



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Použití metody MLPA pro stanovení nebalancovaných změn genomu

Vypracovala: Miroslava Křihová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ondřej Scheinost

České Budějovice 2015

Abstrakt

Nebalancované přestavby chromosomů nebo-li nevyvážené přestavby jsou změny spojené s přítomností nadbytečného určitého chromosomového úseku, nebo se naopak jedná o jeho absenci.

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) je metoda založená na PCR (Polymerase Chain Reaction) principu, která ale na místo cílových sekvencí amplifikuje MLPA sondy, které se na tyto cílové sekvence hybridizují a následně je při ligaci spojují. Při MLPA je použit pouze jeden pár PCR primerů.

V teoretické části se zabývám představením MLPA metody a v krátkosti i dalších metod využívaných v diagnostice lékařské genetiky např. PCR, FISH (Fluorescence in situ hybridization), Array CGH (Comparative genomic hybridization). Taky jsem zde uvedla nemoci, které jsou nebalancovanými přestavbami způsobené a některé z nich i více popsala a to konkrétně mentální retardaci a mutaci genu BRCA1,2 (Breast cancer)....

Praktickou část jsem prováděla v Laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. a to konkrétně pod vedením pana Mgr. Ondřeje Scheinosta. Zde jsem se zabývala provedením metody MLPA u konkrétních pacientů, kvůli diagnostice BRCA1,2 genu, mikrolečních syndromů (mentální retardace) nebo subtelomerických delecí. Vše jsem dělala pod odborným dohledem vedoucího této práce a ostatních pracovníků laboratoře. Všechny postupy byly provedeny podle standartních operačních postupů.

V další části této práce se zabývám interpretací výsledků a jejich srovnáním s ostatními dostupnými metodami. A v neposlední řadě se v této části mé práce zabývám rozvahou nad rozdílnými přístupy statistické analýzy v rámci MLPA.

Klíčová slova: PCR, FISH, Array CGH, MLPA, BRCA1,2 gen, mikroleční syndromy, subtelomerická delece

Abstract

Unbalanced chromosomal structural changes are connected with the presence of supernumerary particular part of chromosome, or the chromosome is absenting.

MLPA is a method based on PCR principal, which amplifies MLPA probes, not the target sequences. MLPA probes hybridize to target sequences and then ligate them. Only one pair of primers is used.

In the theoretical part the MLPA method is presented. Additionally, other diagnostics method of clinical genetic are mentioned (for example PCR, FISH, Array CGH). Diseases caused by unbalanced chromosomal structural changes are discussed too. Mental retardation and BRCA 1, 2 mutation were the main topic.

The experimental part took place in Molecular Biology and Genetics Laboratory in the hospital in České Budějovice. I did my experiments under professional care of Mgr. Ondřej Scheinost and his colleagues. The aim of using MLPA method was to diagnose BRCA 1, 2 gene, microdeletion syndroms or subtelomeric deletions. All procedures were done according to standards.

The final part of my thesis is concerned on the results interpretation and their comparison with other methods. I also thought over different approach of statistical analysis in MLPA.

Keywords: PCR, FISH, Array CGH, MLPA, BRCA1,2 gene, microdeletion syndrome, subtelomeric deletion

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....
(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu této bakalářské práce panu Mgr. Ondřeji Scheinostovi a paní Ing. Petře Duškové za věnovaný čas a pomoc při zpracovávání této bakalářské práce. Dále velký dík patří slečně Mgr. Ivetě Červenkové a mé rodině za podporu a pomoc při studiu a psaní mé bakalářské práce.

Obsah

_Toc427161269

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1. Metoda MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)	2
2.1.1. Analýza dat.....	4
2.1.2. Interpretace výsledků	6
2.1.3. Využití metody MLPA.....	7
2.2. Variace metody MLPA	10
2.2.1. MS-MLPA – Methylačně specifická mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond	10
2.2.2. RT-MLPA – Reverse Transcriptase MLPA.....	12
2.3. Další metody využívané v genetické diagnostice	12
2.3.1. PCR	12
2.3.2. FISH	13
2.3.3. Real time PCR.....	13
2.3.4. Array CGH	14
2.4. Studované nemoci.....	14
2.4.1. BRCA1 a BRCA2 – geny pro dědičnou variantu rakoviny prsu a/nebo vaječníků	14
2.4.2. Mikrodeleční syndromy	17
2.4.3. Subtelomerické delece.....	18
2.4.3.1. Mentální retardace (MR).....	18
3. Praktická část	19
3.1. Příprava vzorku.....	19
3.2. Výběr referenčních vzorků.....	20
3.3. Pracovní postup MLPA reakce ⁽⁵⁾	20

3.4.	Separace fragmentů pomocí kapilární elektroforézy	22
3.5.	Kontrola MLPA reakce	23
3.5.1.	92 nt měřítková sonda	23
3.5.2.	D-fragmenty	23
3.5.3.	Q fragmenty.....	23
3.5.4.	X a Y fragmenty	23
3.6.	Analýza dat	23
3.7.	SALSA MLPA probemixy	24
3.7.1.	SALSA MLPA preobemix P002-D1 BRCA1	24
3.7.2.	SALSA MLPA P045 BRCA2/CHEK2 probemix.....	25
3.7.3.	SALSA MLPA P070 Subtelomerase Mix 2B probemix.....	25
3.7.4.	SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix1 probemix	26
3.7.5.	SALSA MLPA probemix P245-B1 Microdeletion Syndrome-1	26
3.8.	Cíle práce	29
3.9.	Hypotéza	30
4.	Výsledky.....	31
5.	Diskuse	38
6.	Závěr.....	41
7.	Seznam informačních zdrojů	42

