Univerzita Palackého v Olomouci

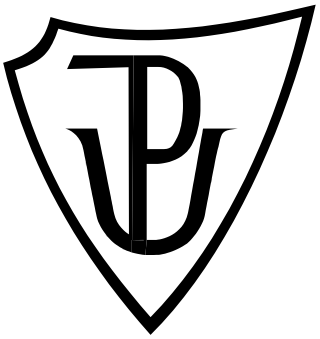
Bakalářská práce

Olomouc 2013 Mira Mazáčová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Použití metody MLPA k detekci chromozomálních aberací v klinické genetice

Bakalářská práce

Mira Mazáčová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013 **Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D.**

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně bez cizí pomoci. Vycházela jsem při tom ze svých znalostí, odborných konzultací a doporučené literatury uvedené v seznamu.

V Olomouci dne: …….. ……

podpis

Poděkování

Úvodem bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Pavlíně Čapkové, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování práce.

Souhrn

Chromozomální aberace jsou jednou z příčin vrozených vývojových vad a vývojového opoždění u člověka. Jejich studiem se zabývá klinická cytogenetika. Základní cytogenetickou metodou je kultivace buněk, zisk metafázních chromozomů a jejich hodnocení. Rozlišovací úroveň této metody je však nízká a subtilnější změny mohou tedy při tomto hodnocení uniknout. K vyřešení tohoto problému byly vyvinuty sofistikovanější metody. Jednou z těchto metod je i metoda MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Aplification), jejíž zavedení a optimalizace pro použití jak v postnatální, tak prenatální cytogenetice bylo cílem této práce.

V bakalářské práci je popisováno provedení a analýza výstupních dat metody MLPA. Diskutovány jsou vlivy hlavních negativních fenoménů metody, jakými jsou nízká koncentrace DNA ve vyšetřovaném vzorku, nekompletní denaturace dvoušroubovice vyšetřované DNA či přítomností ´slopingu´ píků u výstupních elektroforetogramů.

Metodou MLPA bylo vyšetřeno celkem 8 vzorků DNA: 3 vzorky DNA izolované z periferní krve pacientů s idiopatickou mentální retardací, 4 vzorky DNA izolované z tkáně choria a 1 vzorek izolovaný z amniocytů plodové vody. Vzorky byly testovány prostřednictvím komerčně vyráběných a distribuovaných SALSA MLPA kitů P036 a P070, které se specificky vážou na subtelomerické oblasti chromozomu a mohou tak detekovat změny v těchto oblastech. U 6 vyšetřovaných vzorků byla potvrzena očekávaná chromozomální aberace. V 1 případě byla nalezena aberace nová. Výsledky metody MLPA byly následně ověřeny dalšími metodami.

Summary

Chromosomal aberrations play a role in the pathogenesis of congenital malformations or developemental delay. Clinical cytogenetics focuses on these chromosomal aberrations. One of the basic cytogenetic method is cell cultivation, obtaining metaphases chromosomes and their analysis. Differential level of this method is not so sensitive, and cryptic aberrations can evade from detection. Due to this fact new high sensitive methods revealing gains and losses of the genetic material were developed. One of these methods is MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe amplification). Introduction and application of this method in prenatal and postnatal cytogenetic is main goal of this thesis.

This bachelor thesis describes and analyses output data of the MLPA method. Main negative effects of this method are discussed, such as low concentration of DNA in the examined sample, incomplete denaturation of double-stranded DNA or the presence of 'sloping' peaks in the output electrophoretograms.

There were tested 8 DNA samples by MLPA method: 3 DNA samples isolated from peripheral blood of patients with idiopathic mental retardation, 4 DNA samples isolated from chorionic tissue and 1 DNA sample isolated from amniocytes in amniotic fluid. Samples were tested by commercially produced and distributed SALSA MLPA kits P036 a P070 that can specifically bind to the subtelomeric region of the chromosome and detect changes in these areas There were confirmed expected chromosomal aberrations in 6 of the investigated samples. In one case new aberration was found.

OBSAH

1. Úvod 7

1.1 Chromozom a jeho struktura 8
1.1.1 Centromera 9
1.1.2 Telomera 9
1.1.3 Subtelomera 9
1.2 Meióza 10
1.2.1 Význam a poruchy meiózy 11
1.3 Chromozomální aberace a jejich klinický význam 12
1.3.1 Numerické aberace 13
1.3.2 Strukturní chromozomové aberace 15
1.3.3 Subtelomerické aberace chromozomů 18
1.3.4 Detekce chromozomálních aberací 19
1.4 Metoda MLPA- Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification 22
1.4.1 Sondy využívané MLPA metodou 23
1.4.2 Princip reakce 24
1.4.3 Analýza dat 25
1.4.4 Slepé a referenční vzorky 26
1.5 Cíl bakalářské práce 27

2. Soubor a metodika 30

2.1 Biologický materiál 30
2.1.1 Izolace DNA 30
2.2 Přístroje a spotřební materiál 32
2.3 Reagencie použité pro MLPA metodu 32
2.4 Pracovní postup MLPA metody- ´Two tube protocol´ 37

3. Výsledky 40

3.1 Výsledky vyšetření DNA izolované z lymfocytů periferní krve 40
3.1.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036 40
3.1.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070 42
3.1.3 Potvrzení výsledků metody MLPA 45
3.2 Výsledky vyšetření DNA izolované z choriových klků 47
3.2.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036 47
3.2.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070 48
3.2.3 Potvrzení výsledků metody MLPA 52
3.3 Výsledky vyšetření DNA izolované z plodové vody 54
3.3.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036 54
3.3.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070 55
3.4 Souhrnný přehled výsledků vyšetření všech testovaných vzorků a jejich ověření jinými metodami 57

4. Diskuze 58

5. Závěr 60

Seznam použitých zkratek 61

Literatura 62

1. Úvod

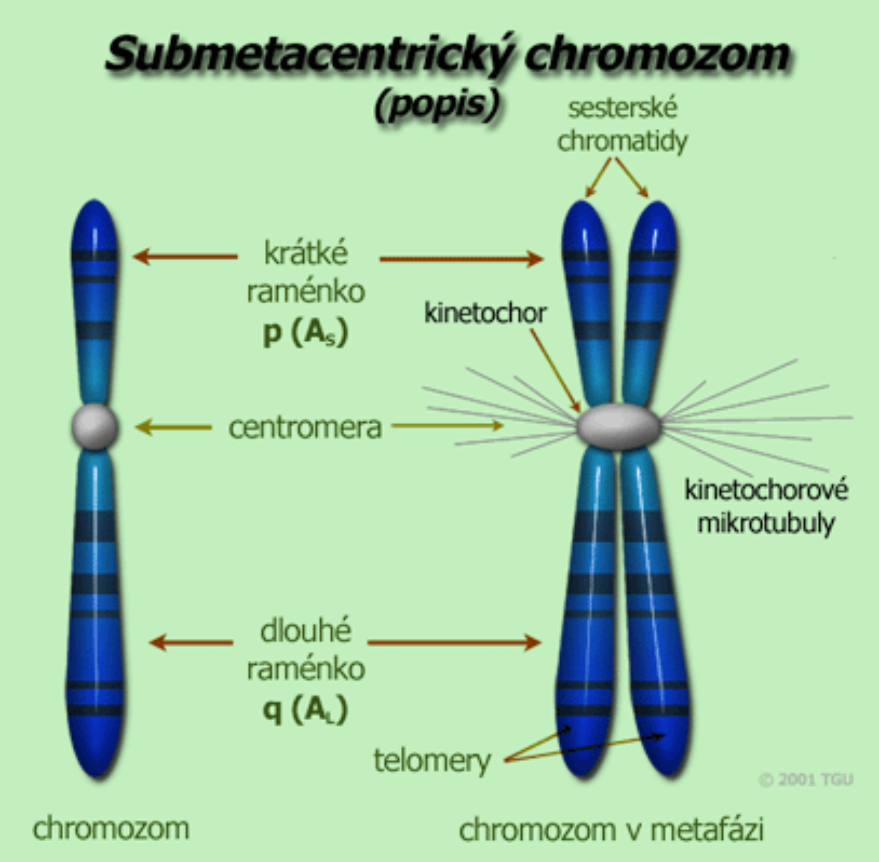
K základním metodám klinické genetiky patří cytogenetická vyšetření neboli analýza chromozomů člověka. Chromozomové vyšetření umožňuje prvotní identifikace ve změnách genetického materiálu a následně může poskytovat přesnější zacílení pro další molekulárně - biologickou diagnostiku (Kočárek, 2007).

Jednotlivé odchylky od normálního počtu či typické struktury chromozomů označujeme jako chromozomální aberace. Tyto aberace hrají jednu z hlavních rolí při vzniku mnoha geneticky podmíněných chorob a syndromů člověka a představují také častou příčinu vzniku idiopatické mentální retardace.

Na vzniku a následném projevu onemocnění, kterým je právě idiopatická mentální retardace, se podílejí zejména chromozomální aberace s rozsahem pod detekční hranicí klasické cytogenetické analýzy. Proto byl nutný rozvoj metod daleko citlivějších, kterými je možno tyto změny zachytit či blíže specifikovat jejich rozsah a charakter. Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na použití jedné z těchto citlivějších metod - MLPA - k detekci chromozomálních aberací.

1.1 Chromozom a jeho struktura

DNA je uložena v útvarech zvaných chromozomy, které u eukaryotického organizmu tvoří jadernou hmotu označovanou jako chromatin. Počet a utváření chromozomů jsou pro každý biologický druh zcela specifické. Každý chromozom nese specifické geny k utváření určitých proteinů a tedy i k vyjádření (expresi) určitých znaků. Počet chromozomů v eukaryotickém jádře bývá konstantní. To znamená, že genetická informace buňky je kompletní a plně funkční pouze v případě, jsou-li přítomny všechny chromozomy v příslušném počtu a standardní struktuře.



Obr. 1 - Schématické znázornění chromozomu (Urban, T. [cit. 19.4.2013]).

1.1.1 Centromera

Eukaryotický chromozom je lineární vláknitý útvar, který je většinou rozdělen centromerou na krátké p a dlouhé q raménko (viz Obr. 1). Centromery živočichů a člověka obsahují velké množství sekvencí DNA, které se mnohokrát opakují, často v dlouhých tandemových blocích. Hlavní funkcí centromery je schopnost vázat se s dělícím vřeténkem při buněčném dělení a následný rozestup homologických chromozomů během meiotické anafáze I. Podobně plní centromery svou funkci i při meiotické anafázi II a jediné anafázi při mitóze, kdy dochází k rozdělení samotných sesterských chromatid.

1.1.2 Telomera

Telomera je úsek repetitivní DNA nacházející se na koncích lineárních chromozomů, především pak u eukaryotických organizmů. Hlavní funkcí telomery je chránit konce chromozomů před jejich degradací deoxyribonukleázami a zároveň jejich fúzí s ostatními chromozomovými konci. Dále umožňují replikaci konců lineárních chromozomů bez ztráty genetického materiálu.

Telomery jsou tvořeny především Thymin - Guaninovými hexamery, které se u lidských chromozomů vyskytují obvykle v 500 - 3000 tandemových repeticích, které se postupně s věkem zkracují. Výjimkou jsou pouze buňky zárodečné linie či rakovinné buňky, u kterých ke zkracování nedochází. Většina telomer je ukončena jednovláknovým přesahujícím úsekem tvořeným opakujícími se Guaninovými bázemi, které se nacházejí na 3´ konci DNA vlákna.

1.1.3 Subtelomera

Subtelomera je specifická oblast sousedící s telomerou. Vytváří tak rozhraní mezi chromozomální DNA a telomerickou částí chromozomu. Každý chromozom tedy obsahuje dvě subtelomerické oblasti (na p a q raménku chromozomu), které jsou z části vytvářeny repetitivními sekvencemi DNA a sekvencemi, které nesou strukturní geny a geny pro rRNA.

Tyto oblasti patří z důvodu repetitivní sekvence mezi tzv. „horká místa“, která velmi často podléhají aberacím - delecím, duplikacím i rekombinacím na daném chromozomovém úseku (Linardopoulou et al., 2005). Vzniklé strukturní změny mohou ovlivňovat fenotyp jedince negativně, což se projevuje u pacientů trpících mentální retardací či v rámci rakovinné buněčné linie. Během evoluce však proběhlo mnoho subtelomerických přestaveb, které vedly k adaptaci organizmů a byly tak evolučně velmi přínosné (Flint et al., 1995).

1.2 Meióza

Meióza je proces redukčního dělení buňky, které probíhá ve dvou po sobě následujících děleních a jehož výsledkem jsou buňky s haploidním počtem chromozomů, pohlavní buňky (gamety). Význam meiózy spočívá v náhodné segregaci otcovských a mateřských chromozomů do pohlavních buněk a tím umožněné genetické variabilitě. Ta je zvýšená mechanizmem crossing - overu.

První meiotické dělení označujeme jako heterotypické neboli redukční. Na jeho počátku stojí diploidní buňka s dvouchromatidovými chromozomy.

Během první profáze- profáze I, se k sobě přikládají homologické chromozomy. Jejich propojení zprostředkuje tzv. synaptonemální komplex složen z mnoha proteinových jednotek. Úplným spojením homologických chromozomů vznikají tzv. bivalenty, ve kterých dochází k procesu nazývanému crossing - over. Při tomto ději se vzájemně vyměňují části chromatid mezi homologickými chromozomy, takže dochází i k novým alelickým kombinacím. V závěru první profáze se homologické chromozomy začínají oddělovat a synaptonemální komplex zaniká. Současně se rozpadá i jaderná membrána.

V metafázi prvního dělení se páry homologických chromozomů (původní bivalenty) shromažďují v ekvatoriální rovině a připojují se na vznikající dělící vřeténko podobně jako při mitóze. Vlákna dělícího vřeténka však od sebe neoddělují chromatidy, ale celé chromozomy z bývalých bivalentů. Do nových dceřiných jader tak přechází vždy jeden homologický chromozom z původního páru.

Telofáze prvního meiotického dělení probíhá stejně jako u mitózy- chromozomy na opačných pólech buňky zpětně dekondenzují, prodlužují se a jejich struktura přestává být zřetelná. V jejím závěru vznikají dvě nová dceřiná jádra, z nichž každé obsahuje haploidní počet chromozomů.

Dceřiné buňky následně vstupují do druhého meiotického dělení označovaného také jako dělení homeotypické či ekvační. Jde v podstatě o mitózu, sloužící k rozdělení dvouchromatidových chromozomů na jednochromatidové.

Z jedné mateřské diploidní buňky tak díky kompletnímu meiotickému dělení (meióza I, meióza II) vzniknou čtyři dceřiné haploidní buňky (Kočárek, 2007).

1.2.1 Význam a poruchy meiózy

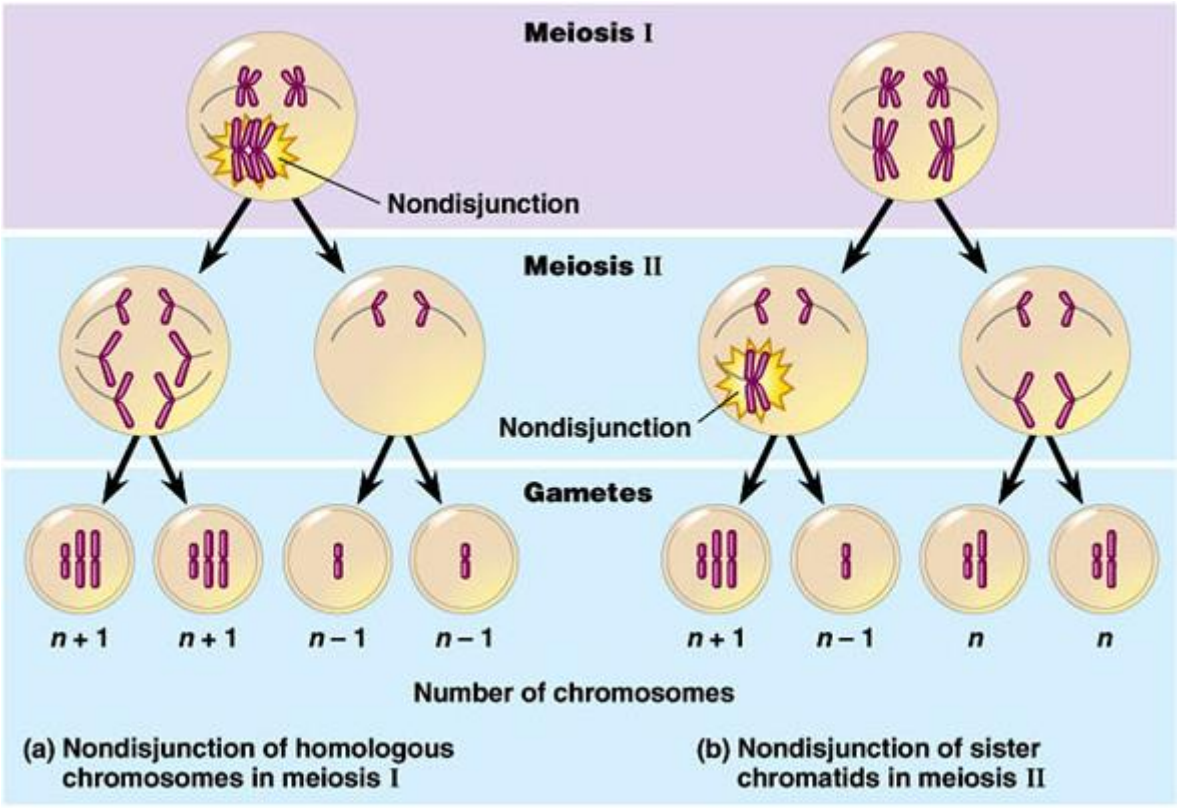
Díky prvnímu meiotickému redukčnímu dělení (meióza I.) je v gametách každý chromozom přítomen pouze v jedné kopii. Zygota tak získává od každého z rodičů pouze jeden z homologických chromozomů. Při svém dalším vývoji podléhá zygota dělení mitotickému, takže genetická výbava, která vznikla při oplození, zůstává neměnná ve všech buňkách celého organizmu.

Při meiotickém dělení dochází k výrazné variabilitě díky nezávislé kombinaci celých chromozomů a také jejich příslušných alel. Dalším významným procesem zprostředkovávajícím obrovskou variabilitu je tzv. crossing - over, při kterém dochází k výměně genetického materiálu mezi nesesterskými chromatidami.

Poruchy meiózy vedou ke vzniku chromozomových aberací, které následně postihují potomstvo. Pokud nedochází ke správnému rozdělení homologických chromozomů v prvním i druhém meiotické dělení, tak mluvíme o tzv. nondisjukci. Tyto změny vedou ke vzniku gamet s abnormálním počtem chromozomů. Vznik nondisjunkce je znázorněn na Obr. 2.

Poruchy struktury chromozomů způsobuje tzv. nerovnoměrný crossing - over. Při tomto mechanizmu nedochází k rovnoměrné výměně genetického materiálu mezi nesesterskými chromatidami chromozomů. Důsledkem tohoto typu crossing - overu je chromozom s duplikovaným úsekem a homologický chromozom, kde tento segment chybí. Tyto změny mohou následně vést ke vzniku aberací typu delecí a duplikací (Kočárek, 2007).

Vrozené chromozomální aberace mohou být zděděné či mohou vznikat de novo v germinálních buňkách při meióze.



Obr. 2 - Schéma meiotické nondisjunkce (Cummings, B. [cit. 19.4.2013]).

