Protein-Truncation-Test

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

Synonym(e) PTT-Test

Englischer Begriff protein truncation; PTT-test

Definition Der Protein-Truncation-Test (PTT) ist eine klassische Methode, auf Proteinebene das Vorhandensein einer Kettenabbruchmutation nachzuweisen.

Beschreibung Mutationen in einem Gen werden aktuell durch Sequenzierung der DNA nachgewiesen und damit auch Vorhersagen gemacht zu einer möglichen Störung bei der Proteinsynthese oder der Proteinfunktion.

Als ein Screeningverfahren auf Proteinebene zum indirekten Nachweis von DNA-Mutationen, die zu einer Verkürzung bzw. Kettenabbruch des translatierten Proteins, also zu einem trunkeierten Protein, führen, wurde der Protein-Truncation-Test (PTT-Test) entwickelt.

Der Test besteht aus 4 Abschnitten:

1. Extraktion von DNA oder RNA
2. Amplifikation der gewünschten Region mittels PCR
3. In-vitro-Transkription und -Translation des PCR-Produkts
4. Detektion des Proteinprodukts mittels PAGE oder Immunoblotting

Bei der Planung des Tests muss die gewünschte Region auf DNA- oder RNA-Ebene festgelegt werden. Da der In-vitro-Test kein Spleißen von Exonen durchführt, kann die gewünschte Region z. B. nur ein Exon aus genomischer DNA

oder aber eine cDNA-Sequenz enthalten. Für die Amplifikation dieser Region werden 2 spezielle Primer eingesetzt. Der Sense-Primer enthält für die gekoppelte In-vitro-Transkription/-Translation am 5'-Ende eine Promotorsequenz (z. B. vom T7- oder T3-Bakteriophagen) gefolgt von wenigen Spacer-Nukleotiden und einem eukaryotischen Transkriptionsinitiationssignal ATG und eine dem eigentlichen Zielsequenz homologe Primersequenz. Der Antisense-Primer enthält neben der homologen Primersequenz ein Stoppcodon für die Proteintranslation. Das isolierte PCR-Produkt wird mittels T7-RNA-Polymerase transkribiert und translatiert. Hierzu stehen entsprechende Kits zur Verfügung. Das Proteinprodukt wird anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot detektiert. Im Falle einer heterozygoten trunkierenden Mutation in dem DNA-Fragment lassen sich im Immunoblot i. d. R. 2 Proteinbanden unterschiedlicher Größe detektieren, nämlich ein höhermolekulares normales und ein niedermolekulares mutiertes Proteinprodukt.

Im günstigen Fall ist es möglich, Angehörige von Patienten mit einer Kettenabbruchmutation mittels Protein-Truncation-Test auf Mutationsträgerschaft zu testen.

Die Anwendung des PTT ist für verschiedene Gene und Erkrankungen beschrieben, wie z. B. Muskeldystrophie Typ Duchenne, hereditäre kolorektale Karzinome, erblicher Brust- und Eierstockkrebs Typ BRCA1/2 oder Neurofibromatose Typ NF1.

Literatur

- Den Dunnen TJ, van Ommen GJ (1999) The protein truncation test: a review. *Hum Mutat* 14:95–102
- Roest PAM, Roberts RG, Sugino S et al (1993) Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 2:1719–1721