Seznam použitých zkratek

MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Array CGH	Comparative genomic hybridization
BRCA	Breast cancer
DNA	Deoxyribonucleic acid
SCF	Short-chain fatty acids
DMD	Duchenne muscular dystrophy
SMA	Spinal Muscular Atrophy
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH1	MutL homolog 1
mRNA	Messenger RNA
BMD	Becker muscular dystrophy
MSH2	Hematopoietic Src homology 2 domain
APC	Adenomatous polyposis coli
NF1	Neurofibromatosis type 1
NF2	Neurofibromatosis type 2
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor

TSC1/2	Tuberous Sclerosis Protein 1/2
MECP2	Methyl CpG binding protein 2
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
LDLR	Low Density Lipoprotein receptor
FBN1	Fibrillin-1
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DPYD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
COL5A1	Collagen alpha-1(V) chain
CACNA1A	Calcium Channel
PKHD1	Polycystic kidney and hepatic disease 1
BRIP1	Fanconi anemia group J protein
SLC26A4	Solute Carrier Family 26 (Anion Exchanger), Member 4
LMNB1	Lamin B1
PRSS1	Protease serine 1
FRMD7	FERM domain containing 7
TPMT	Thiopurine S-methyltransferase
FLCN	Birt-Hogg-Dube syndrome
DNAI1	Primary ciliary dyskinesia (PCD)
EP300	Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS)
UBE3A	Angelman syndrome
PCCA	Propionic acidemia
PCDH15	Usher syndrome

WS	Williams syndrom
PWS	PraderWilly/Angelman syndrom
CMT1	Charcot-Maria-Tooth disease
HNPP	Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy
MS-MLPA	Methylation-Specific MLPA
RSS	Russell-Silver syndrome
RT-MLPA	Reverse transcriptase MLPA
cDNA	Complementary DNA
STRs	Short tandem repeat
CGH	Comperative genomic hybridization
WBS	Williams-Beuren syndrome
SVAS	Supravalvular aortic stenosis
ID	Intellectual disease
MR	Mental retardation
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide

1. Úvod

Genetika jako vědní obor je neustále rozvíjena a svými principy je čím dál více propojována s ostatními klinickými obory (např. pediatrií či prenatální diagnostikou). Významně se uplatňuje při preventivních opatření, která mohou být díky včasné genetické diagnostice využita a choroby tak mohou být identifikovány ještě před příchodem symptomů. Lékařská genetika svým neustálým rozvojem umožňuje zjistit i genetický původ nemoci a to, zda je způsobena abnormalitou v genu či chromosomu, čímž nám zlepšuje diagnostické a léčebné možnosti u pacienta.⁽¹⁾

Mě genetika zaujala už coby studentku na střední škole a to byl také důvod, proč jsem si ji vybrala jako téma své bakalářské práce. Má práce se zabývá jednou z mnoha diagnostických metod, které se v genetice používají a to konkrétně metodou MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification).¹ Tuto metodu využiji pro diagnostiku nebalancovaných změn genomu u pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s. Konkrétně se chci zaměřit na pacienty s: (1) mutací genu BRCA1,2; (2) mikrolečnými syndromy; (3) subtelomerickými delecemi.

V současné době se k detekci nebalancovaných aberací nejčastěji používají metoda MLPA a Array CGH, jejichž porovnání jsem v rámci této práce také provedla.

Nebalancované přestavby chromosomů jsou také někdy nazývány jako nevyvážené přestavby a jsou to změny spojené s přítomností určitého nadbytečného chromosomového úseku, může se však jednat i o jeho absenci.⁽²⁾

Tato práce se zabývá představením metody MLPA a jejímu použití v klinické genetice. Metoda bude použita na vzorcích, kde se předpokládá nebalancovaná aberace v germinálním genomu. Metoda bude srovnána s ostatními metodami detekce nebalancovaných změn; v rámci použití na kontrolních vzorcích bude ověřena její účinnost dalšími dostupnými metodami např. Array CGH. Zvláštní zřetel bude brán na různé metody zpracování dat při vyhodnocování elektroforetogramů (kapilární elektroforéza).

Cílem práce je provedení metody MLPA a porovnání jejích výsledků s ostatními metodami např. Array CGH. Cílem práce je i rozvaha nad rozdílnými přístupy statistické analýzy v rámci MLPA.

¹ Český překlad této metody zní: Mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond.

2. Teoretická část

2.1. Metoda MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Metoda byla vyvinuta firmou MRC-Holland, založenou v roce 1985 Dr. Jan Schoutenem. Vývoji nových technologií pro analýzu DNA se MRC-Holland věnuje až od roku 1997, z nichž nejúspěšnější je právě metoda MLPA. Poprvé byla tato metoda popsána v roce 2002 (Schouten et al.) v časopise *Nucleic Acid Researches*. Od tohoto okamžiku bylo vyvinuto na stovky MLPA sond pro běžná, ale i vzácná onemocnění.⁽³⁾

Metoda MLPA, nebo-li mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond je používána v molekulární diagnostice genetických onemocnění, jejichž patogenita je spojena s delecí či duplikací specifického genu nebo jeho části. Mimoto může být tato metoda používána i k diagnostice genetických onemocnění, která jsou charakteristická přítomností abnormální metylace DNA.⁽⁴⁾