1.3 Chromozomální aberace a jejich klinický význam

Chromozomální aberace jsou změny, které přímo nebo nepřímo ovlivňují větší počet genů. To se projevuje zejména u numerických aberací (změn počtu chromozomů), kdy je zmnožena, nebo naopak chybí celá sada genů na jednom nebo více chromozomech. V případě strukturálních změn jsou geny zpravidla deletovány, přerušeny, popř. fúzovány s jinými geny. U většiny aberací je tak zasažen větší počet genů, často i celý genový soubor na jednom chromozomu. Proto se u pacientů s chromozomálními aberacemi většinou nevyskytuje jeden izolovaný defekt, ale mnohočetná postižení různých orgánových soustav. Z tohoto důvodu mají fenotypové projevy chromozomálních vad charakter syndromů. K nejnápadnějším a klinicky nejzávažnějším poruchám patří:

- mentální nebo psychomotorická retardace
- poruchy vývoje centrální nervové soustavy
- skeletální anomálie
- růstová retardace
- deformace končetin a prstů včetně výskytu nadpočetných prstů

- poruchy reprodukce nebo úplná sterilita
- poruchy vývoje genitálu
- vrozené srdeční vady
- anomálie ledvin, trávicího ústrojí a dalších orgánů
- abnormální obličejové rysy – např. šikmé postavení očí, mikroftalmie, hypertelorismus, rozštěp rtu, popř. patra, gotické patro, vznik mikromandibuly, abnormální tvar a posazení ušních boltců
- poruchy nitroděložního vývoje plodu, spontánní potraty
- poruchy imunity
- zhoršení prognózy a extrémní zkrácení délky života
- dispozice k některým nádorovým onemocněním
  (Kočárek et al., 2002).

Cytogenetické aberace jsou detekované u zhruba 0,6 % novorozenců a až u 25 % plodů samovolně potracených nebo mrtvorozených dětí (Shaffer and Lupski, 2000).

Klinický projev chromozomálních aberací (změna fenotypu) závisí na velikosti aberovaného segmentu a také na deleci či duplikaci genu, který chromozomální aberace postihla. Mezi další mechanizmy vzniku patologického fenotypu patří fůze genů, přerušení genů či genová disregulace v místě aberace.

1.3.1 Numerické aberace

Jako numerickou aberaci označujeme jakoukoliv odchylku od normálního počtu chromozomů. Podle toho, zda je zmnožena celá chromozomová sada nebo pouze změněn počet některých chromozomů, rozlišujeme:

- polyploidii, tj. znásobení celé chromozomové sady
- aneuploidii, tj. přítomnost jednoho či více nadbytečných chromozomů, popřípadě chybění jednoho nebo více chromozomů, výsledný počet chromozomů není celým násobkem chromozomové sady (Kočárek, 2007).

Polyploidie

Konkrétními případy polyploidie jsou triploidie (stav, kdy je počet chromozomů v somatických buňkách trojnásobkem haploidní sady), popř. tetraploidie. Tyto stavy počtu chromozomů u člověka postnatálně prakticky nenalézáme. V prenatálním stadiu nacházíme triploidii u 12 – 20 % plodů spontánně potracených v prvním trimestru gravidity (Kočárek, 2007).

Aneuploidie

Aneuploidie označuje početní změny chromozomů, které postihují pouze část genomu, nejčastěji se jedná o změnu chromozomu. Tato definice zahrnuje také části chromozomů: za částečnou aneuploidii se tak může někdy považovat i delece celého ramene chromozomu (Snustad et al., 2009).

- Trizomie

Mezi nejčastější aneuploidie somatických buněk řadíme trizomie, tj. přítomnost nadpočetného chromozomu v karyotypu pacienta (2n + 1). Nejznámější a nejčastější chromozomovou trizomií u člověka je Downův syndrom (viz. Obr. 4), kdy je karyotyp pacienta obohacen o jeden nadpočetný chromozom 21 (47,XY,+21). Trizomie chromozomu 21 může být způsobena:

1) nondisjunkcí v průběhu I. nebo II. meitoického dělení a v tomto případě jsou již germinální buňky aneuploidní
2) mitotickou nondisjunkcí v průběhu rýhování embrya
3) trizomie zděděná od rodiče, který je přenašečem robertsonské translokace chromozomu 21 – translokační forma (Kočárek, 2007).

- Monozomie

Za monozomii se označuje ztráta jednoho chromozomu v karyotypu diploidního jedince. U člověka se setkáváme pouze s jedním typem životaschopné monozomie tzv. Turnerovým syndromem. Tento syndrom bývá většinou způsobený monozomií chromozomu X. Pacienti jsou ženského pohlaví a v buňkách mají pouze 45 chromozomů - 22 párů autozomů a jediný chromozom X (Kočárek, 2007).

1.3.2 Strukturní chromozomové aberace

Změny struktury chromozomů označujeme rovněž jako strukturní aberace, popř. strukturní přestavby. Jde o poměrně časté chromozomové abnormality (viz Tab. I) (Kočárek, 2007).

Z klinického hlediska lze rozlišit (a) strukturní chromozomální aberace balancované - zpravidla pro svého nositele nepředstavují žádný klinický dopad a (b) strukturní chromozomální aberace nebalancované, kdy dochází ke kvantitativní změně genetického materiálu - představující pro svého nositele riziko klinických projevů.

Delece

Jako deleci či deficienci označujeme ztrátu části chromozomu. Podle místa deletovaného segmentu dělíme delece na terminální (ztráta koncové části chromozomu) a intersticiální (ztráta vnitřního segmentu chromozomu) (Kočárek, 2007). U diploidního organizmu způsobuje delece části chromozomu hypoploidii, která bývá častou příčinou mnoha fenotypových příznaků. Míra dalších klinických příznaků závisí na velikosti deletovaného chromozomálního segmentu.

Klasickým případem u člověka je delece krátkých ramen chromozomu 5 - syndrom Cri Du Chat. Tato delece může být terminální nebo intersticiální a její rozsah je variabilní (Snustad et al., 2009).

Duplikace

Přítomnost nadbytečného chromozomálního segmentu se označuje jako duplikace (zdvojení). Duplikovaný úsek se může nacházet na některém z chromozomů, nebo může existovat jako nový separátní chromozom (takzvaná „volná duplikace“). Důsledky obou typů duplikací jsou stejné: organizmus je hyperploidní pro tu část genetické informace, která se nachází na odpovídajícím segmentu. Stejně jako u delecí vede i tato hyperploidie k určitým fenotypovým abnormalitám (Snustad et al., 2009).

Inverze

Inverze nastává, když na chromozomu dojde ke dvěma zlomům a úsek mezi nimi se převrátí o 180° a znovu se spojí do původního chromozomu. Inverzí tedy dojde ke změně lineárního pořadí genů v invertovaném segmentu (Snustad et al., 2009). Inverzi rozeznáváme paracentrickou, kdy invertovaný úsek leží mimo centromeru a pericentrickou, kdy invertovaný úsek centromeru obsahuje (Kočárek, 2007).

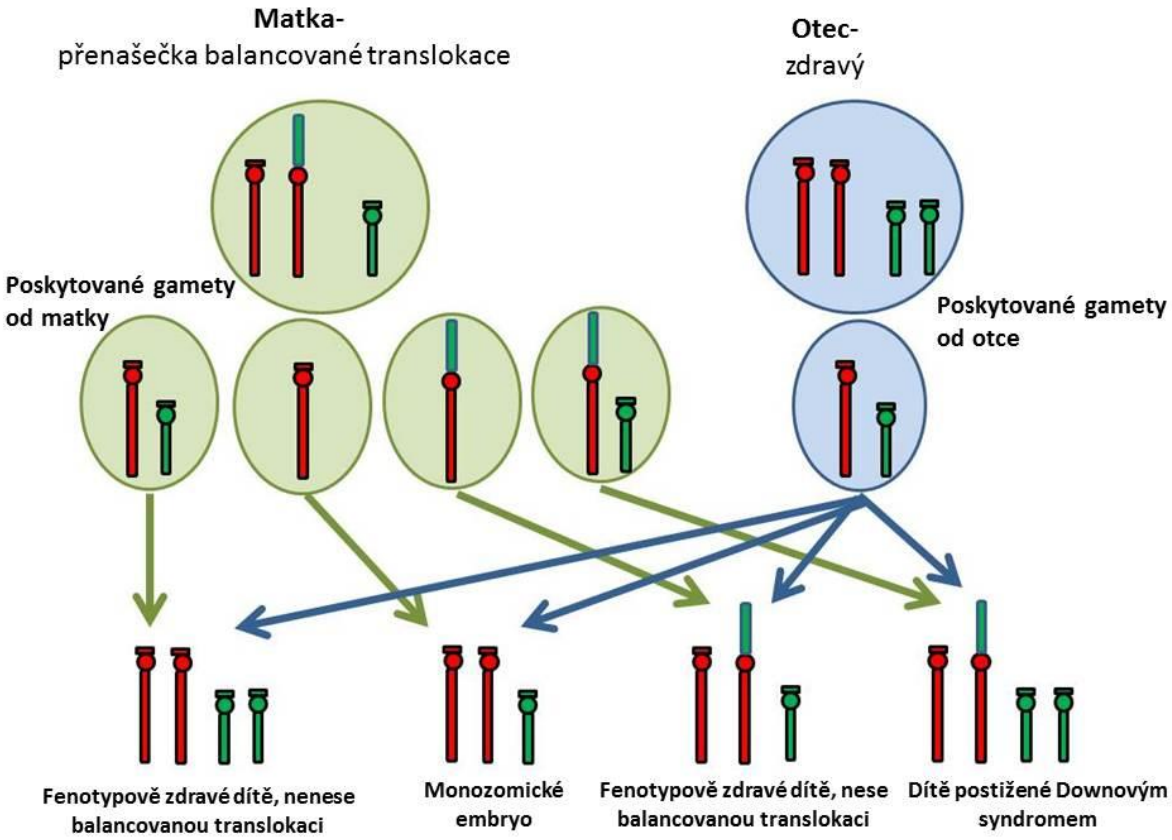
Translokace

Jako translokaci označujeme přemístění nebo výměnu chromozomového segmentu mezi různými (zpravidla nehomologickými) chromozomy. Takto se geny dostávají do jiných vazbových skupin, než byly původně.

Prvním typem translokace je tzv. translokace tandemová (jednoduchá), kdy dochází k přesunu části chromozomu na jiný chromozom. Pokud ovšem dojde k dokonalé výměně translokovaných segmentů mezi dvěma nehomologickými chromozomy aniž by došlo ke ztrátě genetického materiálu, označujeme tyto aberace jako reciproké translokace. Dalším typem této chromozomové abnormality je Robertsonská translokace, která je způsobena translokací akrocentrických chromozomů, při nichž dochází k deleci krátkých ramének a následné fúzi centromerických oblastí za vzniku jednoho metacentrického chromozomu a tzv. ztraceného segmentu (Snustad et al., 2009).

Přenašeči balancovaných translokací tvoří germinální buňky s chromozomální konstitucí jak balancovanou, tak nebalancovanou, což představuje riziko vzniku plodu s chromozomální aberací během reprodukce (viz. Obr. 3). Proto odhalení přítomnosti takové chromozomální změny u přenašeče je důležité zejména v reprodukční medicíně.

Nejčastější strukturní chromozomální aberace jsou uvedeny v Tab. I.



Obr. 3 - Znázornění segregace chromozomů během meiózy u přenašeče Robertsonské translokace chromozomu č. 21 (zeleně) a mechanizmu vzniku translokační formy Downova syndromu (Přepracováno podle Bay, J. [cit. 19.4.2013]).

Tab. I - Typy strukturních chromozomálních aberací a jejich frekvence (Shaffer and Lupski, 2000).

Typ strukturní chromozomální aberace	**Frekvence výskytu**
reciproká translokace	1 z 625
Robertsonská translokace	1 z 1000
terminální delece	alespoň 1 z 5000
intersticiální delece	alespoň 1 ze 4000
intersticiální duplikace	alespoň 1 ze 4000

1.3.3 Subtelomerické aberace chromozomů

Subtelomerické aberace chromozomů patří mezi takzvané submiroskopické či kryptické aberace, které nejsou zjistitelné pomocí základních cytogenetických metod, jakou je například sestavení karyotypu pacienta. Mezi tento typ aberací řadíme změny na úseku chromozomu ve velikosti od jednotlivých nukleotidů do přibližně 10 Mb dlouhého fragmentu.

Tab. II - Četnost výskytu specifických submikroskopických subtelomerických delecí (De Vries et al., 2003).

Četnost výskytu specifických submikroskopických subtelomerických delecí	
počet zaznamenaných případů	**subtelomerická oblast**
> 50	4p, 5p, 9p, 16p, 17p
11-50	1p, 2q, 22q
2-10	1q, 2p*, 3p*, 4q, 5q, 6q, 7q, 8p, 9q,10p, 10q, 11q, 12p, 13q, 14q, 18q, 20p*
1	3q, 6p, 7p, 11p, 16q, 17q
0	q, 12q, 15q, 18p, 19p, 19q, 20q, 21q
* zaznamenán více jak jeden případ, ale všechny v jedné rodině	

Subtelomerické aberace a mentální retardace

Chromozomální, především pak subtelomerické abnormality představují významnou příčinou vzniku poruchy mentální retardace, která postihuje 1 - 3 % celkové populace. Subtelomerické aberace pak byly zjištěny u 5 % dětí postižených středním až těžkým typem mentální retardace (Wu et al., 2010).

Mentální retardace je stav, při kterém dojde k zástavě nebo neúplnému duševnímu vývoji. Je charakterizována narušením dovedností přispívajících k povšechné úrovni inteligence, tj. poznávacích, řečových, pohybových a sociálních schopností. Mentální retardace se může vyskytovat izolovaně nebo společně s jakoukoli jinou duševní nebo tělesnou poruchou (Hladíková et al., 2012).

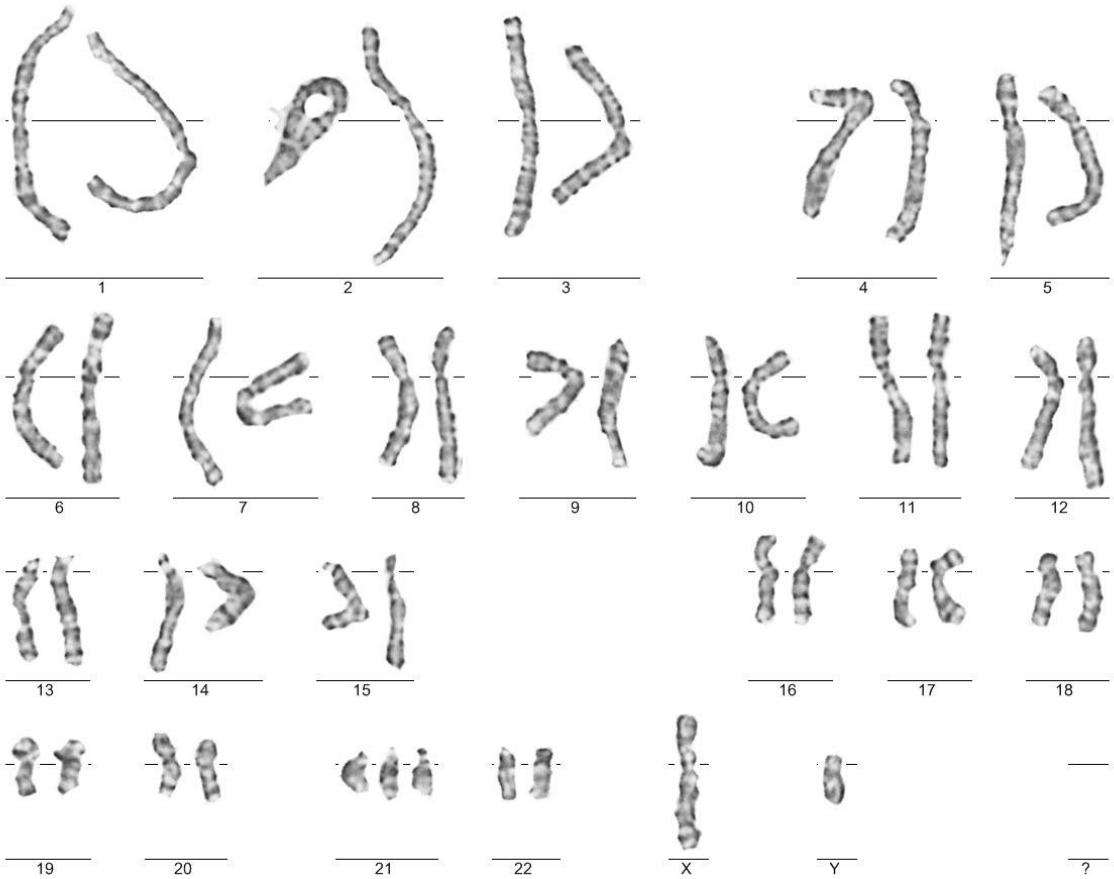
Mentální postižení dětí i dospělých představuje závažný zdravotní i sociální problém. Příčiny mentální retardace mohou být jak vrozené, tak i získané, neobjasněných však zůstává až 75 % případů. Moderní pokrok v cytogenetických rozlišovacích metodách dovolil objasnit etiologii až 10 % doposud nejasných mentálních retardací (Hladíková et al., 2012).

1.3.4 Detekce chromozomálních aberací

Klasická cytogenetika

Konvenční cytogenetické metody detekují změny ve struktuře chromozomů zahrnující několik pruhů (1 pruh představuje přibližně 10 Mb). Základním principem je zisk metafázních chromozomů z dělících se buněk, jejich barvení a následná mikroskopická analýza včetně sestavení karyotypu (viz. Obr. 4).

Díky speciální barvící technice je možné docílit odlišení jednotlivých typů chromozomů na základě pruhování, které je specifické pro jednotlivé chromozomy a po jejich správném seřazení do karyotypu je tak umožněna i detekce přítomnosti početních či strukturních chromozomálních změn. Tato metoda slouží k analýze celého buněčného genomu. Nevýhodou je nižší rozlišovací schopnost.



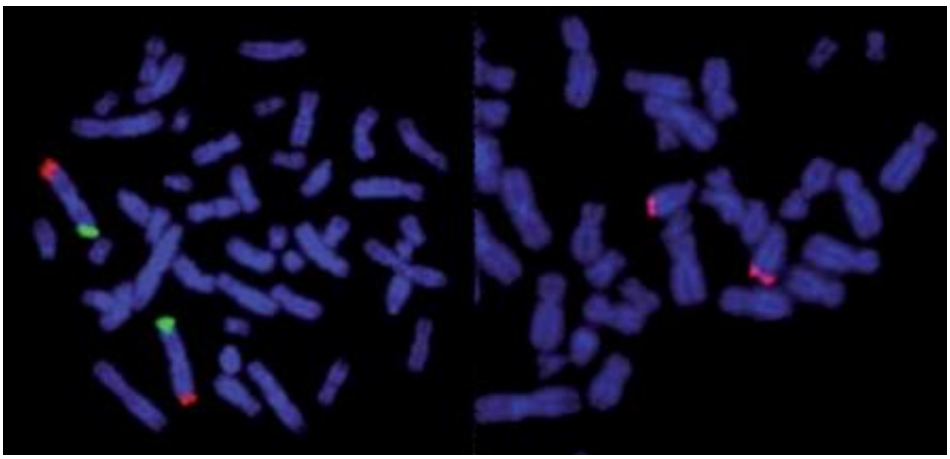
Obr. 4 - Karyotyp pacienta s trizomií chromozomu č. 21, tzv. Downovým syndromem. Obrázek poskytl Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FNOL.

Molekulární cytogenetika a molekulární genetika

Subtelomerické aberace jsou natolik malé, že jejich zviditelnění pomocí rutinních cytogenetických metod (např. pomocí sestavení karyotypu pacienta) není možné, proto byl nutný rozvoj metod daleko citlivějších. Tyto techniky lze rozlišit do dvou skupin: ty, které cíleně sledují konkrétní změny v genomu – MLPA, FISH, QF - PCR a ty, které mapují celý genom - CGH (komparativní genomová hybridizace) a její pokročilejší forma array - CGH.

