze door de exonuclease activiteit van het polymerase gehydrolyseerd. De fluorescerende groep die aan een nucleotide is ge-

koppeld wordt daarmee losgeknipt en een fluorescentie signaal wordt meetbaar. Omdat hybridisatie aan de probe hydrolyse voorafgaat is dit signaal daarmee tevens een confirmatie test op de juistheid van de gegenereerde DNA basenvolgorde. Daarmee is een vervolgstap zoals 'Southern blotting' overbodig geworden. De meting wordt volledig uitgevoerd in het gesloten reactievatje dat niet geopend hoeft te worden wat de kans op overdrachtsbesmettingen minimaliseert. Verschillende labels kunnen (in een reactie) gebruikt worden. 'Real time' monitoring van het amplificatie proces en nauwkeurige kwantificering is daarmee binnen handbereik gekomen.

We laten eerste resultaten zien met als toepassingsgebied de diagnostiek van hematologische maligniteiten. Verschillende leukemieën en lymfomen dragen specifieke moleculaire afwijkingen die als merker voor het aantonen en kwantificeren van de maligne cel kunnen worden gebruikt. Voor sommige ziektebeelden werd al aannemelijk gemaakt dat de dosis van het genproduct van het hybride oncogen van prognostisch belang is.

## Een moleculair diagnostische test in feces voor de vroegdiagnostiek van colontumoren

D.W. SWINKELS

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, St. Radboud*

De laatste jaren is in de literatuur enkele malen gerapporteerd over mutatiedetectie in het *K-ras*-oncogen in feces van patiënten met colorectale tumoren, waarmee nieuwe diagnostische mogelijkheden voor colorectale tumoren worden geopend. Dit geldt met name als ook mutaties in het *p53*-gen en het *APC*-gen in feces zouden kunnen worden opgespoord.

In de praktijk wordt de detectie van gemuteerd humaan DNA in feces echter gecompliceerd door de niet optimale kwaliteit van het DNA, de achtergrond van normaal humaan DNA, de aanwezigheid van bacterieel DNA en PCR-inhiberende factoren. De gevoeligheid van detectie zou verhoogd kunnen worden wanneer het uitgangsmateriaal voor de PCR verrijkt is voor de DNA-fragmenten van interesse. Resultaten van experimenten om voor *K-ras* te verrijken met genspecifieke probes gebonden aan zowel

polystyreen latexbolletjes als aan magnetische bolletjes zullen worden gepresenteerd.

Na isolatie van specifieke DNA fragmenten zoals het *K-ras*-gen kan mutatiedetectie worden uitgevoerd. Detectie van gelokaliseerde mutaties zoals bij *K-ras* is relatief eenvoudig. Voor mutaties, die variëren in lokalisatie binnen het gen (*APC* en *p53*), is dit gecompliceerder. Gangbare methoden (SSCP en PTT) zijn waarschijnlijk niet voldoende sensitief. Eigen resultaten met een recente methode welke gebruik maakt van het bacteriële eiwit MutS zullen worden gepresenteerd.

De ontwikkeling van een moleculaire vorm van vroegdiagnostiek voor colorectale carcinomen in feces lijkt te zijn ingezet. De praktijk illustreert echter dat nog vele hindernissen zullen moeten worden overwonnen.

## Molecular Biological Characterization of Prostate-Specific Antigen (PSA)

M.A. BLANKENSTEIN

*Academic Hospital Utrecht, Utrecht*

Circulating prostate-specific antigen (PSA) is an almost ideal tumor marker. It is helpful in screening for prostate cancer (PC), establishing the diagnosis,

assessment of grade and stage of the tumour, involvement of the skeleton in newly diagnosed patients and monitoring the course of disease. Multiple forms of

PSA prevail in the circulation and measurement of the free/total PSA ratio (F/T) can be helpful to discriminate between prostate cancer and hyperplasia in patients with moderately elevated total PSA. Apart from the regular PSA forms i.e. free PSA, and PSA complexed to  $\alpha_1$ -antichymotrypsin or  $\alpha_2$ -macroglobulin, aberrant PSA forms may exist. In a patient with stage D PC, whose PSA showed a differential immunoreactivity in different assays, approximately 50% of the immunoreactive PSA was uncomplexed (van Duijnhoven et al, Clin Chem 1996; 42: 637-641). Retrospective reverse transcriptase (RT)-PCR analysis of mRNA recovered from paraffin sections of the surgical specimen has led to the discovery that apart from wild type PSA a mRNA prevailed with an in-frame deletion of 123 nucleotides, which would encode for a protein missing 41 amino acids. A sim-

ilar mRNA has been found in other specimens and we are investigating the (patho)-physiological consequences of this finding.