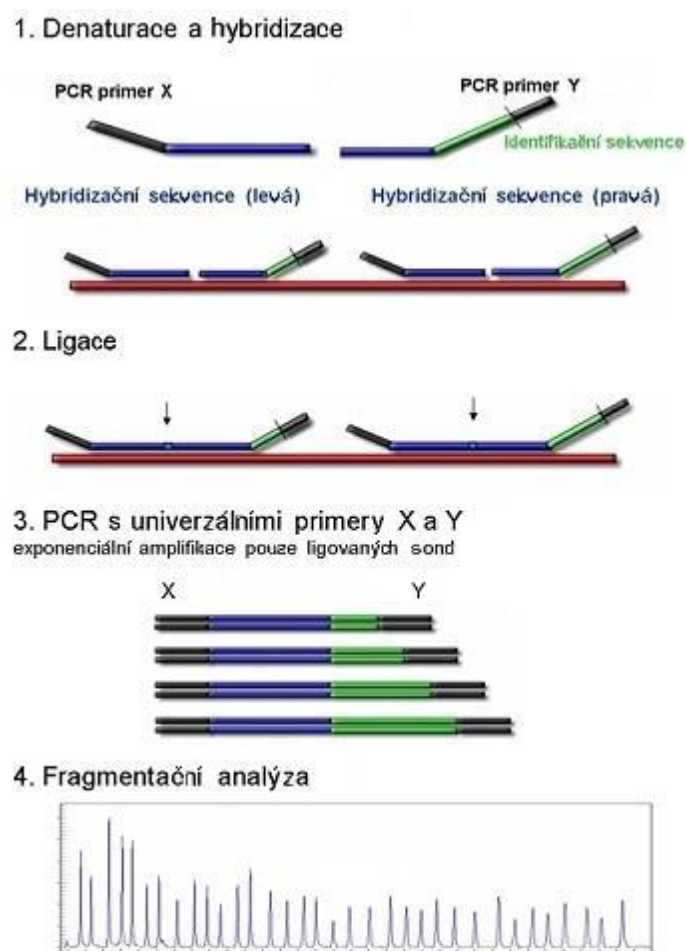
Princip MLPA metody je založen na amplifikaci až 60 sond, z nichž každá detekuje specifickou DNA sekvenci. DNA vzorek musí obsahovat minimálně 20 ng lidské DNA (3000 buněk). Jedná se tedy o semikvantitativní metodu využívanou k vyšetření DNA o délce přibližně 60 nukleotidů během jedné reakce založené na multiplex PCR.^(5, 6)

MLPA reakce je jedinečná tím, že nejsou amplifikovány cílové sekvence, ale MLPA sondy, které se na tyto cílové sekvence hybridizují. Na rozdíl od PCR reakce je při reakci použit jen jeden pár PCR primerů. Celá MLPA reakce může být rozdělena do pěti kroků:^(7, 5)

- (1) **Denaturace DNA a hybridizace MLPA sond.** Během tohoto kroku je DNA denaturována a přes noc inkubována s mixem MLPA sond. MLPA sondy obsahují dva odlišné oligonukleotidy, přičemž každý obsahuje jeden PCR primer. Obě tyto sondy hybridizují na sousedící sekvence.
- (2) **Ligace,** která proběhne jen tehdy, pokud při předchozí hybridizaci specifické sondy nasedly na přilehlé cílové sekvence a mohly tak být následně spojeny do jedné sekvence.

- (3) **PCR reakce**, při které jsou všechny ligované sondy amplifikovány pomocí stejného páru primerů (jeden z primerů je fluorescenčně značen).
- (4) **Separace a vizualizace** amplifikovaných produktů pomocí kapilární elektroforézy.
- (5) **Analýza dat.**

Postupné kroky jsou zobrazeny na Obr. 1.



Obr. 1: Principy metody MLPA⁽¹⁴⁾

V průběhu MLPA reakce jsou amplifikovány a kvantifikovány sondy. Tyto sondy nasedají na specifickou DNA sekvenci a jsou tvořeny dvěma oligonukleotidy. Levá část této sondy je kratší a chemicky syntetizována, kromě toho obsahuje na 5'-konci primer-specifickou sekvenci (X) a na 3'-konci cílově specifickou sekvenci. Pravá část je delší, odvozena z M13 fága a skládá se z: na 5'-konci cílově-specifické a na 3'-konci primer-

specifické sekvence. Vložené identifikační sekvence mají různé délky, podle kterých je možné odlišit jednotlivé produkty. Grafické znázornění sondy je zobrazeno na Obr. 2. Po hybridizaci obou sond ke komplementární sekvenci cílového místa, jsou obě sondy ligovány termostabilní ligázou. Pouze takto kompletní sondy jsou na základě jediného společného páru primerů X a Y amplifikovány, kdy produkty PCR reakce jsou dlouhé 130-480 bp. Následnou kapilární elektroforézou jsou amplikony rozděleny. Nakonec jsou relativní velikosti píků elektroforetogramu porovnány s referenčním vzorkem a tím se ukáží aberantní počty kopií. ^(8, 34)