K metodám s vyšší rozlišovací schopností patří FISH - fluorescenční in situ hybridizace, která bývá označována jako molekulárně cytogenetická metoda a umožňuje cílené vyšetření konkrétního chromozomu či chromozomálního segmentu. Hlavním principem této metody je navázání sondy DNA, označené fluorochromy, na specifické místo DNA, což je způsobeno komplementaritou mezi sondou a danou oblastí DNA a zviditelnění aberované části pomocí fluorescenčního signálu (Hladílková et al., 2012).

S využitím multisondové technologie je umožněno detekovat každou oblast chromozomu s použitím pouze jednoho mikroskopického sklíčka pro každého pacienta (Hladílková et al., 2012). Velkou výhodou je i možnost detekce balancovaných subtelomerových přestaveb, což metody pracující pouze s DNA neumožňují.



Obr. 5 - Příklad fluorescenční *in situ* hybridizace- FISH při použití subtelomerických sond (Hladíková et al., 2012).

U dalších metod dochází k analýze DNA izolované z pacienta. Výsledkem již tedy není obraz samotného chromozomu, nýbrž separovaná DNA pomocí gelové či kapilární elektroforézy popř. obraz hybridizované DNA na chipech. Mezi tyto řadíme metodu CGH, array - CGH a metodu MLPA.

Technika CGH - komparativní genová hybridizace umožňuje srovnávací analýzu celého genomu pacienta v rámci jedné hybridizační reakce. Je založena na označení genomové DNA pacienta pomocí fluorescenčních barviv. Takto připravená DNA se hybridizuje s chromozomy zcela zdravého jedince. Samotným výsledkem je srovnání hybridizace testované DNA proti kontrolnímu vzorku. Tato metoda opět spadá do molekulárně cytogenetických metod, kdy výsledek hybridizace je snímán fluorescenčním mikroskopem, karyotypován a počítačově vyhodnocen (Hladílková et al., 2012).

Metoda microarray - based comparative hybridissation (array - CGH) je určena k vyhledávání delecí a duplikací v genomu pacientů. Jejím principem je klasická metoda CGH spojena s vysokou rozlišovací schopnosti metody FISH (Vissers et. al, 2010). Array - CGH tedy umožňuje vyšetření celého genomu pacienta ve velmi vysokém rozlišení. Je využívána ke studiu role submikroskopických aberací v etiologii MR a vrozených vývojových vad (Thuresson et al, 2007).

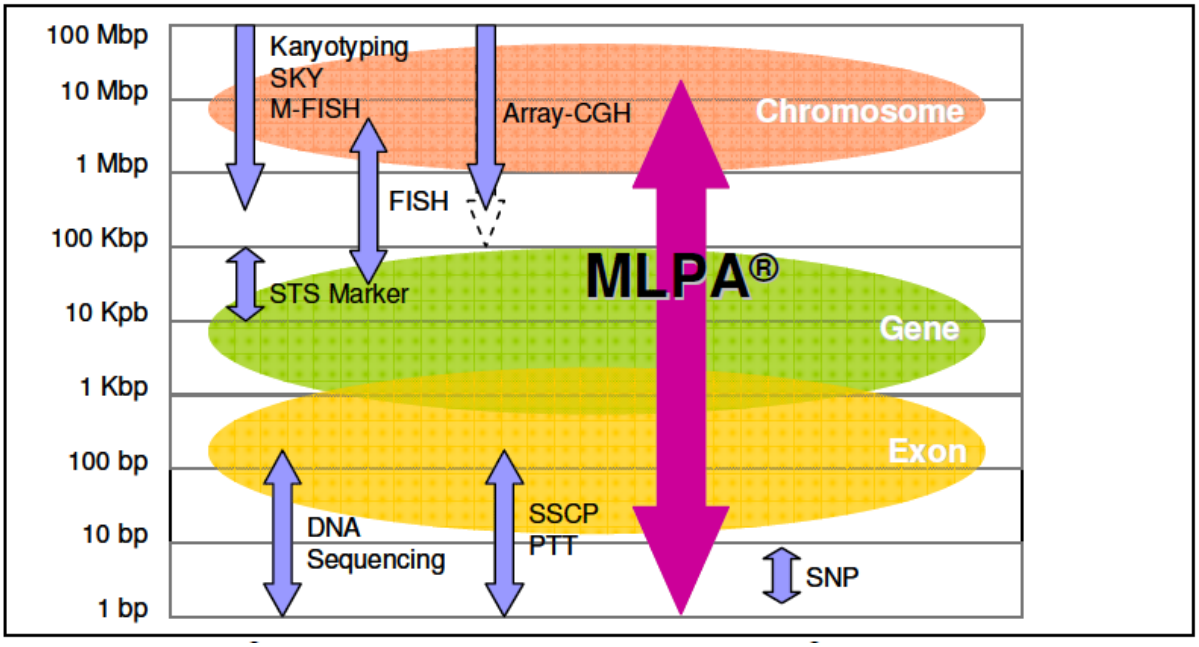
MAPH (Multiplex Amplifiable Probe Hybridization) analyzuje genomovou DNA pomocí směsi malých (160 - 600 bp) sond komplementárních k subtelomerické oblasti (Gardner et al, 2004). Denaturovaná vlákna testované DNA jsou zachycena na nylonovém filtru a po přidání komplementárních sond a hybridizaci jsou nehybridizované sondy odmyty. Fragmenty s hybridizovanými sondami jsou amplifikovány PCR a elektroforeticky roztříděny na polyakrylamidovém gelu. Větší nebo menší produkt amplifikace indikuje přítomnou duplikaci či deleci příslušném chromozomu (Armour et al, 2000).

Kvantitativní fluorescenční polymerázová reakce QF - PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) patří mezi techniky umožňující amplifikaci specifických tandemově se opakujících krátkých repetic, tzv. short tandem repeats. Vzorek DNA je amplifikovám fluorescečně značenými primery, které jsou specifické pro daný úsek na konkrétním chromozomu. Vzniklý PCR produkt je následně vizualizován plochou výsledného píku a poté kvantifikován pomocí automatického analyzátoru Gene - Scan (Hultén et al, 2003).

Hlavní výhodou metody QF - PCR je možnost využití menšího množství testované DNA pro detekci prenatálních aneuploidií, než jaké je potřebné např. pro metodu FISH. Běžně se využívá 0,5 - 1,0 ml odebrané plodové vody, ze které je vzorek DNA extrahován. Při technice QF - PCR se může zpracovávat velké množství vzorků najednou a je tedy přístupnější pro automatizaci v praxi (Hultén et al, 2003).

1.4 Metoda MLPA- Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification

Metoda MLPA detekuje široké spektrum chromozomálních aberací - od mutací vzniklých změnou pouze 1 nt (díky vysoké specifitě používané Ligázy 65) po velké (až 10 Mb) chromozomální delece/duplikace (viz. Obr. 6).



Obr. 6 - Srovnání MLPA metody s dalšími cytogenetickými metodami (MRC Holland MLPA, 2012).

MLPA je jednou z metod molekulární analýzy DNA využívaných jak k detekci genových mutací tak chromozomálních aberací. Poprvé byla využita k detekci exonové delece a duplikace v lidských genech BRCA1, MSH2 a MLH1 a k detekci základních aneuploidií (Schouten et al. 2002).

V posledních letech bylo vyvinuto mnoho modifikací MLPA, především k detailnější detekci některých chromozomálních aberací. Mezi tyto modifikace patří Methylation Specific MLPA (MS - MLPA), Reverse Transcriptase MLPA (RT - MLPA) a nejnovější Array - based MLPA (Kozlowski et al. 2008).

Analýza pomocí MLPA metody má široké spektrum využití- je hojně používána při detekci velkých (potvrzení cytogenetického nálezu) i kryptických chromozomálních aberací. Dále je využívaná pro detekci subtelomerických oblastí u pacientů trpících mentální retardací a pro detekci submikroskopických syndromů (Williamsův syndrom, del 7q11.23).

1.4.1 Sondy využívané MLPA metodou

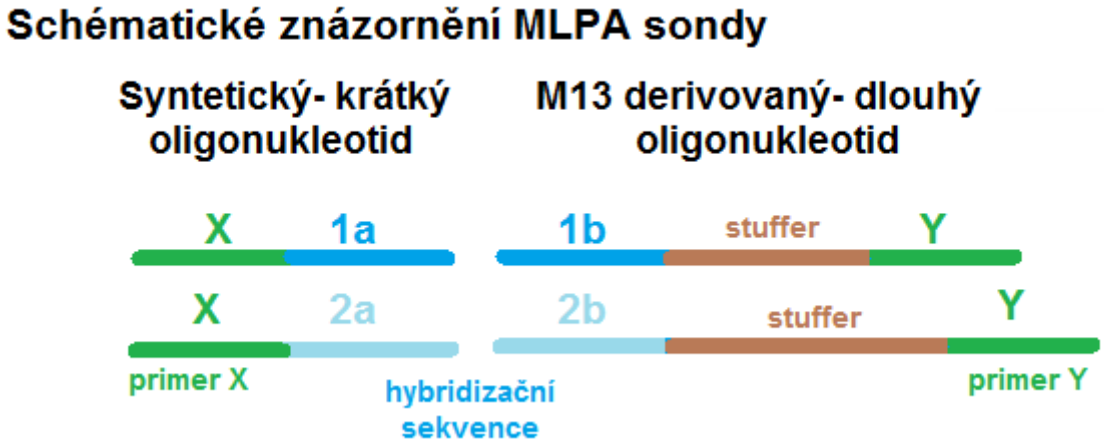
Sondy, které MLPA metoda využívá, jsou složené ze dvou oligonukleotidů, které dělíme na tzv. krátké a dlouhé. Krátké oligonukleotidy obsahují specifickou cílovou sekvenci ve velikosti 21 - 30 nt na svém 3´ konci a univerzální sekvenci ve velikosti 19 nt pro PCR primer X na svém 5´ konci.

Delší oligonukleotid, získaný z M13 fága, obsahuje na svém 5´ konci sekvenci dlouhou 25 - 43 nt, která je schopna hybridizovat s cílovou sekvencí DNA vzorku ihned po hybridizaci oligonukleotidu kratšího. Následně obsahuje univerzální sekvenci o velikosti 36 nt pro PCR primer X na svém 3´ konci. Na rozdíl od kratšího oligonukleotidu obsahuje navíc i specifickou sekvenci - ´stuffer´, která se nachází mezi komplementární sekvencí pro templát DNA na 5´ konci a sekvencí pro primer na 3´ konci. Tato ´stuffer´ sekvence je pro každý z párů sond specifická ve velikosti, proto je možné následné rozdělení amplifikovaného PCR produktu pomocí kapilární elektroforézy. Její rozmezí se pohybuje od 130 do 480 bp. Stavba sondy (2 oligonukleotidových sekvencí) je znázorněna na Obr. 7.

Díky přítomnosti univerzální primer sekvence pro primer X je možné použití pouze jednoho páru komplementárních primerů při amplifikaci produktu pomocí PCR.

V dnešní době již existuje více než 300 uměle vytvořených sond pro metodu MLPA, které se váží na odlišné komplementární sekvence DNA (Shouten et al., 2002).

Specifické MLPA kity (směsi MLPA sond) obsahují více než 35 MLPA sond, které se liší ve velikosti - mají odlišné ´stuffer´ sekvence a dále se liší ve velikosti cílových sekvencí.



Obr. 7 - MLPA sonda je složená ze dvou oligonukleotidů. Stuffer sekvence umožňuje rozdělení PCR produktu kapilární elektroforézou (upraveno podle Shouten et al., 2002).

1.4.2 Princip reakce

Princip metody MLPA je založený na PCR reakci (Polymerase Chain Reaction), která dokáže amplifikovat správně hybridizované a ligované MLPA sondy na různých DNA sekvencích. Princip metody je znázorněn na Obr. 11.

Celá reakce probíhá v několika krocích:

- Denaturace- Dvouřetězcová DNA je převedena do jednovláknové za použití vysokých teplot. Testovaný vzorek je denaturován stejně jako MLPA sondy.

- Hybridizace- Navázání oligonukleotidových sond na cílová místa DNA na základě jejich komplementarity.

- Ligace- Každá dvojice hybridizovaných sond pro daný lokus je spojena pomocí enzymu Ligázy- 65

- PCR- Ligované sondy jsou amplifikovány pomocí PCR reakce za použití pouze jednoho páru příslušných primerů- jsou univerzální (u nesprávně hybridizovaných či ligovaných sond k jejich amplifikaci nedochází). Amplifikace ligovaných sond je přímo úměrná množství cílových sekvencí přítomných ve vzorku DNA.

- Separace PCR produktu- Výsledné PCR produkty (amplifikované MLPA sondy) následně podstupují separaci kapilární elektroforézou, kde jsou roztříděny díky rozdílné délce fragmentů (´stuffer´ sekvence). Univerzální primery jsou fluorescenčně značeny. Intenzita signálu snímaného kapilární elektroforézou - zobrazená konkrétními píky - je přímo úměrná množství amplifikovaných fragmentů. Absolutní intenzita snímané fluorescence je závislá na mnoha faktorech (degradace fluorescenčního barviva, nepřesnosti v pipetování apod.). Proto je nutné výsledná data normalizovat.

1.4.3 Analýza dat

U dvou kopií sledovaného lokusu (normální diploidní stav) je hodnota emitovaného signálu 1 (100 %). Heterozygotní delece komplementární sondy bude vytvářet o 35 - 50 % menší relativní plochu píku (poloviční množství amplifikovaných fragmentů). Naopak zvětšení plochy píku o 35 - 50 % může dokazovat přítomnost duplikace dané části. MLPA je metodou relativní a poskytuje relativní výsledky, proto je bezpodmínečně nutné při každém testu používat referenční vzorky. Výsledná data jsou normalizována dvěma způsoby:

1) Normalizace v rámci jednoho vzorku s použitím referenčních sond, které detekují sekvence, u nichž je očekáván normální počet kopií.
2) Normalizace mezi jednotlivými vzorky s využitím referenčních vzorků. Relativní velikost píku je srovnávána s ostatními (referenčními) vzorky. Poměrná hodnota relativní velikosti píku pro danou sondu testovaného vzorku k relativní velikosti píku pro tutéž sondu referenčního vzorku je nazývána dávkový koeficient (DQ). Analýzu je možno provádět, je-li dávkový koeficient pro referenční sondy 0,8 - 1,2, což představuje referenční limity pro zdravou kontrolu. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. III. Výpočet dávkového koeficientu je proveden pomocí softwarového programu MLPA Coffalyser (MRC Hollad, Nizozemí).

Změny relativní plochy výsledného píku však mohou nastat i v případě zděděného polymorfismu u jedince, který nemusí mít klinický význam. Proto je nutné zachycené delece a duplikace pomocí MLPA ověřit dalšími dostupnými metodami,

jako je například metoda FISH nebo jiným MLPA kitem, popř. ověřit tyto změny u rodičů probanda.

Zároveň mohou být některé signály amplifikovaných sond způsobeny kontaminací vzorku nebo změnou provedení metody.

Tab. III - Hodnoty DQ.

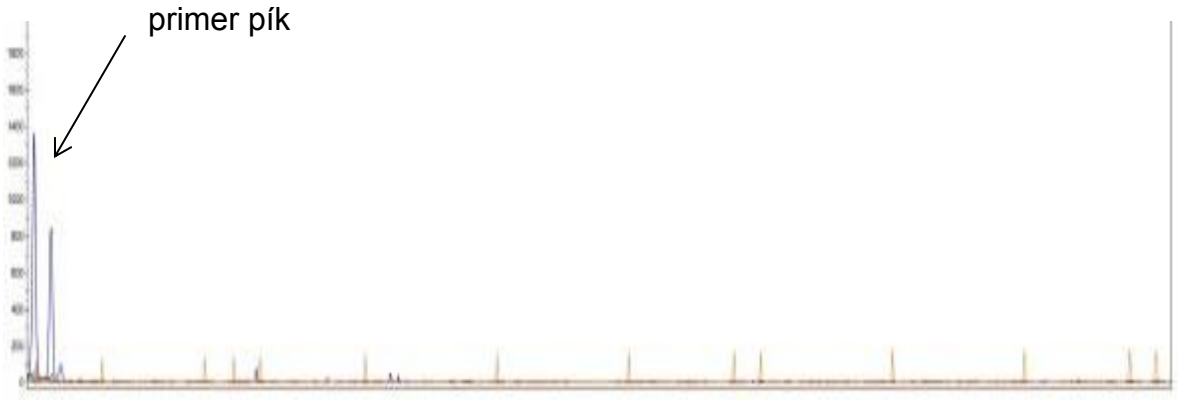
Status	**Dosage Quotient (DQ)**
Normální	0,85 < DQ < 1,15
Heterozygotní duplikace	1,35 < DQ < 1,55
Homozygotní duplikace	1,70 < DQ < 2,20
Heterozygotní delece	0,35 < DQ < 0,65
Homozygotní delece	0
Nejasné	Ostatní hodnoty

1.4.4 Slepé a referenční vzorky

Nepatrné rozdíly mezi jednotlivými experimenty mohou mít vliv na výsledné zobrazení MLPA výsledků. Proto je nutné použití referenčních a kontrolních vzorků při každé MLPA reakci. K minimalizaci možných odchylek mezi vzorky testovanými a referenčními je nezbytné, aby se referenční vzorky svou kvalitou co nejvíce přiblížily testovaným. Proto musí pocházet ze stejného typu tkáně, být stejným způsobem izolovány a mít přibližně stejnou koncentraci jako testované vzorky.

Referenční vzorek je typ vzorku, u kterého bylo zjištěno, že neobsahuje žádné chromozomální aberace- zdravá kontrola. Nejčastěji se jako referenční vzorek využívá DNA izolovaná ze zdravého jedince.

Slepý vzorek neobsahuje žádnou DNA. Zpravidla se jako slepý vzorek využívá deionizovaná voda či TE pufr (Tris/ EDTA pufr). Pokud ve vzorku není obsažena žádná DNA, kontrolní ani specifické MLPA sondy nejsou schopny hybridizovat a tudíž PCR reakci nevznikají žádné amlifikované produkty.



Obr. 8 - Elektroforetogram slepého vzorku.

V rámci jednoho experimentu je nezbytné použití alespoň tří referenčních vzorků a jednoho vzorku slepého. Při použití více než 21 vzorků v jednom testu je nutné použít vždy 1 referenční vzorek na 7 testovaných.

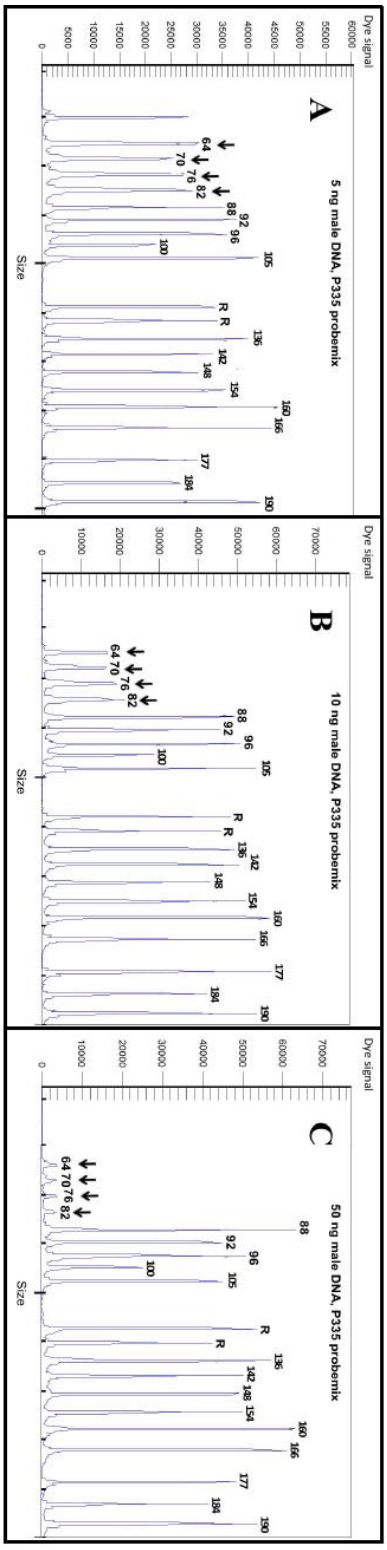
Analýza dat je prováděna porovnáváním elektroforetogramů testovaného vzorku a referenčních kontrol. Před vlastním hodnocením výsledků je nutné provést vnitřní kontrolu kvality. Pro tyto účely jsou jednotlivé kity obohaceny o kontrolní fragmenty D a Q (viz. Tab. IV). Pro validní analýzu je nutno dosáhnout požadované velikosti produktů, která je vyjádřena výškou píků (minimálně 300 rfu). Výsledný elektroforetogram nesmí obsahovat "zdvojené píky" ani jiné nespecifické píky.

