

GNA14 Exon 5 Mutationsanalyse bei vaskulären Anomalien

Eva-Maria Tanner, BMA 18-21 B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Diagnostische Molekularpathologie, Institut für Pathologie und Molekularpathologie, Universitätsspital Zürich

1. Zusammenfassung

Mutationen im *GNA14*-Gen und seinen Paralogen *GNAQ* und *GNA11* wurden in verschiedensten vaskulären Anomalien beschrieben. Das Ziel dieser Diplomarbeit ist deshalb die Etablierung der Mutationsanalyse der Exon 5-Sequenz von *GNA14*. Das Vorgehen dazu war eine Kombination aus qualitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sanger-Sequenzierung. Es wurden vier Primer-Paare generiert und die ideale Annealing-Temperatur sowie Aufreinigungsmethode der PCR-Produkte festgelegt. Anschliessend wurde der molekulare Assay an einem Kollektiv aus 13 Patientinnen und Patienten mit verschiedenen vaskulären Anomalien getestet. Dabei wurde eine Mutation im *GNA14*-Gen erfolgreich detektiert sowie auf Mutationen in den Genen *GNAQ* und *GNA11* mit deren bereits in der Routinediagnostik etablierten Assays getestet. Aufgrund der erfolgreichen Etablierung und Austestung an einem Kollektiv, kann die Mutationsanalyse *GNA14* Exon 5 nun in die Routinediagnostik überführt werden.

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel 1: Etablierung der Mutationsanalyse von *GNA14* Exon 5 mittels Kombination aus PCR und Sanger-Sequenzierung.

- Wie müssen die Primer für eine spezifische Amplifikation von *GNA14* aufgebaut sein?
- Wie lautet die optimale Annealing-Temperatur?
- Wie müssen die PCR-Produkte aufgereinigt werden, um eine gut interpretierbare und eindeutige Sequenz zu erhalten?
- Kann mittels Sanger-Sequenzierung das Exon 5 des *GNA14*-Gens deutlich und gut interpretierbar dargestellt werden?

Ziel 2: Austestung der unter Zielsetzung 1 etablierten Mutationsanalyse *GNA14* an potenziell positiven Proben.

- Können mittels Sanger-Sequenzierung Mutationen im Exon 5 des *GNA14*-Gens eindeutig nachgewiesen werden?
- Wie viele dieser Patientinnen und Patienten weisen bei *GNA14* Wildtyp Mutationen in *GNA11* oder *GNAQ* auf?

4. Material, Methodik, Vorgehen

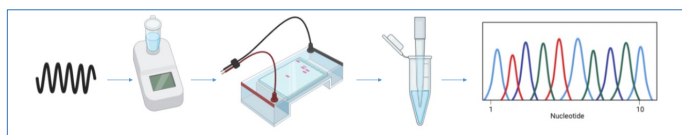


Abb. 1 Prozessdarstellung Methodik (Tanner, 2021)

Es wurden vier Primer-Paare kreiert und mithilfe von Tonsillen-Material auf ihre Annealing-Temperatur und Exon-Spezifität mithilfe der Gradienten-PCR und Sanger-Sequenzierung getestet. Zudem wurde die optimale Aufreinigungsmethode detektiert. Der ganze Prozess, der in Abbildung 1 dargestellt ist, wurde anschliessend anhand eines Patientenkollektivs ausgetestet.

5. Ergebnisse/ Resultate

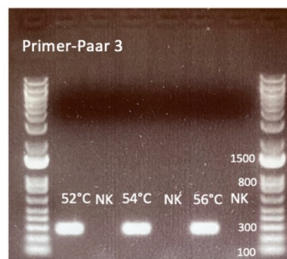


Abb. 2 Resultate Primer-Paar 3 (Tanner, 2021)

Quellenverzeichnis

- [1] Lim et al., 2016, S.445. Doi: 10.1016
 [2] Clemens, Meier & Amann-Vesti, 2014, S.133. Doi: 10.5167

Abbildungen

- Abb. 1 Tanner, E. (2021). *Prozessdarstellung Methodik*. Zürich: Eigene Abbildung
 Abb. 2 Tanner, E. (2021). *Resultate Primer-Paar 3*. Zürich: Eigene Abbildung
 Abb.3 Tanner, E.(2021). *Analyse des Kollektivs aus Patientinnen und Patienten*. Zürich: Eigene Abbildung

2. Einleitung

Die Diagnostische Molekularpathologie am Universitätsspital Zürich bietet eine Reihe an molekularen Assays an. Mit dem Ziel, vaskuläre Anomalien in der Routinediagnostik nachweisen zu können, soll ergänzend zu den bereits etablierten Mutationsanalysen der Gene *GNAQ* und *GNA11* der Mutationsnachweis im Gen *GNA14* etabliert werden.

Das Gen *GNA14* kodiert, gleich wie seine Paraloge *GNA11* und *GNAQ* für die G_{α} -Untereinheiten. Diese bilden gemeinsam mit den Untereinheiten G_{β} und G_{γ} ein Heterotrimer, das G-Protein. Dieses ist in der Lage, Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren [1].

Vaskuläre Anomalien werden entsprechend ihrer biologischen Natur in Tumore und Malformationen unterteilt. Sie sind schwierig zu unterscheiden, zeigen jedoch typische Unterscheidungsmerkmale: vaskuläre Malformationen sind beispielweise bereits ab Geburt vorhanden, während vaskuläre Tumore sich erst nach der Geburt ausbilden können [2].

6. Diskussion/Schlussfolgerungen

Für die Mutationsanalyse *GNA14* wurde das generierte Primer-Paar 3 mit einer SP6r-Sequenz bei einer Annealing-Temperatur von 54°C ausgewählt – mithilfe dieses Primer-Paares (Abbildung 2) und der Aufreinigungsmethode MinElute® PCR Purification Kit konnte das gesamte Exon 5 einwandfrei dargestellt werden. Durch die Analyse des Patientenkollektivs konnte in einem Anastomosierenden Hämangiom (AH) eine c.614A>T Mutation des *GNA14*-Gens detektiert werden. Ausserdem wurden in zwei weiteren Proben je eine Mutation im *GNAQ*-Gen entdeckt: c.627A>C und c.627A>T. Diese Mutationen wurden ebenfalls aus einem AH detektiert. Die Resultate dazu sind in Abbildung 3 zu entnehmen. Ebenfalls in Abbildung 3 ersichtlich sind jene Proben (5, 5Q, 6, 6Q) die nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten. Es konnten somit alle Fragestellungen beantwortet und der molekulare Assay zur Detektion von Mutationen im Gen *GNA14* erfolgreich etabliert werden.

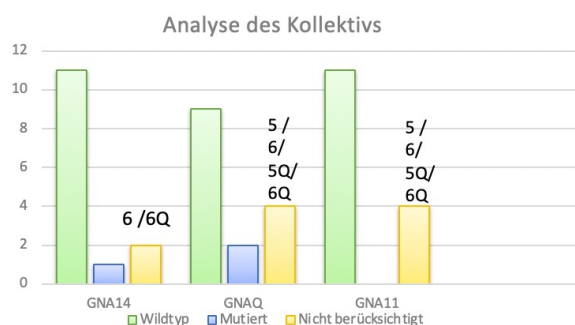


Abb. 3 Analyse des Kollektivs aus Patientinnen und Patienten (Tanner, 2021)