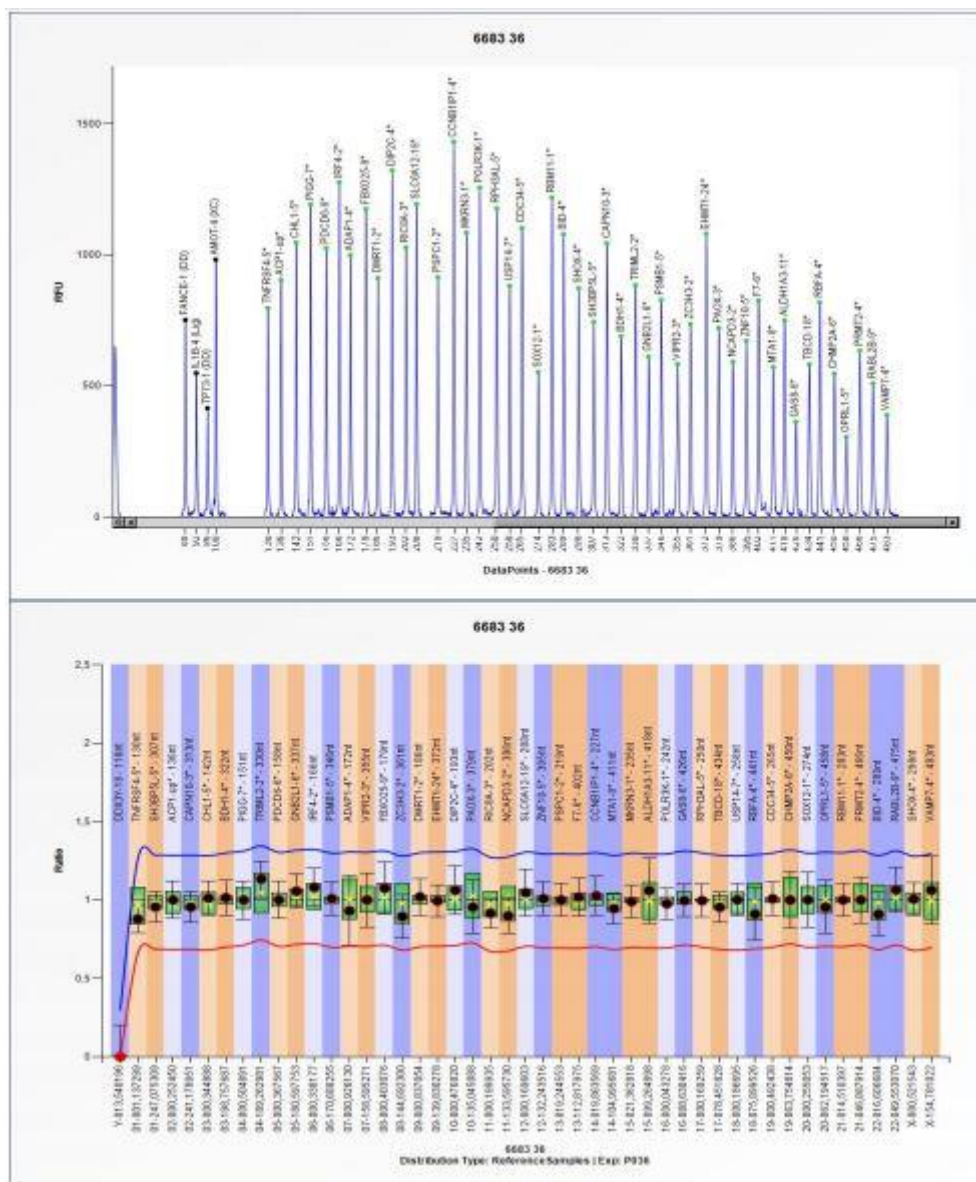


Obr. 2: Grafické znázornění sondy. ⁽³⁹⁾

2.1.1. Analýza dat

K analýze dat pro jejich následnou interpretaci je možné využít řadu softwarů, ale ty jsou v řadě případů zpoplatněné. Software Coffalyser.Net je pro analýzu dat firmou MRC-Holland doporučován a je volně přístupný.

Coffalyser.Net konečné výsledky přeloží do snadno pochopitelného grafického vyobrazení, které umožňuje spolehlivou a inteligentní interpretaci výsledků. Na Obr. 3 je pro představu vyobrazeno jedno grafické vyhodnocení výsledků. ⁽³²⁾



Obr. 3: Grafická interpretace výsledků vygenerovaná softwarom Coffalyser.⁽³¹⁾

Tento software je kompatibilní se soubory binárních dat produkovaných všemi hlavními kapilárními elektroforetickými systémy např.: ABIF soubory vygenerované přístroji (Applied Biosystems), SCF (Single configuration file) a RSD soubory vytvořené MegaBace™ systémem (Amersham) atd. Coffalyser vyvinutý MRC-Holland je schopen importovat data z jiných analyzačních softwarů jako jsou např.: Genescan a Genemapper (Applied Biosystems), atd. A zároveň je schopen data importovat do všech běžně používaných formátů. (1, 32)

Během analýzy Coffalyser odhaduje reprodukovatelnost každého vzorku v daném experimentu pomocí výpočtu standardní odchylky poměru všech sond v tomto daném vzorku.⁽¹⁾

Pro vyhodnocení robustnosti normalizačního faktoru algoritmus vypočítává rozdíl mezi poměry referenčních sond v každém vzorku. Normalizací využívanou referenčními sondami při každém testu se vytvoří DQ koeficienty a medián těchto koeficientů je využit jako definitivní poměr.⁽¹⁾

2.1.2. Interpretace výsledků

MRC-Holland má ve své databázi více jak 300 SALSA MLPA kitů. Interpretace výsledků má jasná pravidla, zahrnující intra-vzorkovou a inter-vzorkovou normalizaci dat. Vlastní interpretaci výsledků ovlivňuje mnoho faktorů, např.: kvalita vzorků, polymorfismus/mutace v cílové sondě, kvalita a parametry kapilární elektroforézy a rovněž metoda užívaná pro analýzu dat. Ovšem ne všechny nalezené delece či duplikace jsou patogenní, proto je při interpretaci výsledků nutná znalost testované oblasti, resp. genu.⁽⁹⁾

MRC-Holland doporučují během experimentu: (1) použití alespoň tří referenčních vzorků, které by měly být získány stejným způsobem a měly by také mít podobnou koncentraci jako analyzovaný vzorek; (2) zařazení pozitivních kontrolních vzorků, tzn. vzorků se známou delecí, duplikací či bodovou mutací; (3) užití negativních vzorků bez DNA. MLPA kity MRC-Holland obsahují kontrolních fragmenty (Q, D,...) k posouzení průběhu experimentu. Např. vysoký Q-fragment (viz metodika práce), identifikuje použití příliš nízké koncentrace DNA.⁽⁹⁾

Kromě kontrolních fragmentů tyto kity dále obsahují referenční sondy, cílené do oblastí s předpokládaným normálním počtem kopií. I u zdravého člověka je u desítek sekvencí očekávatelná neobvyklá odchylka v počtu kopií. Jejich délka se může pohybovat od 100 po 100,000 nukleotidů. Proto se při výběru této referenční sondy snažíme vyhnout chromosomálním sekvencím, které jsou těmito změnami v počtu kopií známé. K tomu nám pomáhá databáze genomových variací: <http://project.tcag.ca/variation/>. Bohužel vzhledem k špatné dostupnosti dat od některých etnických skupin je tato databáze stále nekompletní.⁽⁹⁾

2.1.3. Využití metody MLPA

MLPA, je využívána pro detekci nebalancovaných změn genomu a tím pádem pomáhá odhalovat řadu dědičných onemocnění. Mezi takováto onemocnění patří např.: DMD (Duchenneova muskulární dystrofie) či SMA (spinální muskulární atrofie).