Tab. IV - Kontrolní fragmenty obsažené v SALSA MLPA kitu P036 a P070.

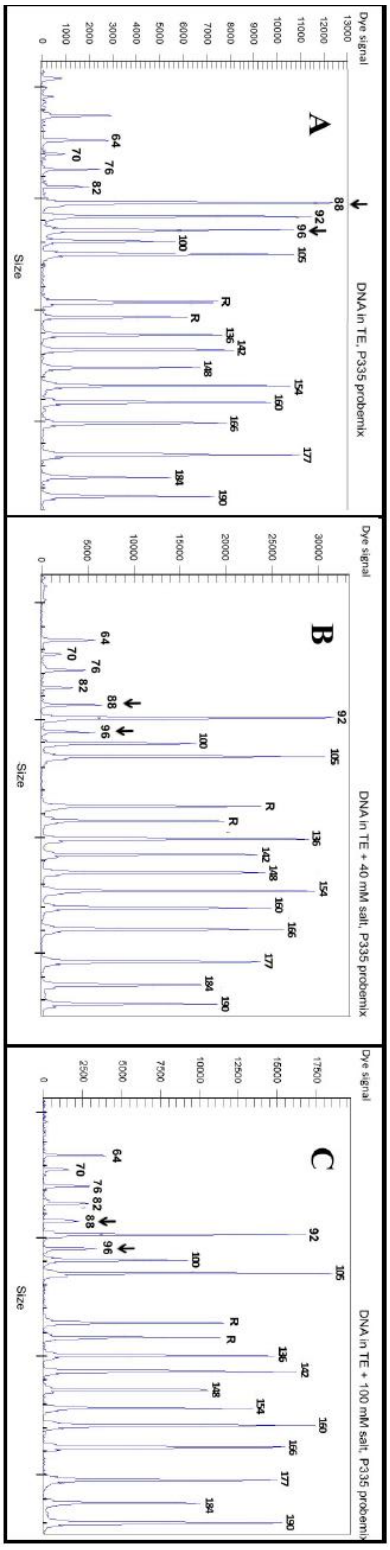
Velikost (nt)	**Název fragmentu**	**Charakterizace vzorku**
64, 70, 76, 82	Q	Množství DNA, viditelné pouze při koncentraci DNA nižší než 100 ng ve vzorku (viz. Obr. 9)
88, 92, 96	D	Nízký signál 88 a 96 nt dlouhého fragmentu indikuje nekompletní denaturaci vzorku DNA (viz. Obr. 10)
100	X	Specifický pro X chromozom
105, 118	Y	Specifické pro Y chromozom

1.5 Cíl bakalářské práce

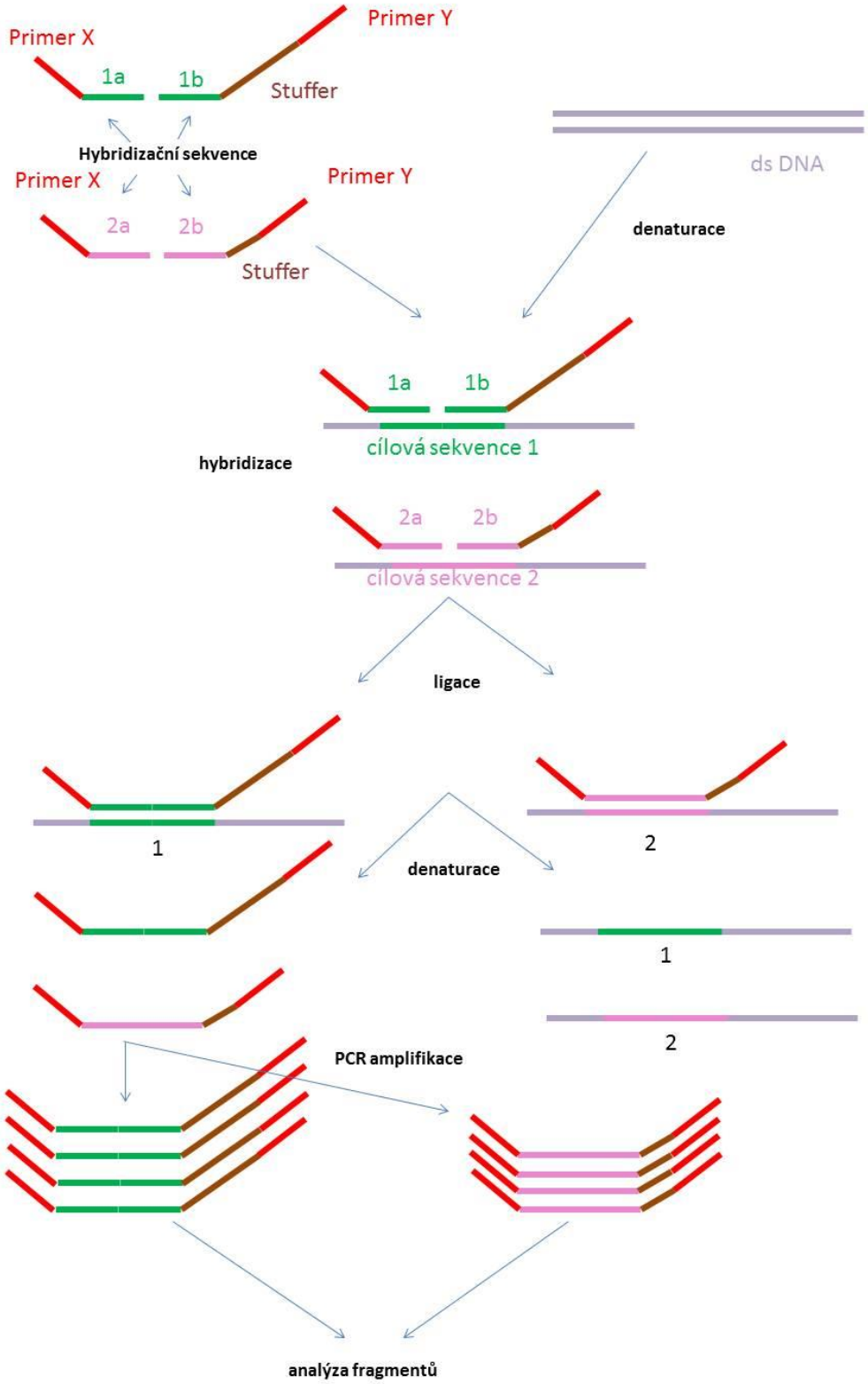
Cílem této bakalářské práce bylo ověřit použitelnost metody MLPA pro detekci chromozomálních aberací přítomných v DNA izolované z periferní krve, choriových klků či plodové vody a optimalizace této metody v laboratořích Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN Olomouc.



Obr. 9 - Vizualizace Q fragmentů v závislosti na množství DNA (MLPA DNA protocol, 2012).



Obr. 10 - Detekce nekompletní denaturace vzorku DNA pomocí D fragmentů (MLPA DNA protocol, 2012).



Obr. 11 - Schématické znázornění reakcí MLPA metody (upraveno podle Shouten et al., 2002).

2. Soubor a metodika

2.1 Biologický materiál

V předložené bakalářské práci bylo testováno celkem 8 vzorků. 4 vzorky DNA byly izolovány z choriových klků získaných choriocentézou, 3 z periferní krve (lymfocytů) odběrem žilní krve pacienta a 1 vzorek DNA izolovaný z amniocytů plodové vody po předchozí amniocentéze.

Optimální množství izolované DNA, při použití 5 µl této DNA pro každou MLPA reakci, je 100- 200 ng. Pracovní koncentrace DNA u všech vzorků byla 20 ng/µl.

2.1.1 Izolace DNA

Postup izolace DNA z plné krve Millerovou metodou:

Den první

1. přelít krev do označené 50ml zkumavky typu Falcon
2. dolít do 50 ml LB pufrem a řádně promíchat
3. při pokojové teplotě inkubovat po dobu 15 min
4. provést centrifugaci (30min/ 1 000 g)
5. supernatant slít, ponechat pelet bílých krvinek
6. přidat 5 ml LB pufru a řádně promíchat
7. provést centrifugaci (10 min/ 1 000 g)
8. slít supernatant a pelet zlehka opláchnout LB pufrem
9. zkumavky typu Falcon nechat okapat dnem vzhůru
10. po okapu přidat 3 ml NBL pufru, 50 µl proteikinázy K, 150 µl 20% SDS a řádně protřepat
11. inkubovat při 37 °C přes noc

Den druhý

1. k inkubované směsi přidat 1 ml 6M NaCl a řádně protřepat
2. provést centrifugaci (15 min/ 5 000 g)
3. supernatant přelít do čisté 10ml popsané zkumavky
4. provést centrifugaci (10 min/ 5 000 g)
5. slít supernatant do čisté 15ml popsané zkumavky a doplnit vychlazeným 96% etanolem
6. promíchat převracením zkumavky až do vysrážení DNA

7. přenést DNA pomocí sterilního skleněného háčku do označené zkumavky typu Eppendorf s 1 ml 70% etanolu
8. provést centrifugaci (5 min/ 14 000 g)
9. velmi opatrně slít 70% etanol na buničinu
10. DNA nechat při pokojové teplotě vyschnout
11. Po vyschnutí rozpustit v TE pufru (na 1 ml krve 50 µl TE pufru) při pokojové teplotě přes noc, jinak při 65 °C po dobu 1 hodiny za současného míchání) a označit příslušným štítkem
12. uschovat v lednici, pro delší skladování v mrazničce při -25 °C

Postup izolace DNA z plodové vody, choriových klků, bukálního stěru, potratové tkáně, nakultivovaných fibroblastů/ amniocytů pomocí QIAamp Mini Kitu:

1. rozdělit odebraný materiál na dvě části, jednu část zamrazit a druhou zpracovat (v případě kultivovaných fibroblastů/ amniocytů dělení neprovádět)
2. provést centrifugaci (5 min/ 13 000 g)
3. opatrně slít supernatant a k peletu přidat 1 ml deionizované vody, protřepat pomocí třepačky a při pokojové teplotě nechat stát po dobu 10 min
4. provést centrifugaci (5 min/ 13 000 g)
5. opatrně slít supernatant a přidat 180 µl ATL pufru a 20 µl proteinkinázy K, protřepat pomocí třepačky
6. 1- 3 hod inkubovat při 56 °C ve vodní lázni
7. po lýzi buněk přidat 200 µl AL pufru a řádně protřepat
8. inkubovat při 70 °C 10 min
9. po inkubaci přidat 210 µl 96% etanolu a řádně protřepat
10. pomocí pipety přenést na kolonku
11. provést centrifugaci (1 min/ 8 000 g)
12. kolonku přenést do čisté zkumavky a přidat na ni 500 µl AW1 pufru
13. provést centrifugaci (1 min/ 8 000 g)
14. kolonku přenést do čisté zkumavky a přidat na ni 500 µl AW2 pufru
15. provést centrifugaci (3 min/ 13 000 g)
16. kolonku přenést do čisté zkumavky a provést centrifugaci (30 s/ 8 000 g)

17. kolonku přenést do čisté zkumavky typu Eppendorf a přidat 100 µl AE pufru
18. po dobu 1 min inkubovat při pokojové teplotě
19. provést centrifugaci (1 min/ 8 000 g)
20. filtrát přenést pomocí pipety zpět na kolonku, Eppendorf zkumavku uzavřít
21. inkubovat při 70 °C 5 min
22. provést centrifugaci (5 min/ 13 000 g)
23. zkumavky označit příslušným štítkem

2.2 Přístroje a spotřební materiál

- sada pipet Labmate+ pro PCR s příslušnými špičkami
- sada pipet Labmate+ pro postamplifikační úpravy s příslušnými špičkami
- třepačka BIOSAN Combi Spin FVL 24 000N pro PCR mix
- termocyklér Peltier Thermo Cycler PTC- 200
- kapilární alektroforéza ABI prizm 3130 a příslušenství
- PCR zkumavky s víčky 0,2 ml
- Eppendorf zkumavky s víčky 1,5 ml
- kontejnery na infekční odpad
- latexové bezprašné rukavice
- minicentrifuga BIOSAN Combi Spin FVL 24 000N
- Software: Coffalyser, Genemapper

2.3 Reagencie použité pro MLPA metodu

- SALSA MLPA kity P036, P070, primery značeny Tamra barvivem
- PCR H_2O
- POP4 separační gel
- velikostní standarda LIZ 500
- deionizovaný HiDi formamid

Chemické složení SALSA MLPA kitů P036 a P070 je znázorněno v Tab. V. Specifikace sond SALSA MLPA kitu P036 a P070 je zaznamenána v Tab. VI a VII.

Tab. V - Chemikálie využité k přípravě SALSA MLPA kitů P036 a P070 (MLPA DNA protocol, 2012).

Složka SALSA® MLPA® kitu P036, P070	**Složení**
SALSA MLPA pufr	KCl, Tris- HCL, EDTA, PEG-6000. pH 8.5
SALSA Ligáza-65	glycerol, BRIJ (0,05%), EDTA, Beta- mercaptoethanol (0,1%), Tris-HCl. pH 7.5, Ligáza- 65(bakteriálního původu)
Ligázový pufr A	NAD (bakteriálního původu. pH 3.5
Ligázový pufr B	Tris- HCl, neionogenní detergenty, $MgCl_2$. pH 8.5
SALSA PCR primer mix	Syntetické oligonukleotidy, jeden je fluorescenčně značen (FAM, Cy5.0 a další v závisloti na použití kapilární ELFO, dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0.04 %). pH 8
SALSA Polymeráza	glycerol, BRIJ (0.5 %), EDTA, DTT (0.1 %), KCl, Tris-HCl, enzym Polymeráza (bacteriálního původu). pH 7.5
Směs sond (probemix)	syntetické oligonukleotidy, oligonukleotidy derivované z M13 fága, Tris-HCl, EDTA. pH 8.0

Tab. VI - Specifikace jednotlivých sond obsažených v SALSA MLPA kitu P036.

(MRC Holland MLPA, 2008).

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 *	1p	TNFRSF4	2269-L01761	01-001.14
137	2p	ACP1	2274-L08758	02-000.25
144	3p	CHL1	1721-L01329	03-000.34
151	4p	FLJ20265	2005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	1723-L01327	05-000.37
165	6p	IRF4	1724-L02048	06-000.34
172	7p	CENTA1	2275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	2397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	1727-L02050	09-000.84
194	10p	KIAA0934	2277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC-8	3315-L02733	11-000.20
208	12p	SLC6A12	2276-L01767	12-000.17
218	"13p"	PSPC1	2399-L01847	13-019.24 (Acrocentric)
226	"14p"	HEI10	1732-L01318	14-019.86 (Acrocentric)
234	"15p"	MKRN3	7291-L08858	15-021.36 (Acrocentric)
242	16p	POLR3K	1734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	1735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	1736-L02051	18-000.19
266	19p	CDC34	1737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	2396-L01844	20-000.26
282	"21p"	RBM11	1739-L01311	21-014.51 (Acrocentric)
290	"22p"	BID	1740-L01310	22-016.61 (Acrocentric)
298	X/Yp	SHOX	1148-L01331	X/Y-000.52 (PAR region)
306	1q	KIAA1720	2392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
314	2q	CAPN10	1742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH	2013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330 *	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
338	5q	GNB2L1	3319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	1746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
354	7q	VIPR2	1747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
362	8q	KIAA0150	1748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
370	9q	EHMT1	8205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
378	10q	PAO	9142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	KIAA0056	1751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
394	12q	ZNF10	2687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	1753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
410	14q	MTA1	2778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418	15q	ALDH1A3	1755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS11 / GAS8	3201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	1757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
442	18q	FLJ21172	1758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450	19q	BC-2	9143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458	20q	OPRL1	2688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	HMT1	2586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
474	22q	RABL2B	1762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
482	X/Yq	SYBL1	1763-L02150	X/Y-154.78 (PAR region; 0.1 Mb from tel.)

Tab. VII - Specifikace jednotlivých sond obsažených v SALSA MLPA kitu P070 (MRC Holland MLPA, 2010).

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation (autosomal)			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene ; X-111.95)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene ; Y-013.98)			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (DDX3Y gene ; Y-013.54)			
132	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	04084-L03605	01-247.08
139	2q	ATG4B (=APG4B)	02781-L03168	02-242.25
145	3q	KIAA0226	02690-L02842	03-198.88
152	4q	FRG1	02691-L02843	04-191.10
160	5q	GNB2L1	02790-L02232	05-180.60
166	6q	TBP	02694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	02793-L03167	07-158.63
179	8q	RECQL4	02695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	02792-L02846	09-139.78
193	10q	ECHS1	02696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B (=KIAA1030)	02697-L02848	11-133.29
211	12q	ZNF10	02686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	02698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	02699-L02850	14-104.99
233	15q	TM2D3 (=FLJ22604)	02701-L02851	15-100.01
241	16q	GAS8 (=GAS11)	02702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	02703-L03169	17-077.87
258	18q	CTDP1	02704-L03607	18-075.58
265	19q	BC-2	02705-L02853	19-063.76
274	20q	UCKL1 (=FLJ20517)	02706-L00642	20-062.05
281	21q	S100B	02587-L02854	21-046.85
290	22q	ARSA	02707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7 (=SYBL1)	02708-L02855	X-154.82 + Y-057.68 (PAR region)
306	1p	TNFRSF18	02270-L01762	01-001.13
315	2p	ACP1	02709-L02856	02-000.27
323	3p	CHL1	02896-L02363	03-000.34
329 *	4p	PIGG	14440-L16146	04-000.51
337	5p	CCDC127 (=LOC133957)	02791-L02233	05-000.26
346	6p	IRF4	04077-L03462	06-000.34
355	7p	UNC84A	02780-L02857	07-000.84
362	8p	FBXO25	02715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8 (=FLJ00026)	02716-L00688	09-000.38
379 ¥	10p	ZMYND11 (=BS69)	05180-L16343	10-000.22
387	11p	BET1L	02784-L02226	11-000.20
393	12p	JARID1A (=RBBP2)	02787-L02229	12-000.29
402 +	"13p"	PSPC1	02717-L03608	13-019.25 (Acrocentric)
409 +	"14p"	ADPRTL2	02718-L00732	14-019.90 (Acrocentric)
418 +	"15p"	NDN	04026-L01542	15-021.48 (Acrocentric)
427	16p	DECR2	02720-L00648	16-000.40
436	17p	RPH3AL	04081-L03465	17-000.18
444	18p	THOC1	02789-L02231	18-000.20
450	19p	PPAP2C	03501-L02880	19-000.23
459	20p	ZCCHC3 (=FLJ22115)	02723-L00641	20-000.23
466 +	"21p"	STCH	02724-L00334	21-014.68 (Acrocentric)
478 + ¥	"22p"	IL17RA	02725-L16344	22-015.96 (Acrocentric)
484 ¥	X/Yp (PAR1)	SHOX	03714-L16345	X/Y-000.52 (PAR region)

SALSA MLPA kity je nutné skladovat při teplotě -15 až -25 °C, chránit je před světlem a uložené v originálním balení.