RT-PCR of PSA mRNA can also be used to evaluate the prevalence of cancer cells in the circulation. In view of the extreme sensitivity of the RT-PCR technique and the moderate specificity of PSA for prostate tissue, other, more tissue specific components of the prostatic cell, like prostate-specific membrane antigen or DD3, might supersede PSA for this purpose, but this is still under investigation.

The concept of detecting tumour cells in the circulation is a fascinating one and hopefully develops into a useful tool which can be used as an aid to provide the best possible care for patients with prostatic neoplasms.

## Erfelijke stofwisselingsziekten

Organisator en voorzitter: Prof. dr. J. M. F. Trijbels, Nijmegen

### Chemische diagnostiek van erfelijke metabole ziekten (CDEMZ): ervaringen in een groot perifere ziekenhuis

F.A.J.T.M. van den BERGH  
*Medisch Spectrum Twente, Enschede*

Ca. 10% van de bevolking heeft in de loop van zijn leven te maken met een aangeboren afwijking welke geheel of gedeeltelijk erfelijk bepaald is. Multifactoriële aandoeningen maken hiervan 4-6 % uit, chromosoomafwijkingen bij pasgeborenen 0,6%, en genmutaties 1,5%. De overige afwijkingen ontstaan t.g.v. ongunstige omgevingsfactoren zoals infecties tijdens de zwangerschap, straling of intoxicatie.

Voor screening en basisdiagnostiek wordt ondermeer gebruik gemaakt van beeldvormende technieken, cytologisch onderzoek op chromosomen (karyogram) en chemische analyse van lichaamsvloeistoffen.

Erfelijke *stofwisselingsziekten* manifesteren zich i.h.a. zeldzaam, waardoor de doorsnee clinicus weinig vertrouwd is met de opsporing van dergelijke ziektebeelden. Ofschoon een uithoek van de kindergeneeskunde, is hun voorkomen als groep (>250 afwijkingen) echter niet te verwaarlozen. Het % opgespoorde afwijkingen is aanzienlijk lager dan theoretisch verwacht. Wordt er wel *diep* genoeg gescreend? In lang niet alle gevallen kan het defect worden vastgesteld. Bovendien is de huidige chemische basisdiagnostiek beperkt tot onderzoek van metabolieten en precursors die betrekkelijk 'gangbaar' zijn. Maar wordt er ook *breed* genoeg gescreend en op de juiste populatie? De onbekendheid

van de clinicus met de wijze waarop een aantal metabole stofwisselingsziekten zich manifesteren, speelt hierbij wellicht ook een rol. Bij klinische verdenking vindt in principe verwijzing plaats naar een kinderarts. Deze schakelt zo nodig een klinisch geneticus in voor verdere diagnostiek en erfelijkheidsadviesing. Ook de klinisch chemicus kan hierbij een belangrijke rol spelen. Zelfs indien het analytische traject zich elders (klinisch genetisch centrum) afspeelt, is goede begeleiding van de pre-analyse (materiaalafname: wat, hoe en wanneer?) en post-analyse (interpretatie van gegevens, vervolgonderzoek) van cruciaal belang.

Overeenkomend met landelijke cijfers, wordt ca. 5% van het aangeboden CDEMZ-materiaal door ons als afwijkend bevonden. Het aantal patiënten zonder meetbare metabole afwijking is echter groot, en vormt een voortdurende uitdaging. Naast ad-hoc begeleiding worden daarom maandelijks alle metabole probleemgevallen met de kinderartsen doorgesproken, terwijl ieder trimester een regionale bespreking volgt met de kinderartsen en specialisten van het WKZ (Utrecht). Daarnaast vindt iedere maand multidisciplinair overleg plaats in de werkgroep Erfelijkheidsadviesing van het klinisch genetisch subcentrum Enschede.