MRC-Holland nabízí přes 300 různých SALSA MLPA kitů a na základě celosvětového výzkumu jsou vyvíjeny další. Kity jsou použitelné při detekci mutací, jak bylo zmiňováno v předchozích kapitolách. Např. v tabulce č. I je uvedeno několik těchto kitů pro detekci malých přestaveb. Dále MRC-Holland nabízí kity pro: (1) detekci velkých chromosomálních přestaveb (Tab. II), (2) detekci změn počtu kopií subtelomerických oblastí; (3) detekci změn počtu kopií celých chromosomů a to u chromosomů 13, 18, 21, X, Y. Tato reakce lze provést i z plodové vody; (4) pro diagnostiku nádorů např. změny počtu kopií u ALL, CLL, neuroblastomů, melanomů, oligodendrogliomů atd.; (5) methylační kvantifikace: Prader-Willi/Angelman, Beckwith Wiedemann, MGMT, MLH1, fragilní X a inaktivace tumor supresorových genů; (6) mRNA analýzy pro geny účastnících se apoptózy a zánětu.⁽⁹⁾

Tab. I: Geny, jejichž mutace je způsobena malými přestavbami.

Typ mutace	Zkratka onemocnění/genu	Název
Malé přestavby	BRCA1, BRCA2	Breast cancer
	MSH2	Hematopoietic Src homology 2 domain
	MLH1	MutL homolog 1
	DMD	Duchenne muscular dystrophy
	APC	Adenomatous polyposis coli
	SMA	Spinal Muscular Atrophy
	NF1	Neurofibromatosis type 1
	NF2	Neurofibromatosis type 2
	VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor
	TSC1/2	Tuberous Sclerosis Protein 1/2

MECP2	Methyl CpG binding protein 2
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
LDLR	Low Density Lipoprotein receptor
FBN1	Fibrillin-1
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DPYD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
COL5A1	Collagen alpha-1(V) chain
CACNA1A	Calcium Channel
PKHD1	Polycystic kidney and hepatic disease 1
BRIP1	Fanconi anemia group J protein
SLC26A4	Solute Carrier Family 26 (Anion Exchanger), Member 4
LMNB1	Lamin B1
PRSS1	Protease serine 1
FRMD7	FERM domain containing 7
TPMT	Thiopurine S-methyltransferase
FLCN	Birt-Hogg-Dube syndrome
DNAI1	Primary ciliary dyskinesia (PCD)
EP300	Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS)
UBE3A	Angelman syndrome
PCCA	Propionic acidemia
PCDH15	Usher syndrome

Tab.II: Velké chromosomální přestavby.

Typ mutace	Zkratka onemocnění	Název
Velké chromosomální přestavby	WS	Williams syndrom
	PWS	PraderWilly/Angelman syndrom
	-----	syndrom DiGeorge
	-----	Cri du Chat
	-----	PelizaeusMerzbacher
	CMT1	Charcot-Maria-Tooth disease
	HNPP	Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy

MLPA je v prenatalní diagnostice schopna odhalit aneuploidie, běžné mikrolece, subtelomerické změny v počtu kopií, také dokáže identifikovat chromosomy a familiární změny počtu kopií v jednotlivých genech. Využití MLPA techniky v prenatalní diagnostice podrobně ve svém článku popisuje Wills *et.al* (2012), kde se zaměřuje na detekci aneuploidie, běžných mikrolečných syndromů, chromosomálního mosaicismu, subtelomerických změn, opakujících se delecí/duplikací atd. ⁽¹⁰⁾

V posledních letech je MLPA úspěšně používána pro diagnostiku a výzkum rakoviny. Referenční sondy u výzkumu a diagnostiky rakoviny by měly být zaměřeny na chromosomální oblasti, ve kterých se změna počtu kopií neočekává. A naopak onkogeny a tumor supresorové geny by neměly být jako referenční sonda užívány, protože je u nich daleko pravděpodobnější, že u nich bude nalezena změna počtu kopií. A například difúzní gliomy jsou známy svou vysokou schopností se infiltrovat do přilehlé mozkové tkáně. Tento typ nádoru patří mezi nejvíce ničující typ rakoviny se špatnou prognózou a terapeutickou možností. A v posledních letech se ukázalo, že MLPA metoda je docela účinná diagnostická metoda tohoto druhu rakoviny. Dále je MLPA jako úspěšná diagnostická metoda využívána pro prokázání ALL nebo neuroblastomů. ⁽¹¹⁾

MLPA metoda je také široce využívána v diagnostice vrozených onemocnění. Mezi takováto onemocnění patří např. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), Becker Muscular Dystrophy (BMD) a další. Co se zrovna těchto dvou na X-chromosom vázaných onemocnění týká, tak s DMD se narodí 1 z 3 500 narozených chlapců a s BMD 1 z 18 000 narozených chlapců. V 65% u DMD a 85% u BMD jsou tato onemocnění způsobena velkými delecemi genu DMD, zatímco duplikace je způsobeno 5-10% případů a bodovými mutacemi 25-30% případů. MLPA metoda nám v tomto případě umožňuje analyzovat všechny exony DMD, což je velmi důležité pro terapii daného pacienta.⁽⁴⁾