Žádná ze složek SALSA MLPA kitu P036 a P070 nepatří mezi nebezpečné látky. Reagencie nejsou lidského ani zvířecího původu a nejsou získány z patogenního kmene bakterií.

Veškeré chemikálie jsou dodávány společně a jsou distribuovány firmou MCR Holland, Nizozemí.

SALSA MLPA kity jsou distribuovány firmou MRC Holland pro výzkumné účely a pro demostraci MLPA metody. Tyto kity nejsou certifikovány CE/ FDA organizací pro použití v genetické diagnostice.

Složení jednotlivých premixů pro MLPA metodu je uvedeno v Tab. VIII.

Tab. VIII - Složení MLPA premixů.

	1 vzorek
Master probe mix	
MLPA buffer (µl)	1,5
Probe mix P036, P070 (µl)	1,5
celkem/ per zkumavka (µl)	**3**
DNA (µl)	**5**
Ligase master mix	
Ligase buffer 65A (µl)	3
Ligase buffer 65B (µl)	3
H2O (µl)	25
Ligase (µl)	1
celkem/ per zkumavka (µl)	**32**
PCR buffer mix	
Salsa buffer (µl)	4
H2O (µl)	26
celkem/ per zkumavka (µl)	**30**
DNA (produkt ligace) (µl)	**10**
Polymerase master mix	
Primers (µl)	2
Enzyme dilution buffer (µl)	2
H2O (µl)	5,5
Polymerase (µl)	0,5
celkem/ per zkumavka (µl)	**10**

2.4 Pracovní postup MLPA metody- ´Two tube protocol´

Den 1.

Denaturace

1. Označit 0,2ml PCR zkumavky
2. Napipteovat 5 µl DNA vzorků do každé zkumavky, v případě blanku využít TE pufr
3. Zkumavky se vzorky vložit do termocykléru a spustit příslušný MLPA program. Denaturace vzorků po dobu 5 minut při 98 °C, následné zchlazení na 25 °C.

Hybridizace

1. Protřepat MLPA pufr a MLPA probemix.
2. Připravit Hybridizační master mix - viz. Tab. VIII, řádně promíchat.
3. Po dokončené hybridizaci přidat do každé zkumavky se vzorkem DNA 3 µl Hybridizačního master mixu. Dobře promíchat pipetou.
4. Pokračování v MLPA programu - inkubace po dobu 1 minuty při 95 °C, 16- 20 hodin při 60 °C.

Den 2.

Ligace

1. Protřepat oba ligační pufry.
2. Připravit Ligase - 65 master mix - viz. Tab. VIII. Směs s přidaným enzymem pouze jemně promíchat pipetou.
3. Pokračovat v MLPA programu.
4. Při 54 °C pauza, přidat do každé PCR zkumavky se vzorkem DNA 32 µl Ligase - 65 master mix, jemně promíchat pipetou.
5. Pokračovat v MLPA programu - inkubace po dobu 15 minut při 54 °C, následně 5 minut při 98 °C, pauza při 20 °C.
6. Vyjmout PCR zkumavky z termocykléru.
7. Produkty ligace uschovat po dobu 1 týdne při 4 °C nebo několik hodin při pokojové teplotě.

PCR

1. Řádně protřepat SALSA PCR primer mix, polymerázu lehce prohřát v ruce (snížení viskozity)
2. Připravit Polymerázový master mix - viz. Tab. VIII, směs pouze jemně promíchat
3. Za pokojové teploty do každé zkumavky s ligačním produktem přidat 10 µl polymerázového master mixu, jemně promíchat pipetou.
4. Pokračovat v MLPA programu- viz. Schéma 1.
5. Produkty skladovat zabalené v alobalu (fluorescenční barva je citlivá na světlo). Po dobu jednoho týdne skladovat PCR produkty ve 4 °C, pro delší skladování využít teplotu -15 °C až -25 °C.

Schéma 1 - Kroky MLPA programu během reakce.

1) *DNA denaturace*
   a) 98°C po dobu 5 minut
   b) 25°C po dobu 1 minuty a následné pozastavení programu
2) *Hybridizace*
   a) 95°C po dobu 1 minuty
   b) 60°C inkubace po dobu 16-20 hodin
3) *Ligace*
   a) 54°C po dobu 1 minuty a následné pozastavení programu
   b) 54°C po dobu 15 minut
   c) 98°C po dobu 5 minut
   d) 15°C po dobu 1 minuty a následné pozastavení programu
4) *PCR reakce*
   a) 60°C po dobu 1 minuty a následné pozastavení programu
   b) 35 cyklů
      - 95°C 30 vteřin
      - 60°C 30 vteřin
      - 72°C 60 vteřin
   c) 72°C po dobu 20 minut
   d) 15°C po dobu 1 minuty a následné zastavení programu

Příprava vzorků k separaci v kapilární elektroforéze pro ABI PRISM 3130:

1. k 1 µl vzorku DNA přidat 10 µl formamidu a 0,4 µl LIZ 500
2. pomocí pipety přemístit vzniklou směs do připraveného pipetovacího bloku- pořadí vzorků zanést do ´sample sheet´
3. denaturace 2 min při 80°C
4. rychle zchladit v ledové lázni

Podmínky separace v kapilární elektroforéze:

Pro separaci v kapiláře slouží genetický analyzátor ABI PRISM 3130. Jako separační gel byl použit POP4 ^{TM} (Applied Biosystems).

- MLPA PCR barva primerů: FAM
- doporučená délka kapiláry: 36 nebo 50 cm
- nasátí vzorku: 1,6 kV po dobu 15 s
- vlastní elektroforéza: 28 min při 60 °C, napětí 15 kV
- podmínky elektroforézy je možno pro další testy upravit v závislosti na výšce píků

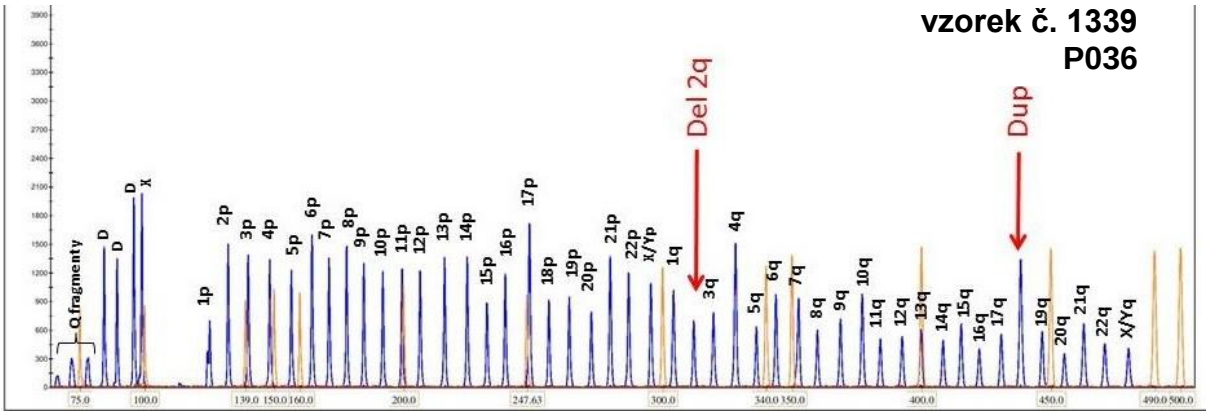
3. Výsledky

3.1 Výsledky vyšetření DNA izolované z lymfocytů periferní krve

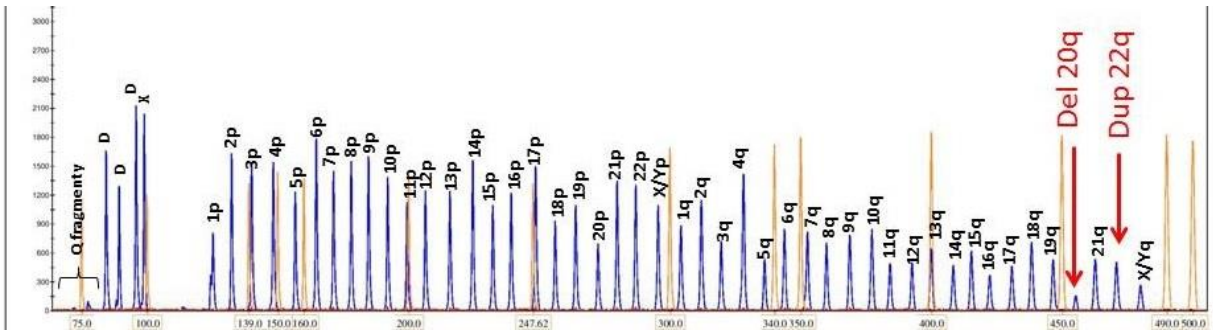
3.1.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036

Datum provedení: 28.5.2012

vzorek č. 1339
P036

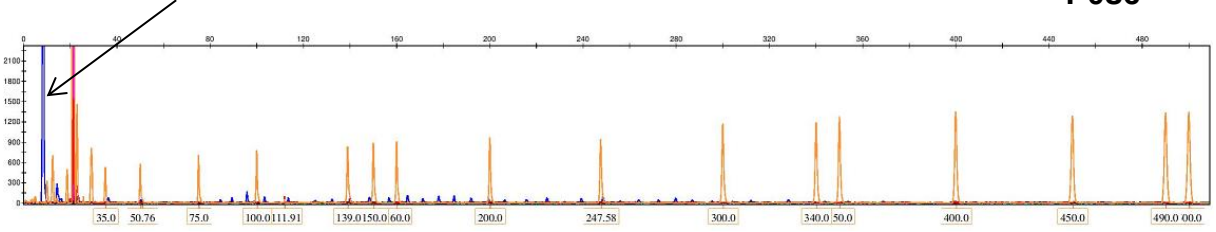


vzorek č. 348
P036

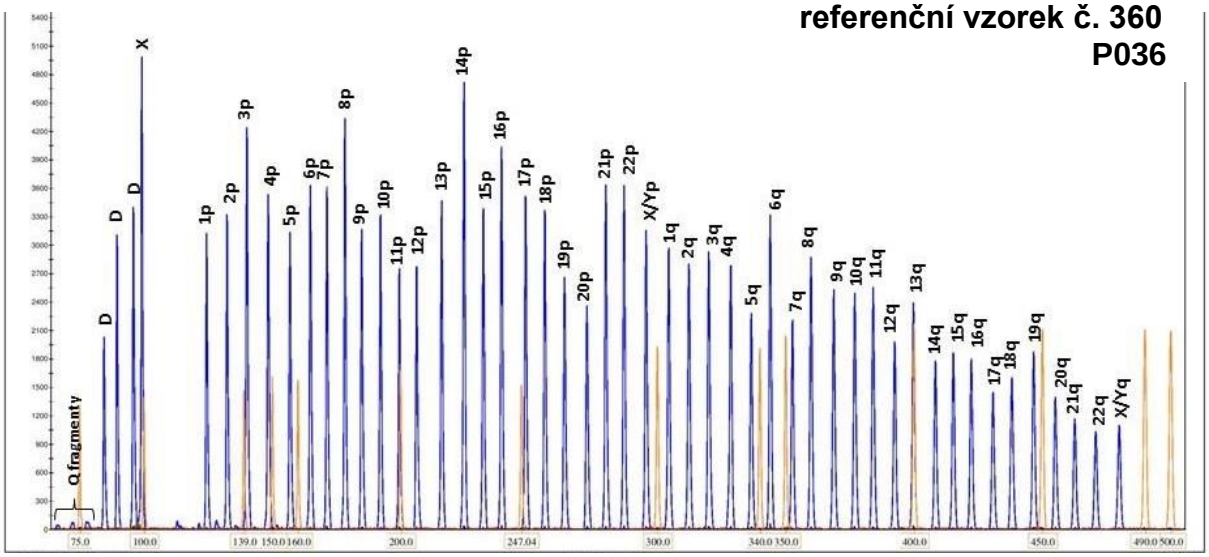


primer pík

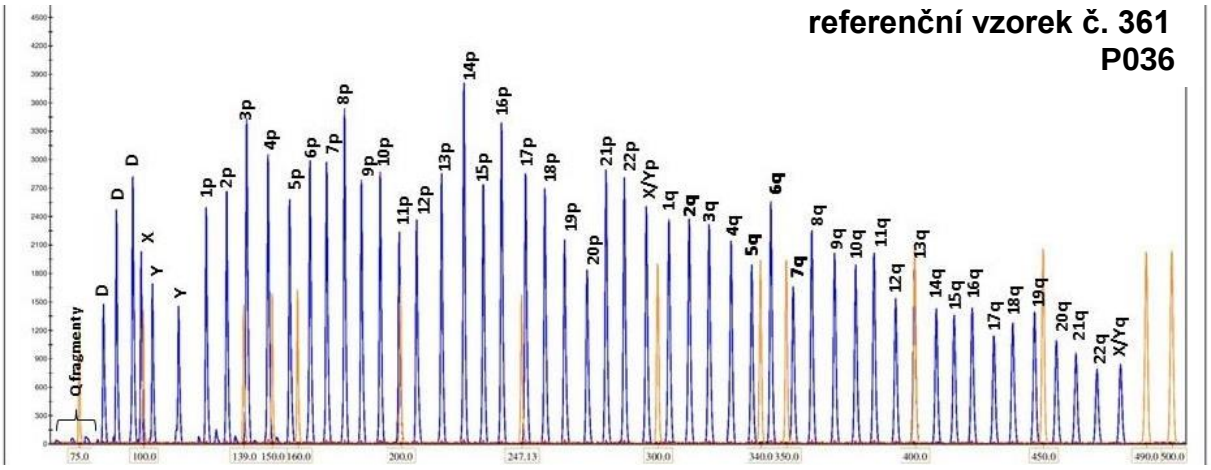
vzorek č. 168
P036



referenční vzorek č. 360
P036

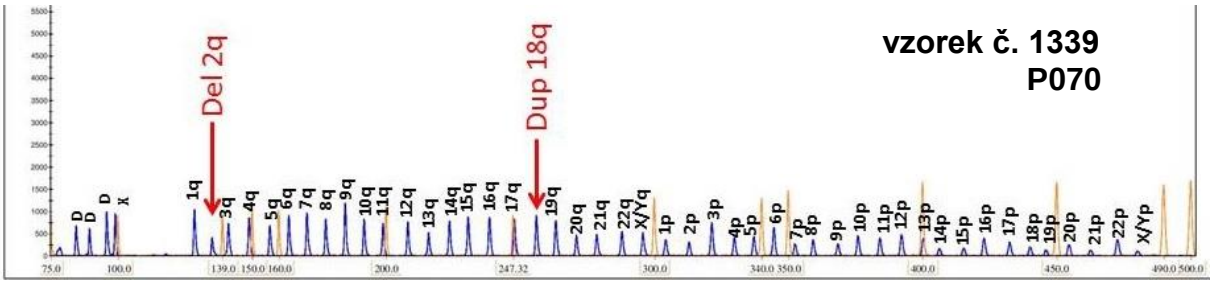


referenční vzorek č. 361
P036

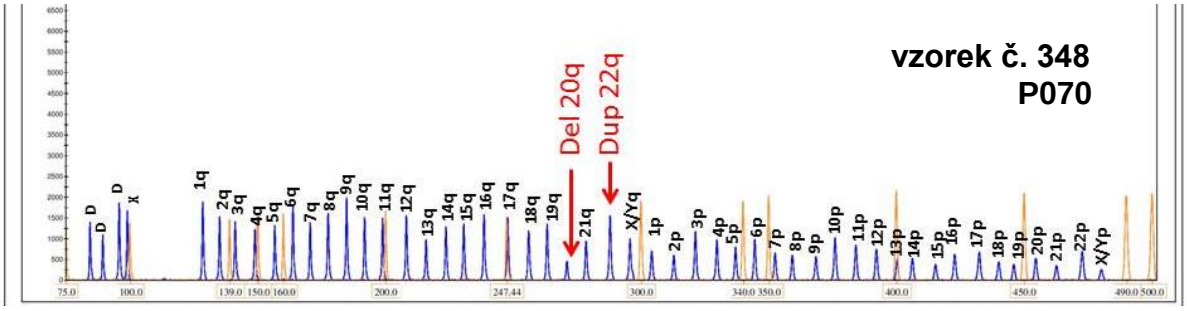


3.1.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070

Datum provedení: 25.5.2012

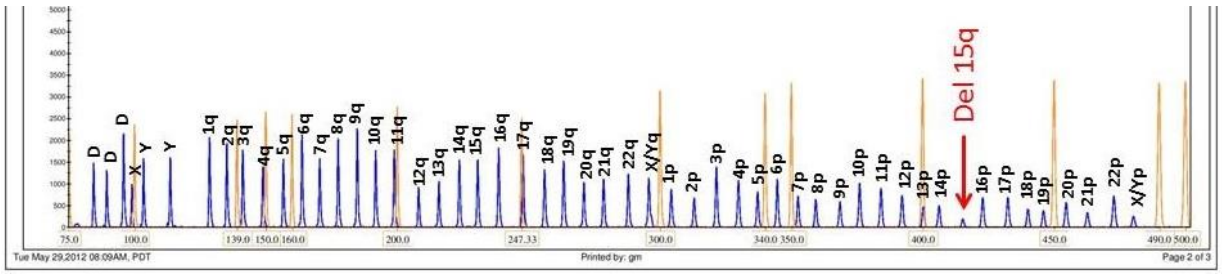


vzorek č. 1339
P070

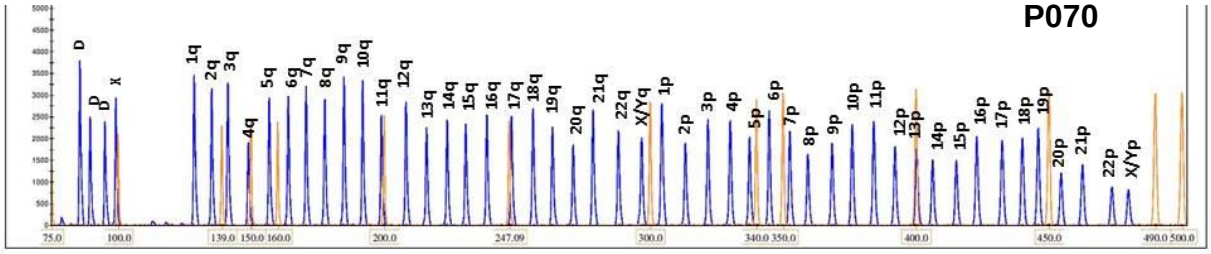


vzorek č. 348
P070

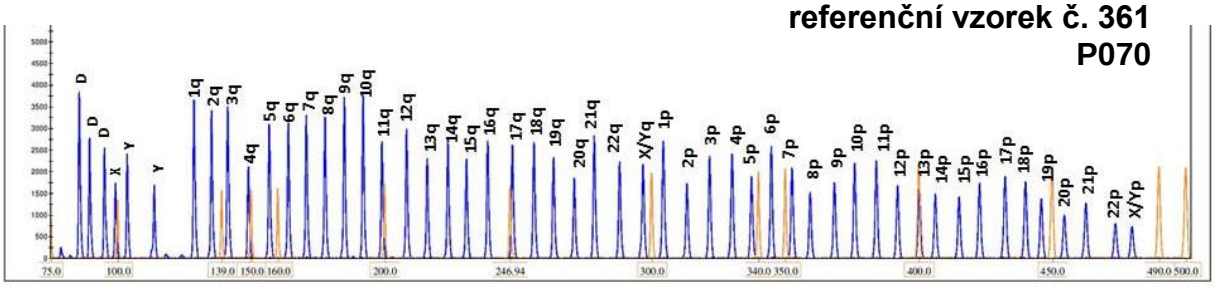
vzorek č. 168
P070



referenční vzorek č. 360
P070



referenční vzorek č. 361
P070



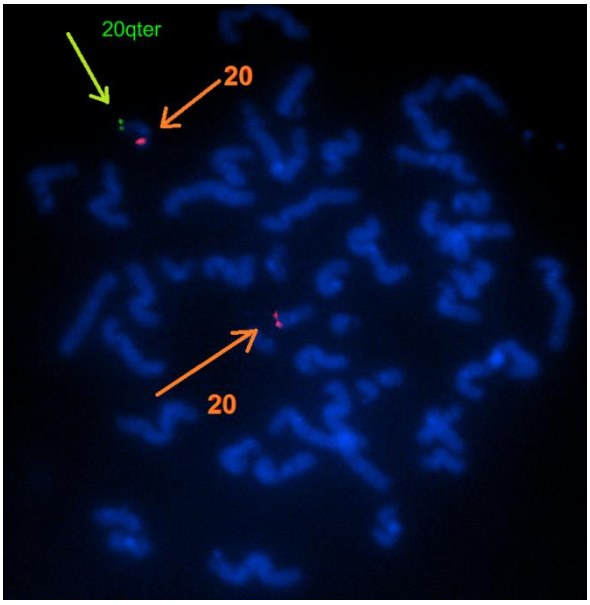
Při vyšetření DNA izolované z periferní krve Müllerovou metodou SALSA MLPA kitem P036 a P070 bylo množství izolované DNA dostačující, denaturace vzorku proběhla kompletně, výsledné PCR produkty byly dostatečné výška píků dosahovala minimálně 300 rfu). Hodnotitelnost u vzorku 1339 byla ztížena ´slopingem´ píků. (přednostní amplifikace kratších fragmentů způsobená přítomností substancí inhibujících PCR reakci nebo zvýšená evaporace během hybridizace u daného vzorku.