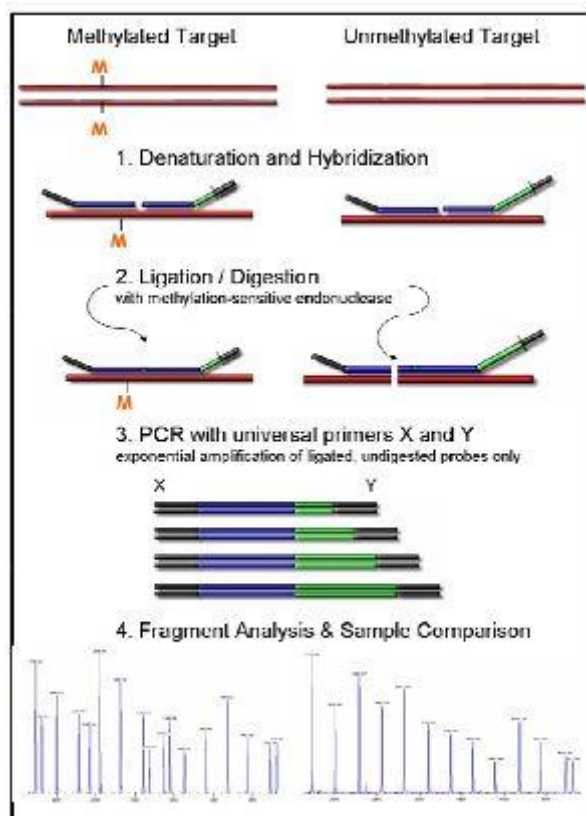
2.2. Variace metody MLPA

2.2.1. MS-MLPA – Methylačně specifická mnohonásobná amplifikace závislá na ligaci sond

MS-MLPA je využívána k profilování methylace. Jedná se o druh MLPA metody, ale tentokrát je detekce počtu kopií kombinována s užitím methylačně senzitivních restričních enzymů. V současné době je tento druh MLPA široce využíván k detekci epigenetických alterací. Jedním z hlavních využití je určení poruch způsobených genovým imprintingem, mezi které patří Prader Willi/Angelman a Beckwith Wiedemann/RSS syndromy (Russell-Silver syndrome). Dále je MS-MLPA hojně využívána k analýze nádorů, kde jsou konkrétně zkoumány transkripčně inaktivované tumor supresorové geny, jež mohou vést k progresi nádoru nebo k odolnosti vůči chemoterapeutickým látkám. Díky schopnosti detekovat aberace methylačních vzorů může být využívána i k lepší typizaci nádoru.^(12,13)

Principiálně je tato metoda podobná standardní MLPA s výjimkou toho, že MS-MLPA generuje dva vzorky. Jeden neštěpený vzorek pro detekci počtu kopií a druhý štěpený vzorek pro methylační detekci. Celá reakce MS-MLPA metody může být rozdělena do pěti kroků:

(1) DNA denaturace a hybridizace MLPA sond; (2) ligace a digesce; (3) PCR; (4) separace amplifikovaného produktu pomocí kapilární elektroforézy; (5) analýza dat.⁽¹²⁾ Jednotlivé kroky MS-MLPA reakce jsou vyobrazeny na Obr. 4.



Obr. 4: Jednotlivé kroky MS-MLPA reakce.⁽¹⁴⁾

Sondy používané pro MS-MLPA jsou podobné sondám standardní MLPA, ale oproti nim jejich cílové sekvence obsahují restrikční místa citlivá na restrikční endonukleázy HhaI. Po hybridizaci je MS-MLPA reakce rozdělena do dvou zkumavek, v jedné probíhá klasická MLPA a druhá je inkubována s přidanou HhaI endonukleázou. Zatímco hybridizované sondy jsou ligovány, HhaI enzym rozštěpí hybridizované sondy a nemethylované vzorky DNA. Během PCR se budou amplifikovat pouze methylované vzorky DNA, které jsou chráněny proti HhaI restrikčnímu enzymu a tyto vzorky také budou při následné elektroforéze produkovat signál a vytvářet píky.⁽¹³⁾

Problémy, které by mohly ovlivnit výsledky, jsou signalizovány pomocí kontrolních fragmentů (92 nt benchmark sonda, Q-fragmenty, D-fragmenty, X&Y fragmenty), které jsou součástí MS-MLPA sondy. Q a D-fragmenty jsou stejné jako u obyčejné MLPA reakce (viz praktická část). Dalšími kontrolními kroky jsou: (1) použití reakce neobsahující DNA, u které jako jediné jsou viditelné Q-fragmenty; (2) odstranění případného odpařování během reakčního postupu.⁽¹²⁾

K analýze dat je MRC-Holland doporučován software Coffalyser.net, který sami navrhli. Analyzována mohou být pouze data, která prošla v protokolu MS-MLPA doporučenými kontrolními kroky. MS-MLPA se skládá ze dvou kroků: (1) stanovení počtu kopií; (2) určení methylačního profilu nebo-li kvantifikace procenta methylace v daném vzorku.⁽¹²⁾

2.2.2. RT-MLPA – Reverse Transcriptase MLPA

Tento typ MLPA je užíván pro profilaci mRNA. Změny v expresi genu hrají důležitou roli v buněčném vývoji, diferenciaci a patologických procesech. V současné době jsou k dispozici SALSA RT-MLPA kity pro detekci mRNA různých apoptických a zánětlivých genů. RT-MLPA začíná reverzní transkripcí pro přepis RNA do cDNA, protože MLPA ligáza nemůže spojit DNA s oligonukleotidy sondy, pokud je cílová sekvence tvořena RNA. Po této reverzní transkripci RT-MLPA pokračuje jako standardní MLPA. RT-MLPA sondy, pokud je to jen trochu možné, jsou navrhovány tak aby do cílové sekvence byly zahrnuty hranice exonů. Tímto krokem se zabraňuje generování signálu ze sond navázaných na kontaminující DNA, která je ve vzorcích RNA často přítomna.^(14, 8)