U vzorku 168 testovaného SALSA MLPA kitem P036 nedošlo ke tvorbě hodnotitelných PCR produktů. Důvodem může být degradace DNA ve vzorku způsobena jeho stářím. Hodnocení kvality jednotlivých elekroforetogramů viz. Tab. IX. Výsledky vyšetření vzorků jsou znázorněny v Tab. XV.

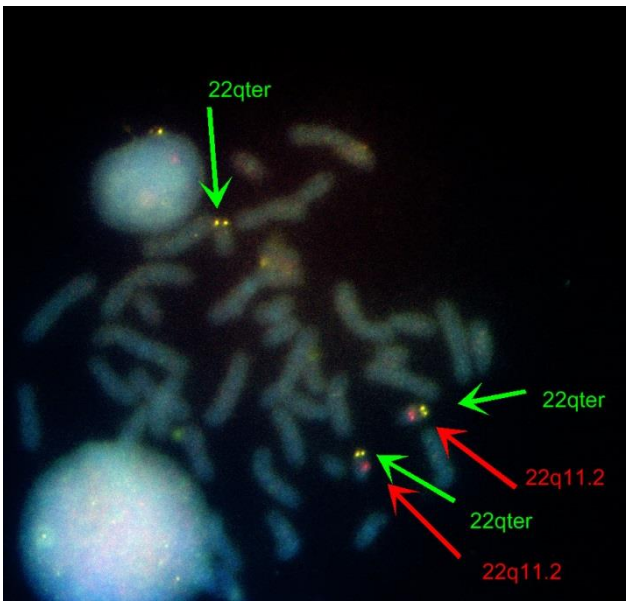
Tab. IX - Hodnocení kvality výstupních elektroforetogramů vzorků DNA izolované z lymfocytů periferní krve

DNA izolovaná z periferní krve číslo vzorku	typ izolace DNA	použitý SALSA MLPA kit	koncentrace DNA na základě výšky Q fragmentů	denaturace DNA na základě výšky D fragmentů	sloping píků	Kontrola produktu – vyšší než 300 RFU (měřeno výškou píku), primer pík
1339	Müllerova metoda	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
348	Müllerova metoda	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
168	Müllerova metoda	P036	-	-	-	nedostatečné, ano
360- referenční vzorek	Müllerova metoda	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
361- referenční vzorek	Müllerova metoda	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
1339	Müllerova metoda	P070	dostačující	kompletní	ano	dostatečné, ne
348	Müllerova metoda	P070	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
168	Müllerova metoda	P070	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
360- referenční vzorek	Müllerova metoda	P070	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
361- referenční vzorek	Müllerova metoda	P070	dostačující	kompletní	ano	dostatečné, ne
slepý vzorek	-	P036/P070	-	-	-	bez produktů, ano

3.1.3 Potvrzení výsledků metody MLPA



Obr. 11a - Potvrzení parciální monozomie chromozomu č. 20 u vzorku č. 348 metodou FISH. Hybridizace se sondou Alagille (JAG1, červená)/ 20qter Cytocell (zelená).



Obr. 11b - Potvrzení parciální trizomie chromozomu č. 22 u vzorku č. 348 metodou FISH. Hybridizace se sondou DiGeorge/ VCFS TUPLE 1 (červená)/ 22q13.3 (zelená).

Tab. X - Potvrzení patologického nálezu (20q-, 22q+) vzorku č. 348 softwarovým programem MLPA Coffalyser. Hodnota ´Ambigous´ na chromozomu 19p (19p-) je artefaktem způsobeným možným polymorfismem či bodovou mutací poblíž místa komplementárního nasednutí oligonukleotidové sondy.

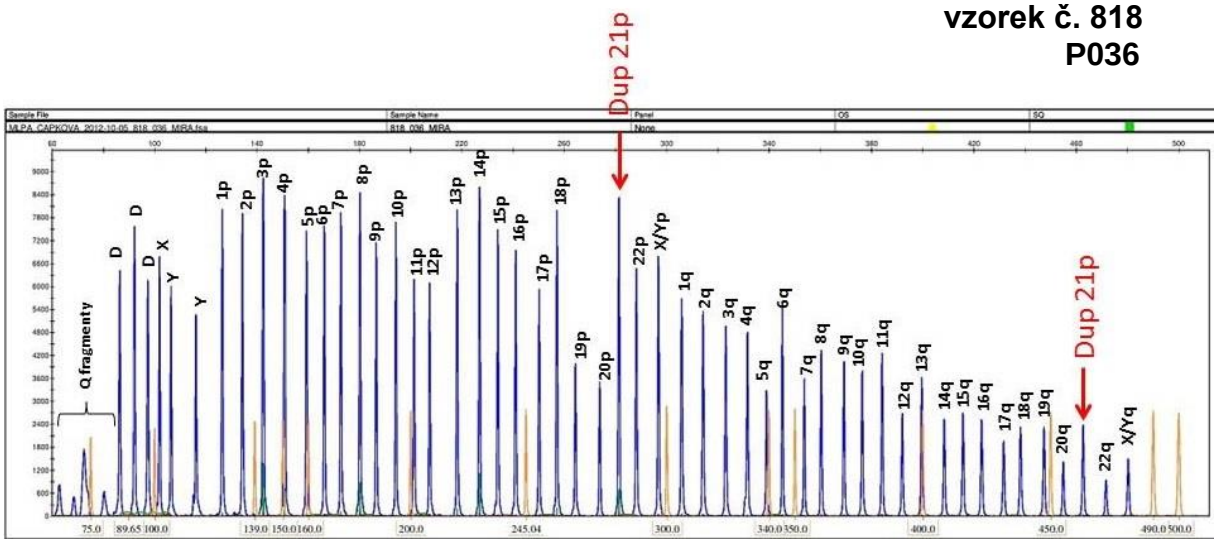
Gene	Chr.pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio
TNFRSF18 probe 2270-L1762	01p36.3	306	01-001.0 TNFRSF18	1	Normal (1.0)
SH3BP5L probe 4084-L3605	01q44	130	01-247.1 SH3BP5L	2	Normal (1.01)
ACP1 probe 2709-L2856	02p25	314	02-000.3 ACP1	3	Normal (0.81)
ATG4B probe 2781-L3168	02q37.2	137	02-236.3 ATG4B	4	Normal (0.93)
CHL1 probe 2896-L2363	03p26.1	322	03-000.3 CHL1	5	Normal (1.24)
KIAA0226 probe 2690-L2842	03q29	144	03-198.8 KIAA0226	6	Normal (0.83)
ZNF141 probe 2779-L2221	04p16.3	330	04-000.3 ZNF141	7	Normal (1.02)
FRG1 probe 2691-L2843	04q35	151	04-191.1 FRG1	8	Normal (1.29)
LOC133957 probe 2791-L2233	05p15.33	338	05-000.3 LOC133957	9	Normal (1.01)
GNB2L1 probe 2790-L2232	05q35.3	158	05-180.6 GNB2L1	10	Normal (0.9)
IRF4 probe 4077-L3462	06p25-p23	346	06-000.3 IRF4	11	Normal (0.97)
TBP probe 2694-L2844	06q27	165	06-170.7 TBP	12	Normal (1.18)
UNC84A probe 2780-L2857	07p22.3	354	07-000.9 UNC84A	13	Normal (0.8)
VIPR2 probe 2793-L3167	07q36.3	172	07-158.6 VIPR2	14	Normal (0.86)
FBXO25 probe 2715-L0973	08p23.3	362	08-000.4 FBXO25	15	Normal (0.99)
RECQL4 probe 2695-L0610	08q24.3	179	08-145.7 RECQL4	16	Normal (1.09)
DOCK8 probe 2716-L0688	09p24.3	370	09-000.4 DOCK8	17	Normal (0.87)
EHMT1 probe 2792-L2846	09q34.3	186	09-139.8 EHMT1	18	Normal (1.17)
ZMYND11 probe 5180-L2227	10p14	378	10-000.2 ZMYND11	19	Normal (1.24)
ECHS1 probe 2696-L2847	10q26.2-q26.3	194	10-135.0 ECHS1	20	Normal (0.91)
BET1L probe 2784-L2226	11p15.5	386	11-000.2 BET1L	21	Normal (0.98)
IGSF9B probe 2697-L2848	11q25	202	11-133.3 IGSF9B	22	Normal (1.24)
JARID1A probe 2787-L2229	12p11	394	12-000.3 JARID1A	23	Normal (1.2)
ZNF10 probe 2686-L2849	12q24.33	210	12-132.2 ZNF10	24	Normal (1.14)
PSPC1 probe 2717-L3608	13q12.11	402	13-019.2 PSPC1	25	Normal (0.79)
CDC16 probe 2698-L0753	13q34	218	13-114.0 CDC16	26	Normal (0.96)
PARP2 probe 2718-L0732	14q11.2-q12	410	14-019.9 PARP2	27	Normal (0.99)
MTA1 probe 2699-L2850	14q32.3	226	14-105.0 MTA1	28	Normal (1.1)
NDN probe 4026-L1542	15q11.2-q12	418	15-021.5 NDN	29	Normal (0.75)
TM2D3 probe 2701-L2851	15q26.3	234	15-100.0 TM2D3	30	Normal (1.28)
DECR2 probe 2720-L0648	16p13.3	426	16-000.4 DECR2	31	Normal (0.97)
GAS8 probe 2702-L0734	16q24.3	242	16-088.6 GAS8	32	Normal (1.14)
RPH3AL probe 4081-L3465	17p13.3	434	17-000.1 RPH3AL	33	Normal (1.05)
SECTM1 probe 2703-L3169	17q25	250	17-077.9 SECTM1	34	Normal (1.16)
THOC1 probe 2789-L2231	18p11.32	442	18-000.2 THOC1	35	Normal (0.99)
CTDP1 probe 2704-L3607	18q23	258	18-075.6 CTDP1	36	Normal (1.03)
PPAP2C probe 3501-L2880	19p13	450	19-000.2 PPAP2C	37	Ambiguous (0.61)
CHMP2A probe 2705-L2853	19q13.43	266	19-063.8 CHMP2A	38	Normal (0.97)
ZCCHC3 probe 2723-L0641	20p13-p12.2	458	20-000.2 ZCCHC3	39	Normal (0.98)
UCKL1 probe 2706-L0642	20q13.33	274	20-052.1 UCKL1	40	LOH (0.58)
STCH probe 2724-L0334	21q11	466	21-014.7 STCH	41	Normal (0.8)
S100B probe 2587-L2854	21q22.3	282	21-046.8 S100B	42	Normal (0.83)
IL17R probe 2725-L0660	22q11.1	474	22-016.0 IL17R	43	Normal (1.2)
ARSA probe 2707-L0661	22q13.33	290	22-049.4 ARSA	44	Gain (1.69)
SHOX probe 3714-L0910	Xpter-p22.32	482	X-000.5 SHOX	45	Normal (1.07)
SYBL1 probe 2708-L2855	Xq28	298	X-154.8 SYBL1	46	Normal (1.22)

3.2 Výsledky vyšetření DNA izolované z choriových klků

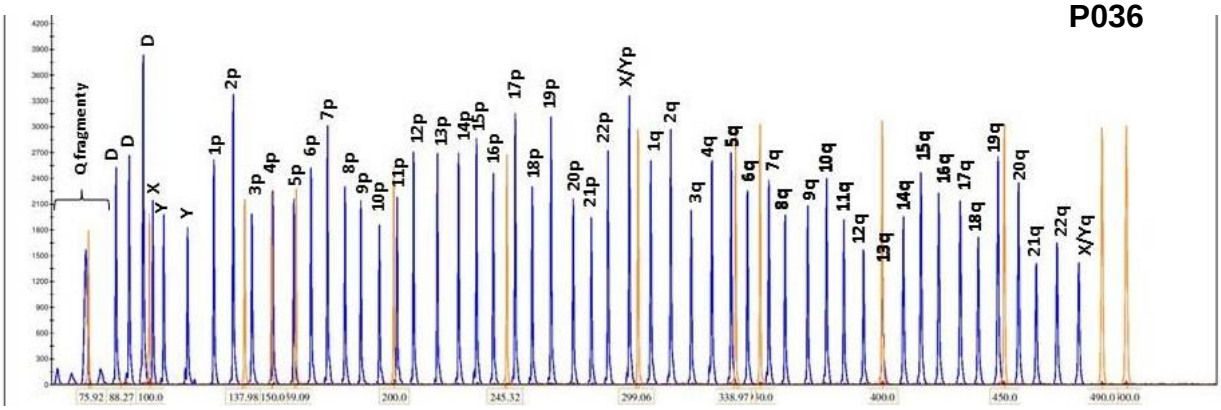
3.2.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036