2.3. Další metody využívané v genetické diagnostice

2.3.1. PCR

PCR byla do molekulární biologie zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Její nespornou výhodou je schopnost získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předešlého klonování ve vektorech. MLPA metoda je vlastně jednou z mnoha modifikací PCR.⁽¹⁵⁾

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která představuje základní molekulární proces všech živých organismů a její podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Vybraný úsek nukleotidové sekvence je ohraničen připojením dvou primerů vázající se na protilehlé řetězce DNA, přičemž jejich 3' konce směřují proti sobě. Syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích pak probíhá po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů protisměrně. K tomuto kroku se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, jako je např. *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*. Tyto organismy odolávají denaturačním teplotám a tím umožňují cyklické opakování syntézy.⁽¹⁵⁾

Během PCR reakce se v závislosti na teplotě střídají tři kroky, provádějící odlišné děje s různými nároky na teplotu: (1) denaturace dvouřetězcových molekul DNA a to při 94°C; (2) připojení primerů k odděleným řetězcům DNA při 30-65°C; (3) syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy a to při 65-75°C. ⁽¹⁵⁾

PCR reakce probíhá v termocycleru, který nám požadované teploty mění automaticky podle nastaveného programu. Opakováním PCR reakce se náš vybraný úsek exponenciálně množí a vytváří se tak až miliardy jeho kopií. ⁽¹⁵⁾

2.3.2. FISH

Tato metoda umožňuje detekovat přítomnost specifických sekvencí nukleových kyselin v cytologických preparátech chromosomů, buněk nebo řezech tkání a zároveň s vysokou přesností určit jejich prostorovou lokalizaci. Je například používána pro detekci DNA na polytémních chromosomech hmyzu nebo metafázních chromosomech savců a rostlin a dále také pro detekci specifických molekul RNA uvnitř buněk a tkání. ⁽¹⁵⁾

Původní radioaktivní značení sond v dnešní době vystřídalo fluorescenční a to buď fluorescenčně značenou protilátkou, nebo jsou sondy značeny přímo fluorescenčně značenými nukleotidy. Vizualizace se provádí pomocí fluorescenční mikroskopie, přičemž použitím sekvenčně specifických sond různě barevně odlišených můžeme v jednom chromosomu identifikovat polohy několika genů současně. ⁽¹⁵⁾

2.3.3. Real time PCR

Real time PCR nebo-li, polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Tento typ PCR pracuje na stejném principu jako klasická PCR, ale na rozdíl od ní umožňuje kvantifikaci námi sledovaného úseku DNA, přičemž je množství produktu PCR měřeno v každém cyklu PCR.

Určení množství molekul nukleových kyselin je důležité při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů. Kvantifikace amplikonu se provádí pomocí detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení. To kromě cyklického střídání teplot umí i detekovat fluorescenci a monitorovat postup PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat produkty PCR elektroforeticky. ⁽¹⁵⁾

Specifické molekuly fluorochromů (např. SYBR Green, Fluoreascein, Rhodamine, LC640, atd.) se používají pro označení primerů a hybridizačních sond.⁽¹⁵⁾

2.3.4. Array CGH

Tato metoda je určena k detekci delecí a duplikací v testovaném genomu. Je možno ji charakterizovat jako CGH využívající místo metafázních chromosomů krátké fragmenty DNA uchycené na sklíčko. Rozlišení daného typu mikročipu se odvíjí od velikosti fragmentů, která může nabývat hodnot od desítek bazí až po kilobaze, a rozložení uchycených fragmentů.⁽¹⁷⁾

Postup této metody funguje na stejném principu jako klasická CGH. DNA zkoumaného a referenčního vzorku je izolována z buněk pacienta a zdravého jedince. Následně se pomocí barevně odlišných fluorochromů označí. Takto označená DNA je v ekvimolárním poměru smíchána a hybridizována na oligonukleotidové fragmenty uchycené na čipu. Po tomto kroku nastává odmytí nenačkaných sond a snímání pomocí speciálního scanneru. Následně specificky navržený software automaticky identifikuje každý spot na čipu a stanoví poměr obou fluorochromů. Dalším krokem je pak přiřazení každého spotu ke konkrétní pozici v genomu což nám umožní zviditelnění změn na chromosomech.⁽¹⁷⁾

2.4. Studované nemoci

2.4.1. BRCA1 a BRCA2 – geny pro dědičnou variantu rakoviny prsu a/nebo vaječníků

Mutace genů BRCA1 a BRCA2 způsobují onemocnění nazývané jako syndrom hereditárního nádoru prsu a/nebo vaječniku. V případě tohoto dědičného onemocnění se jedná o autozomálně dominantní onemocnění s vysokou penetrancí.⁽¹⁸⁾

Povědomí o existenci genů, které u žen predisponují rakovinou prsu a ovaria, se začalo na svět dostávat až na počátku 80. let 20. století. Přes všechny překážky jako je složitost analýzy rodokmenů, která byla díky věkové rozmanitosti komplikovaná, dále také neúplná penetrace a také vazba na pohlaví, byl v roce 1990 jeden z těchto genů (BRCA1) lokalizován na chromosomu 17, následně byla lokalizace zpřesněna na střed dlouhého ramene chromosomu 17 a to konkrétně na 17q21-q24. Umístění genu BRCA2 na chromosomu 13 a to konkrétně na 13q12-q13 bylo určeno v roce 1994 a samotný gen byl lokalizován v roce 1995^(19, 18)