Datum provedení: 17.7.2012

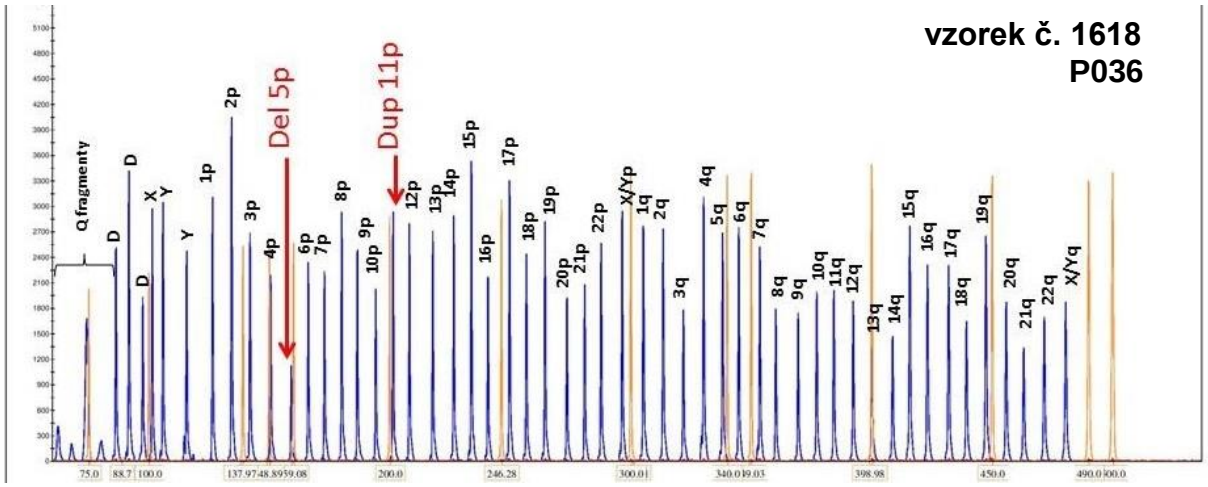
vzorek č. 818
P036

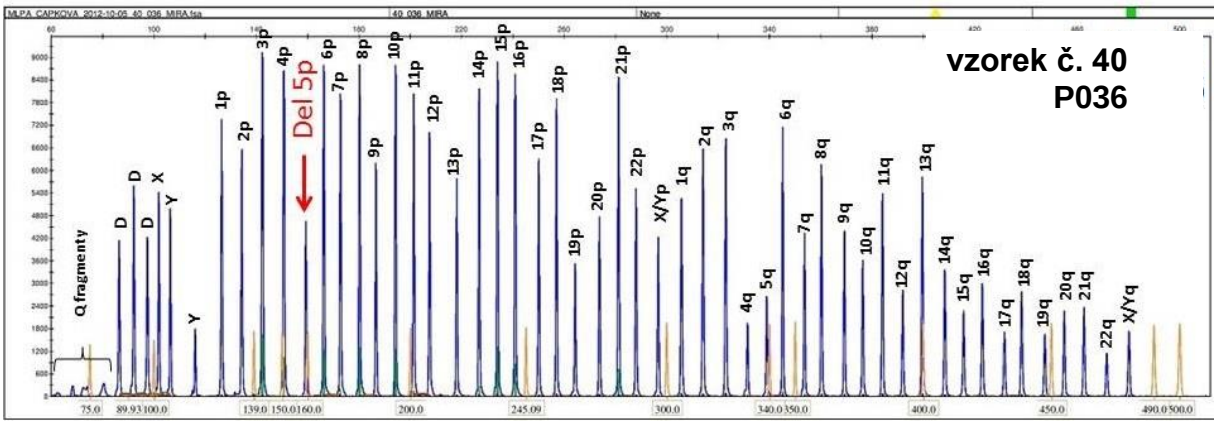


referenční vzorek č. 625
P036



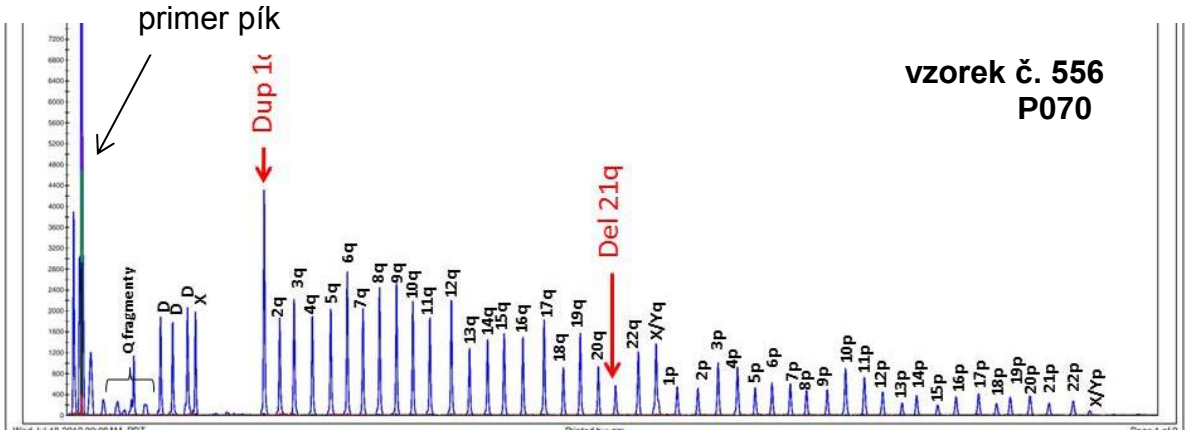
vzorek č. 1618
P036

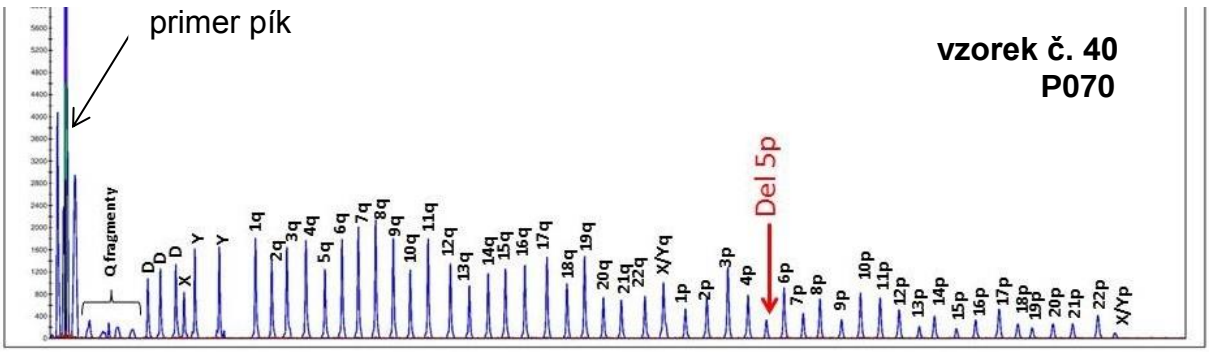


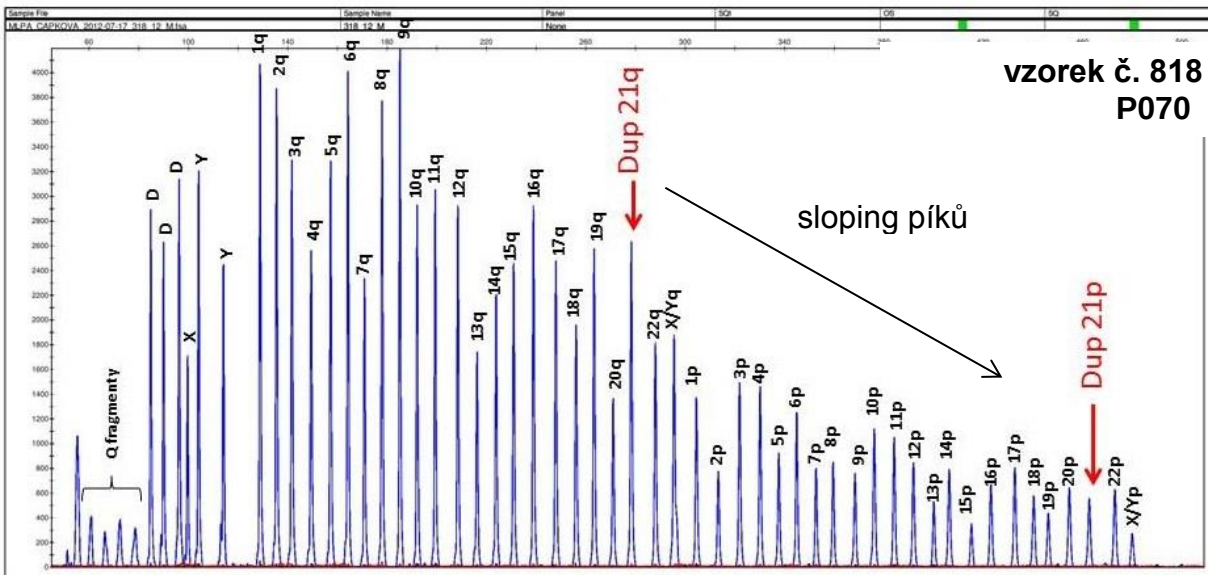


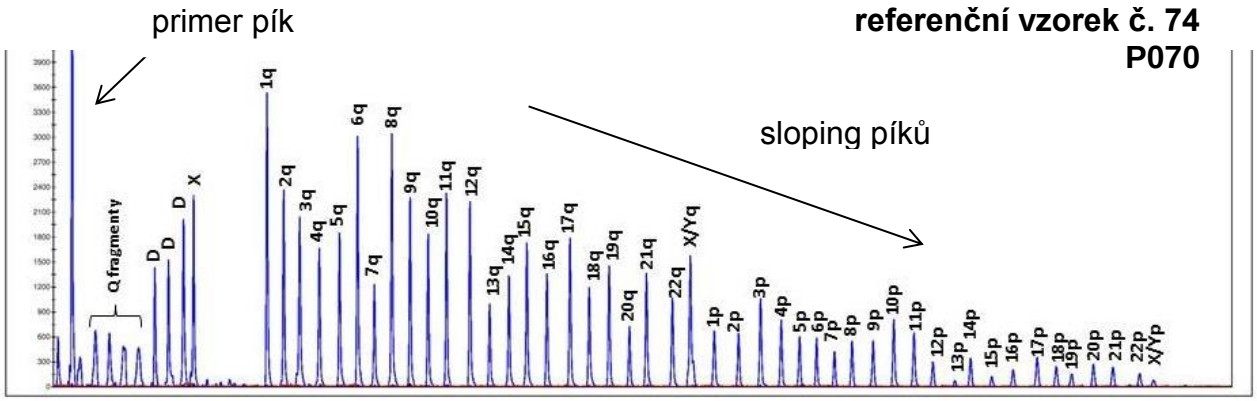
3.2.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070

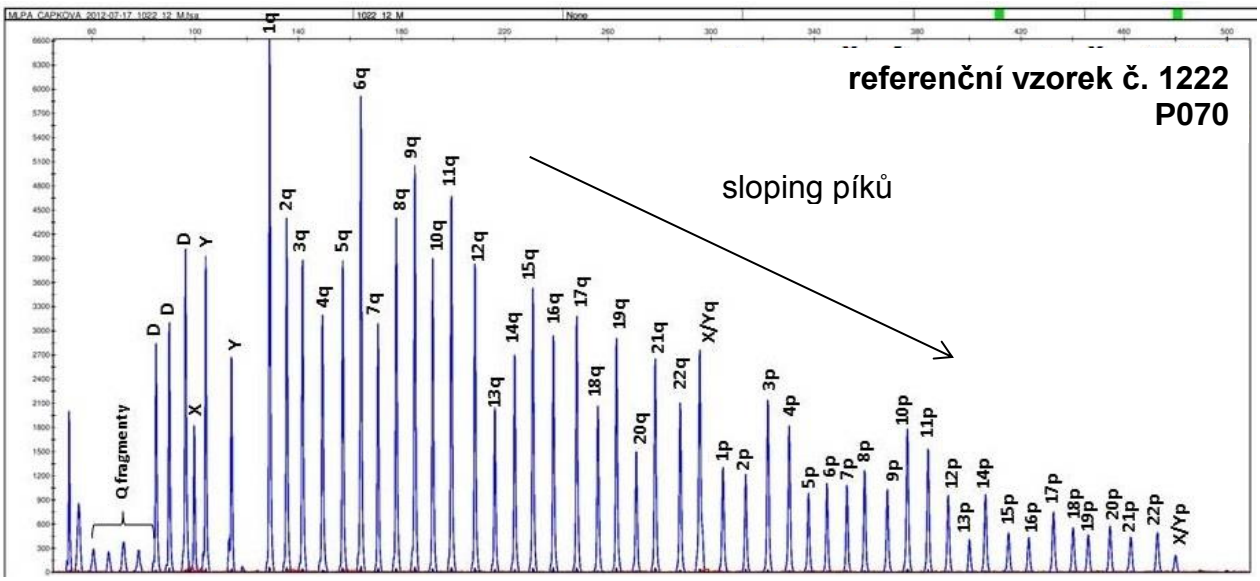
Datum provedení: 17.7.2012






vzorek č. 818
P070
Dup 21q
Dup 21p
sloping píků
Q fragmenty


primer pík
referenční vzorek č. 74
P070
sloping píků
Q fragmenty


referenční vzorek č. 1222
P070
sloping píků
Q fragmenty

Množství DNA izolované z choriových klků QIAamp kitem bylo při použití SALSA MLPA kitu P036 a P070 dostatečné a denaturace vzorku proběhla kompletně.

U vzorků testovaných kitem P070 však docházelo k výraznému slopingu a tvorbě vysokého primer píku. Tento problém mohl být důsledkem nadměrné kontaminace vzorku DNA, evaporace během pipetování reakční směsi a selháním PCR reakce. Hodnocení kvality jednotlivých elekroforetogramů viz. Tab.XI. Výsledky vyšetření vzorků jsou znázorněny v Tab. XV.

Tab. XI - Hodnocení kvality výstupních elektroforetogramů vzorků DNA izolované z choriových klků.

DNA izolovaná z choriových klků číslo vzorku	typ izolace DNA	použitý SALSA MLPA kit	koncentrace DNA na základě výšky Q fragmentů	denaturace DNA na základě výšky D fragmentů	sloping píků	Kontrola produktu – vyšší než 300 RFU (měřeno výškou píku), primer pík
1618	QIAamp Mini Kitem	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
40	QIAamp Mini Kitem	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
818	QIAamp Mini Kitem	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
625- referenční vzorek	QIAamp Mini Kitem	P036	dostačující	kompletní	ne	dostatečné, ne
1222- referenční vzorek	QIAamp Mini Kitem	P036	dostačující	kompletní	ano	dostatečné, ne
556	QIAamp Mini Kitem	P070	dostačující	kompletní	ano	nedostatečné, ano
40	QIAamp Mini Kitem	P070	dostačující	kompletní	ano	nedostatečné, ano
818	QIAamp Mini Kitem	P070	dostačující	kompletní	ano	dostatečné, ne
74- referenční vzorek	QIAamp Mini Kitem	P070	dostačující	kompletní	ano	nedostatečné, ano
1222- referenční vzorek	QIAamp Mini Kitem	P070	dostačující	kompletní	ano	dostatečné, ne
slepý vzorek	-	P036/P070	-	-	-	bez produktů, ano

3.2.3 Potvrzení výsledků metody MLPA

Obr. 12 - Potvrzení patologického nálezu (5p-) u vzorku č. 40 sestavením karyotypu pomocí G- pruhování.

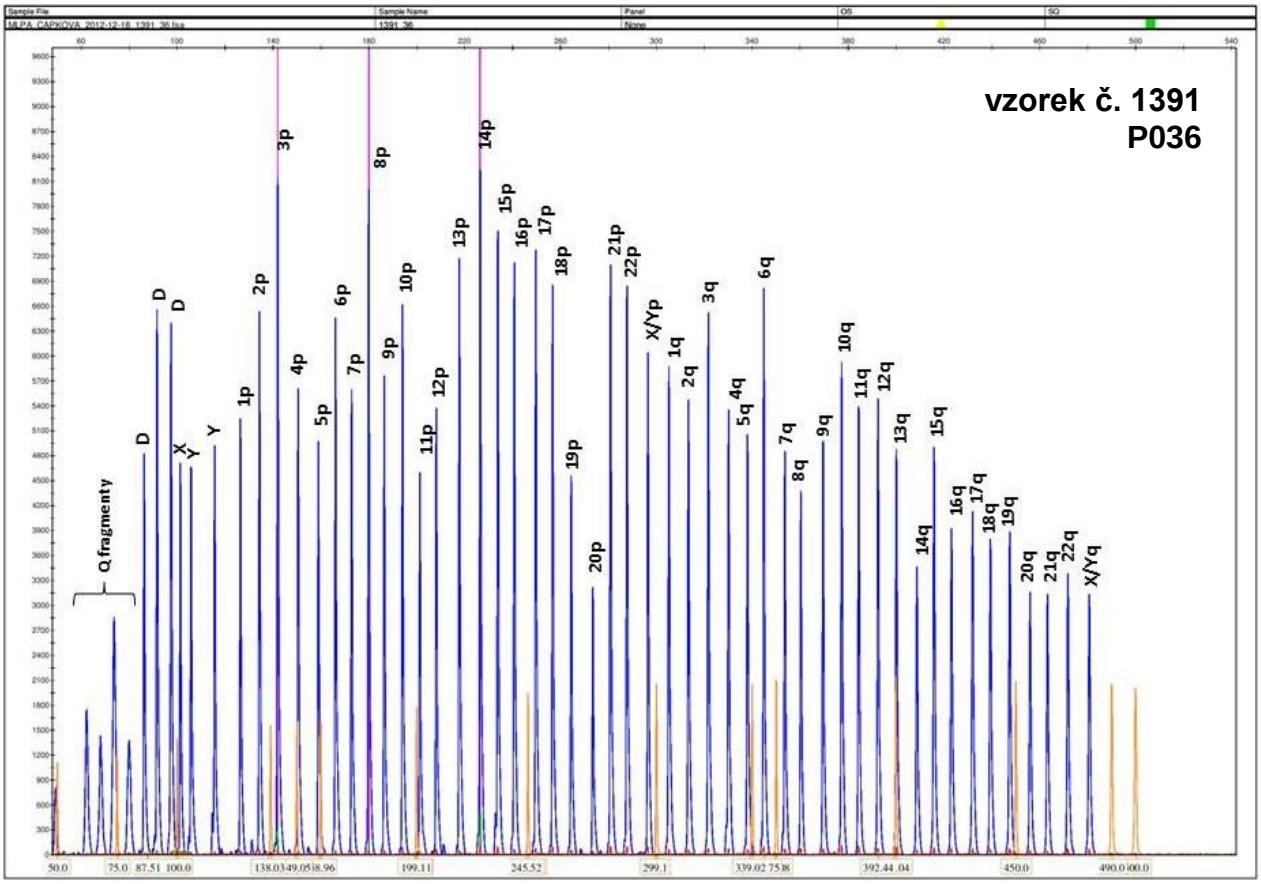
Tab. XII- Potvrzení patologického nálezu (21+) vzorku č. 818 softwarovým programem MLPA Coffalyser.

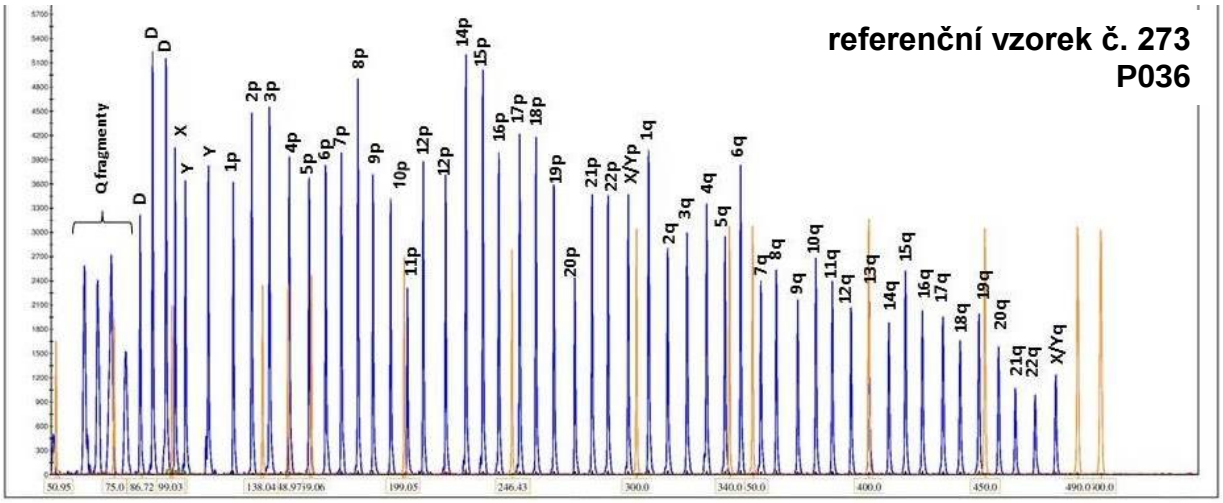
Gene	Chr.pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio
TNFRSF4 probe 2269-L01761	01p	130	01-001.1 TNFRSF4	1	Normal (1.23)
KIAA1720 probe 2392-L02149	01q	306	01-247.1 KIAA1720	2	Normal (1.04)
ACP1 probe 2274-L08758	02p	137	02-000.3 ACP1	3	Normal (1.17)
CAPN10 probe 1742-L01308	02q	314	02-241.3 CAPN10	4	Normal (0.93)
CHL1 probe 1721-L01329	03p	144	03-000.3 CHL1	5	Normal (1.25)
BDH probe 2013-L02052	3q	322	03-198.8 BDH	6	Normal (0.92)
FLJ20265 probe 2005-L02047	04p	151	04-000.5 FLJ20265	7	Normal (1.1)
TRIML2 probe 7046-L06655	4q	330	04-189.3 TRIML2	8	Normal (1.23)
PDCD6 probe 1723-L01327	05p	158	05-000.4 PDCD6	9	Normal (1.05)
GNB2L1 probe 3319-L02737	05q	338	05-180.6 GNB2L1	10	Normal (0.96)
IRF4 probe 1724-L02048	06p	165	06-000.3 IRF4	11	Normal (0.94)
PSMB1 probe 1746-L01304	06q	346	06-170.8 PSMB1	12	Normal (0.99)
CENTA1 probe 2275-L02049	07p	172	07-000.7 CENTA1	13	Normal (0.95)
VIPR2 probe 1747-L01303	07q	354	07-158.4 VIPR2	14	Normal (0.97)
FBXO25 probe 2397-L01845	08p	179	08-000.4 FBXO25	15	Normal (1.15)
KIAA0150 probe 1748-L01302	08q	362	08-144.6 KIAA0150	16	Normal (0.82)
DMRT1 probe 1727-L02050	09p	186	09-000.9 DMRT1	17	Normal (1.02)
EHMT1 probe 8205-L08170	09q	370	09-139.8 EHMT1	18	Normal (1.01)
KIAA0934 probe 2277-L01768	10p	194	10-000.5 KIAA0934	19	Normal (1.12)
PAO probe 9142-L09953	10q	378	10-135.1 PAO	20	Normal (0.88)
RIC-8 probe 3315-L02733	11p	202	11-000.2 RIC-8	21	Normal (0.97)
KIAA0056 probe 1751-L01299	11q	386	11-133.6 KIAA0056	22	Normal (0.98)
SLC6A12 probe 2276-L01767	12p	208	12-000.2 SLC6A12	23	Normal (0.94)
ZNF10 probe 2687-L02154	12q	394	12-132.3 ZNF10	24	Normal (1.04)
PSPC1 probe 2399-L01847	13p	218	13-019.2 PSPC1	25	Normal (1.2)
F7 probe 1753-L01297	13q	402	13-112.8 F7	26	Normal (0.86)
HEI10 probe 1732-L01318	14p	226	14-019.9 HEI10	27	Normal (1.18)
MTA1 probe 2778-L02201	14q	410	14-105.0 MTA1	28	Normal (0.77)
MKRN3 probe 7291-L08858	15p	234	15-021.4 MKRN3	29	Normal (1.05)
ALDH1A3 probe 1755-L01295	15q	418	15-099.3 ALDH1A3	30	Normal (1.07)
POLR3K probe 1734-L01316	16p	242	16-000.04 POLR3K	31	Normal (0.86)
AS11 / GAS8 probe 3201-L026	16q	426	16-088.6 GAS11 / GAS8	32	Normal (0.87)
RPH3AL probe 1735-L01315	17p	250	17-000.2 RPH3AL	33	Normal (0.88)
TBCD probe 1757-L01293	17q	434	17-078.4 TBCD	34	Normal (1.02)
USP14 probe 1736-L02051	18p	258	18-000.2 USP14	35	Normal (1.25)
FLJ21172 probe 1758-L01292	18q	442	18-075.9 FLJ21172	36	Normal (0.96)
CDC34 probe 1737-L01313	19p	266	19-000.5 CDC34	37	Normal (0.8)
BC-2 probe 9143-L10626	19q	450	19-063.8 BC-2	38	Normal (1.02)
SOX12 probe 2396-L01844	20p	274	20-000.3 SOX12	39	Normal (0.84)
OPRL1 probe 2688-L02884	20q	458	20-062.2 OPRL1	40	Normal (0.74)
RBM11 probe 1739-L01311	21p	282	21-014.5 RBM11	41	Gain (1.3)
HMT1 probe 2586-L02059	21q	466	21-046.9 HMT1	42	Gain (1.62)
BID probe 1740-L01310	22p	290	22-016.6 BID	43	Normal (1.04)
RABL2B probe 1762-L08761	22q	474	22-049.5 RABL2B	44	Normal (0.89)
SHOX probe 1148-L01331	X/Yp	298	X/Y-000.6 SHOX	45	Normal (1.09)
SYBL1 probe 1763-L02150	X/Yq	482	X/Y-154.7 SYBL1	46	Normal (1.24)

3.3 Výsledky vyšetření DNA izolované z plodové vody

3.3.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036

Datum provedení: 3.11.2012

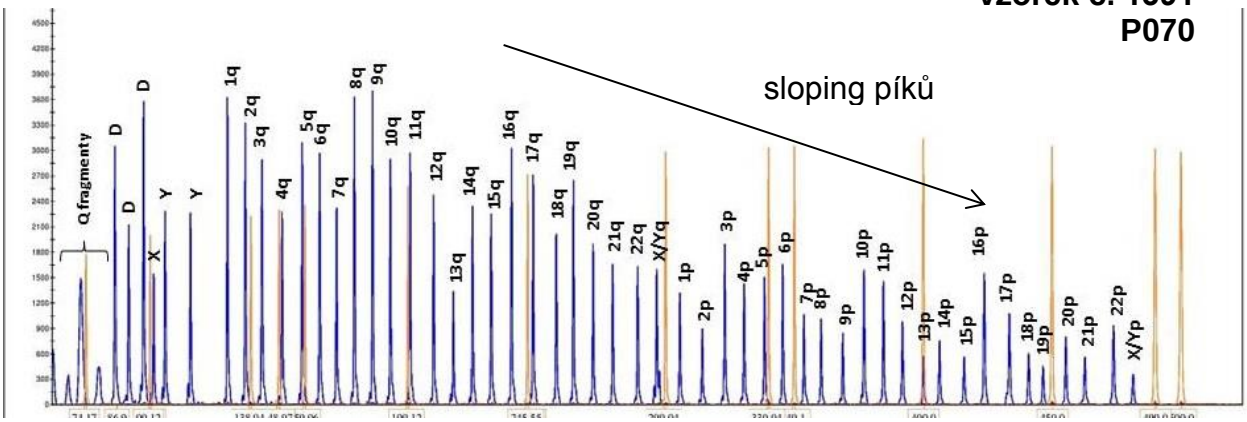




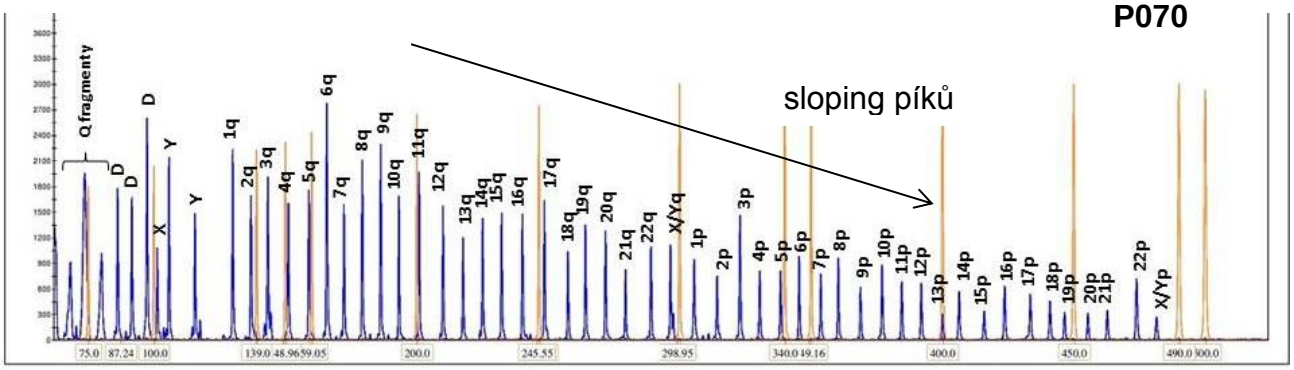
3.3.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070

Datum provedení: 3.11.2012

vzorek č. 1391
P070



referenční vzorek č. 273
P070



DNA byla v tomto případě izolovaná z plodové vody pomocí QIAamp kitu. Výsledná koncentrace DNA z amniocytů však při použití SALSA MLPA kitu P036, tak P070 byla nižší něž u předchozích biologických materiálů. To způsobilo zviditelnění kontrolních Q fragmentů, které jsou vyšší než $\frac{1}{3}$ kontrolního D fragmentu o velikosti 92 nukleotidů. Denaturace však proběhla kompletně.

U vzorků, které byly testovány SALSA MLPA kitem P070 docházelo opět k výraznému slopingu píků, který mohl být důsledkem nečisté DNA či vypařováním během pipetování reakčních směsí ke vzorku. Hodnocení kvality jednotlivých elekroforetogramů viz. Tab. XIII. Výsledky vyšetření vzorků jsou znázorněny v Tab. XV.

Tab. XIII - Hodnocení kvality výstupních elektroforetogramů vzorků DNA izolované z plodové

DNA izolovaná z plodové vody číslo vzorku	typ izolace DNA	použitý SALSA MLPA kit	koncentrace DNA na základě výšky Q fragmentů	denaturace DNA na základě výšky D fragmentů	sloping píků	Kontrola produktu – vyšší než 300 RFU (měřeno výškou píku), primer pík
1391	QIAamp Mini Kitem	P036	nedostačující	kompletní	ne	dostačující, ne
273- referenční vzorek	QIAamp Mini Kitem	P036	nedostačující	kompletní	ne	dostačující, ne
1339	QIAamp Mini Kitem	P070	nedostačující	kompletní	ano	dostačující, ne
273- referenční vzorek	QIAamp Mini Kitem	P070	nedostačující	kompletní	ano	dostačující, ne
slepý vzorek	-	P036/P070	-	-	-	bez produktů, ano

3.4 Souhrnný přehled výsledků vyšetření všech testovaných vzorků a jejich ověření jinými metodami

Tab. XV- Výsledky vyšetření všech testovaných vzorků a ověření jinými metodami.

vzorek č.	primární biologický materiál	cytogenetická analýza	výsledek MLPA	výsledek FISH	ostatní vyšetření	povaha změny	velikost změny (Mb)	syndromologická jednotka
348	periferní krev	46,XX	rsa 20q13.3(P036,P070)x1 rsa 22q13.3(P036;P070)x3	.ish der(20)t(20;22)(q13.33;q13.33)(SHANK3+,RABL2B+, ARSA+)dnv	SNP array	mikrodelece 20q13 mikroduplikace 22q13	1,6 cca 1	
1339	periferní krev	46,XX	rsa 2q37.3(P036;P070)x1 rsa 18q23(P070;P036)x3	.ish der(2)t(2;18)(q37.3;q23)(q37-,q23+)		mikrodelece 2q37.3 mikroduplikace 18q23	? ?	
168	periferní krev	46,XY	rsa 15q11.2(P036)x1	.ish del(15)(q11.2q11.2)(NDN-,SNRPN-)dnv	MS-PCR	mikrodelece 15q11.2	cca 1	Prader-Willi sy
40	choriové klky	46,XY,del(5)(p13pter)	rsa 5p15.2(P070,P036)x1	-	MLPA - mikrodeleční rsa 5p15.33(P245)x1	delece 5p	cca 35	Cri-du-Chat
818	choriové klky	47,XY,+21	rsa 21q(P036,P070)x3	-	QFPCR - trisomie 21	trisomie 21		Down sy
556	choriové klky	46,XX,der(21)	rsa 21q22.3(P070)x1 rsa 1q44(P070)x3	.ish der(21)t(1;21)(q44;q22.3)pat	SNP array	delece 21q22.3 duplikace 1q42q44	9,88 22,4	
1618	choriové klky	46,XY,der(5)	rsa 5p15.2(P036)x1 rsa 11p15.5(P036)x3	.ish der(5)t(5;11)(p15.2;p15.31)	SNP array	delece 5pter duplikace 11pter	16,8 10	Cri-du-Chat
1391	plodová voda	46,XY	rsa (P036;P070)x2	-	-	žádná	-	

4. Diskuze

Celkem bylo vyšetřeno 8 vzorků DNA - u 6 byla potvrzena očekáváná chromozomální aberace. V 1 případě byla nalezena aberace nová. MLPA testy byly prováděny za použití SALSA MLPA kitů P036 a P070. Testování vzorků pomocí SALSA MLPA kitu P036 přineslo mnohem lepší výsledky z důvodu časté přítomnosti slopingu píků při testování kitem MLPA P070.

Tzv. ´sloping píků´ - signál delších MLPA fragmentů je více než 3x menší, než signál MLPA fragmentů kratších. Hlavními příčinami mohla být:

- kontaminace vzorku DNA, která potlačí účinky polymerázy (Fe, ethanol)
- účinné řešení:
    - použití menšího množství DNA
    - další přečištění DNA
    - prodloužení doby denaturace vzorku

- vypařování vzorku během hybridizace, při pipetování ligační směsi nebo při nedokonalém uzavření PCR mikrozkumavky umístěné v termocykléru
- řešením bývá:
    - kontrola uzavření PCR mikrozkumavky
    - kontrola vypařování vzorku pomocí přidání 1 PCR mikrozkumavky naplněné 8 µl vody
    - zamezení vypařování během pipetování postupným otevíráním a uzavíráním PCR mikrozkumavek

Koncentrace DNA izolované z periferní krve a choriových klků byla ve všech testovaných vzorcích dostatečná. Nízké množství DNA ve vzorku bylo při izolaci DNA z plodové vody pomocí QIAamp kitu, které způsobilo zvýšení kontrolních Q fragmentů ve výsledném elektroforetogramu. Tyto píky kontrolních Q fragmentů (viz. Tab. IV) byly vyšší než $\frac{1}{3}$ 92nt kontrolního D fragmentu. Optimální množství použité DNA ve vzorku je v rozmezí 100- 200 ng (koncentrace 20 ng/µl). U vzorku izolovaného z plodové vody by bylo vhodné koncentraci DNA zvýšit na 24 ng/µl.

Při nekompletní denaturaci hybridizované DNA dochází ke snížení píků kontrolních D fragmentů (88 nt a 96 nt) na hodnotu menší než 40 % kontrolního 92nt fragmentu (viz. Tab. IV). Nekompletní denaturaci podléhají především sekvence DNA bohaté na CG mající vyšší Tm (teplota tání) a díky tomu zde obtížněji dochází k denaturaci DNA dvoušroubovice. Nejvíce bývá nekompletní denaturací ovlivněn signál sond, jejichž cílová sekvence se nachází v nebo poblíž těchto CpG ostrovů. Specifické sondy tedy nemohou správně hybridizovat a být ligovány Ligázou - 65, což vede ke tvorbě zkreslených výsledků ve formě falešných delecí. Denaturace je ovlivněna především přítomností kontaminantů - solí (KCl, NaCl) a dalších iontů (Fe, Mg). V testovaných vzorcích nebyl tento jev zaznamenán. Zabránit nekompletní denaturaci lze použitím menšího množství DNA a tím pádem i menšího množství kontaminantů, dalším přečištěním DNA (např. ethanolovým srážením) či přidáním glycerolu do 5 µl testovaného vzorku DNA.

V některých vzorcích byla zaznamenána přítomnost vysokého primer píku (20 - 60 nt). K jeho vytvoření dochází při nesprávném průběhu PCR reakce popř. při nedostatečném množství DNA (slepý vzorek viz. Obr. 8). Nedochází tedy k exponenciální tvorbě PCR produktů a signál nenamnožených oligonukleotidových sond je zachycen kapilární elektroforézou v přední části elektroforetogramu (viz. 3.1.1 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P036, vzorek č. 168, viz. 3.2.2 Vyšetření za použití SALSA MLPA kitu P070, vzorek č. 556, 40, 74). Vysokému primer píku se můžeme vyvarovat použitím ledové drtě při tvorbě polymerase master mixu či spuštěním PCR programu v termocykléru ihned po napipetování polymerase master mixu ke vzorku DNA.

5. Závěr

Cílem této bakalářské práce byla detekce chromozomálních aberací metodou MLPA a její optimalizace na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny ve Fakultní nemocnici Olomouc. U 8 testovaných vzorků jsem v 6 případech potvrdila již dříve nalezenou chromozomální aberaci a v 1 případě byla nalezena aberace nová (viz. Tab. XV), která byla ověřena i jinými metodami (Obr. 11a a 11b, Tab. X). Testování prokázalo, že tato metoda je spolehlivým nástrojem k detekci chromozomálních aberací jak z DNA izolované z periferní krve (postnatální vyšetření u dětských pacientů s mentální retardací), tak DNA izolované z choriových klků a plodové vody (prenatální vyšetření). Obě metody izolace DNA jsou použitelné pro zisk DNA určené na vyšetření MLPA. Vstupní koncentrace 20 ng/µl se jeví být dostatečná s výjimkou DNA izolované z plodové vody, kde by bylo vhodné její koncentraci mírně zvýšit. Problém s podílem kontaminantů v izolované DNA, které negativně ovlivňují amplifikaci dlouhých fragmentů DNA lze řešit např. vyšším zředěním vzorku, přečištěním vzorku nebo prodloužením doby denaturace DNA. Metoda MLPA byla potvrzena jako vhodná, spolehlivá a finančně dostupná diagnostická technika pro cílenou detekci chromozomálních aberací.

Seznam použitých zkratek

AE	acetát sodný / ethylendiamintetraoctová kyselina
bp	pár bazí
CGH	Komparativní genomová hybridizace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DQ	dávkový koeficient
FAM	fosforamidit
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
LB	pufr s borátem lithným
MAPH	Multiplex amplifiable probe hybridization
Mb	mega base pairs = 1 000 000 párů bazí
MLPA	Multiplex ligation - dependent probe amplification
MS - MLPA	Methylation - specific multiplex ligation - dependent probe amplification
nt	nukleotid
PCR	Polymerázová řetězová reakce
QF - PCR	Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce
rfu	relativní fluorescenční jednotka
RNA	ribonukleová kyselina
RT - MLPA	Reverse transcriptase multiplex ligation - dependent probe amplification
SDS	dodecylsíran sodný
Tamra	tetramethylrhodamin azid
TE	tris (hydroxymethyl) aminomethan / ethylendiamintetraoctová kyselina
Tm	teplota tání

Literatura

Ahn, J. W., Ogilvie, C. M., Welch, A., Thomas, H., Madula, R., Hills, A, Donaghue, C., Mann, K. (2007): Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of analysis protocol, and application in diagnostic centre. BMC Medical Genetics 8 (1), 9. Dostupné na http://www.biomedcentral.com/1471-2350/8/9/

Armour, J.A.L, Sismani, C., Patsalis, P.C., Cross, G. (2000): Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. Nucleic Acid Research 28 (2): 605- 609

Bay., J. Aneuploidy and Related Biotechnologies Discussion 2009 [online]. [cit. 19.4.2013]. Dostupné na http://lens.auckland.ac.nz/index.php/Aneuploidy_and_Related_Biotechnologies_Discussion_2009

Coffa, J., van der Wiel, M.A, Diosdado, B., Carvalho, B., Schouten, J., Meijer, G.A. (2008): MLPA analyzer: data analysis tool for reliable automated normalization of MLPA fragment data. Analytical Cellular Pathology 30 (4): 323-35.

Cummings, B. Drugs Information Online [online]. [cit. 19.4.2013]. Dostupné na http://drugline.org/medic/term/meiotic-nondisjunction/

de Vries, B. B. A., White, S. M., Knight, S. J. L., Regan, R., Homfray, T., Young, I. D., Super, M., McKeown, C., Splitt, M., Quarrell, O. W. J., Trainer, A. H., Niermeijer, M. F., Malcolm, S., Flint, J., Hurst, J. A., Winter, R. M. (2001): Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. Journal of Medical Genetics 38: 145- 150.

de Vries, B. B. A., Winter, R., Schnizel, A., van Ravenswaaij- Arts, C. (2003): Telomeres: a diagnosis at the end of chromozomes. Journal of Medical Genetics 40: 385- 398.

Flint, J., Wilkie, A.O.M., Buckle, V.J., Winter, R.M., Holland, A.J., McDermid, H. E. (1995): The detection of subtelomeric chromozomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nature Genetics 9: 132- 140

Hladílková, A., Grečmalová, D., Černá, D., Šilhánová, E. (2012): Nové možnosti diagnostiky příčin mentální retardace u dětí. Pediatria pre prax 13 (3): 11- 15.

Hultén, M.A., Dhanjal, S., Pertl, B. (2003): Rapid and simple prenatal diagnostic of common chromozome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. Reproduction 126: 279- 297

Kočárek, E. Molekulární biologie v medicíně. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007.

Kočárek, E., Novotná, D., Novotná, K., Strnad, M., Zapletal, R., Goetz, P. (2002): Diagnostika chromozomálních aberací. Postdgraduální medicína 5: 502- 510

Kozlowski, P., Kwiatkowki, D.J., Jasinska, A.J. (2008): New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. Electrophoresis 29 (23): 4627- 4636.

Linardopoulou, E.V., Williams, E.M., Fan, Y., Friedman, C., Young, J.M., Trask, B.J. (2005): Human subtelomeres are hot spots of interchromozomal recombination and segmental duplication. Nature 437 (7055): 94– 100

MRC Holland MLPA (2008): SALSA MLPA kit P036-E1 human telomere-3. Description version 03.

MRC Holland MLPA (2010): MLPA® Reaction- DNA detection/ quantification. MLPA DNA protocol Version 29.

MRC Holland MLPA (2010): SALSA MLPA kit P070-B1 human telomere-5. Description version 31.

MRC Holland MLPA (2012): Cost-effective and sensitive genomic and methylation profiling. Description version 33.

MRC Holland MLPA (2012): MLPA® DNA protocol version MDP- v002.

MRC Holland MLPA : Copy number quantification and Methylation detection Dostupné na http://mlpa.com

Shaffer, L.G, Lupski, J.R. (2000): Molecular mechanisms for constitutional chromozomal rearrangements in humans. Annual Review of Genetics 34: 297- 329.

Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation- dependent probe amplification. Nucleic Acids Research 30(12) e57. Dostupné na http://nar.oxfordjournals.org/content/30/12/e57.short

Snustad, D., Simmons, M.J. Genetika. 5. vyd. Překlad Jiřina Relichová. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

Urban, T. Genetické stránky Tomáše Urbana [online]. [cit. 19.4.2013]. Dostupné na http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_cyto1.html

Wu, Y., Ji, T., Wang, J., Xiao, J., Wang, H., Li, J., Gao, Z., Yang, Y., Cai, B., Wang, L., Zhou, Z., Tian, L., Wang, X., Zhong, N., Quin, J., Wu, X., Jiang, Y. (2010): Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patiens with unexplained developmental delay/ mental retardation. BMC Medical Genetics 11(1): 72. Dostupné na http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/72