Jak gen BRCA1 tak i BRCA2 jsou tumor supresorové geny a tím, že regulují buněčné dělení, stabilitu a integritu genomu, hrají významnou roli v maligním procesu. Predispozice k malignímu zvratu buňky, způsobená mutací v těchto genech je vysvětlována tím, že se oba tyto geny podílejí na lokální remodelaci chromatinu a regulaci transkripce.² To znamená, že pokud je na jedné alele dědičná zárodečná mutace a na druhé náhodně dojde ke vzniku somatické mutace, tak dochází k hromadění dalších mutačních změn a k nekontrolovatelnému dělení buňky. A vzhledem k tomu, že ke vzniku somatických mutací dochází v průběhu našeho života zcela běžně, je u lidí, kteří jsou nosiči patogenní mutace v genech BRCA1 a BRCA2, riziko vzniku nádorového onemocnění po celý život vysoké. Kumulativní riziko vzniku nádoru prsu u BRCA1 je 65-85% přičemž běžné riziko je 6-7%, u druhostranného nádoru prsu je riziko 40-60% a u nádoru ovaria je 39-63%, zde je však běžné riziko pouhá 3%. Kromě toho se u tohoto typu mutace zvyšuje i riziko dalších nádorů a to: nádoru prsu 3-4 násobně, nádoru pankreatu 2-3 násobně, nádoru žaludku 2-4 násobně, nádoru děložního čípku 3-4 násobně a nádoru prostaty 2-3 násobně. Kumulativní riziko u genu BRCA2, že vznikne maligní nádor prsu je 45-84%, oboustranný nádor prsu je ~ 55%, nádor ovaria je 11-27%. Mimo jiné u tohoto genu je riziko vzniku i (1) nádoru prsu u mužů a to ~ 7%, tato pravděpodobnost představuje 80násobek populačního rizika; (2) nádoru žlučníku ~ 5násobek; (3) nádoru prostaty ~ 2,5násobek; (4) maligního melanomu ~ 2,5násobek. Objevem těchto mutací bylo umožněno vylepšení testů DNA, které mohou u žen tento gen diagnostikovat a tak jim pomoci s bojem s touto smrtelnou nemocí.^(19, 18)

Zárodečné defekty v BRCA1 genu jsou nejčastější příčinou dědičné predispozice k rakovině prsu. Dědičná rakovina prsu je charakteristické určitými vlastnostmi: mladší věk v době stanovení diagnózy, časté bilaterální onemocnění a častý výskyt choroby u mužské populace dané rodiny.⁽³⁵⁾

Mutace genů BRCA1 a BRCA2 tvoří asi 20 až 25% z dědičných karcinomů prsu, asi 5 až 10% ze všech rakovin prsu a přibližně 15% z rakoviny vaječníku.⁽³⁴⁾

MLPA je metoda, umožňující kvantitativní analýzu všech BRCA1 exonů v rámci jedné reakce. Delece a inserce jednoho nebo více exonů jsou vyhodnoceny změnou výšky píku, která odpovídá síle amplifikace produktu. Screening BRCA1 mutací u rodin s rakovinou prsu nebo prsu a ovaria je díky specifickým metodám stále více komplexní a tím pádem i více užitečný pro odhalení pacientů nesoucích tuto hlavní genomickou delecii.⁽²¹⁾

² Transkripce nebo-li přepis sekvence DNA do sekvence RNA.

Geny BRCA1 a BRCA2 představují vysokou predispozici pro rakovinu prsu a/nebo ovaria. Studie založené na analýze těchto genů říkají, že BRCA1 je hlavní gen zodpovědný za dědičnou rakovinu prsu nebo ovaria, pokud je v rodinné anamnéze alespoň jeden pacient s tímto typem rakoviny. Nicméně molekulární typizace BRCA1 bodových mutací u takových to rodin nebyla úspěšná. Pravděpodobně je to způsobeno složitostí spektra mutací BRCA1 genu. V posledních letech byly hlášeny velké genomické delece a duplikace zahrnující jeden nebo více exonů BRCA1 genu. Tyto delece a duplikace jsou způsobeny přestavbou mezi Alu repeticemi, které jsou časté zvláště v BRCA1 lokusu. Navíc se ukázalo, že duplikace v oblasti 5'konci BRCA1 genu a přítomnost BRCA1 pseudogenu představují další zdroj nelegitimní rekombinace. Podíl genomických přestaveb u všech mutací BRCA1 genu u rakoviny prsu a ovaria se zdá být různě populačně závislý, a to od 15%, jak je tomu u americké populace po 36% jak je tomu v případě holandské populace.⁽²¹⁾

Montagana *et.al* (2003) v tomto případě využil MLPA pro odhalení mutace BRCA1 a BRCA2 u severoitalských rodin. Zjistil, že mezi 37 vybranými rodinami s dědičnou rakovinou prsu a ovaria (HBOC) mají všichni vysokou pravděpodobnost k mutaci genu BRCA1 a u 15 z nich bylo již dříve prokázáno, že jsou nositeli buď BRCA2 (5 rodin) nebo BRCA1 (10 rodin) a to i včetně genomové přestavby. Pomocí MLPA analýzy se u zbylých 22 rodin podařilo identifikovat dalších 5 genomových přestaveb. Také zjistily, že ztráta konstitutivní heterozygotnosti polymorfních markerů ve vazebné nerovnováze předpovídá tyto změny BRCA1 genu. Na základě tohoto pozorování také zjistili, že až jednu třetinu mutací tvoří velké delece genu BRCA1.⁽²¹⁾

Masarykův onkologický ústav v Brně u rizikových pacientek prováděl analýzu kompletní kódující sekvence a míst sestřihu tohoto genu. Z jejich výsledků vyplývá, že standardním screeningem bývá zachycena patogenní mutace zhruba u 35 % vysoce rizikových rodin s dědičným výskytem nádoru prsu a/nebo ovaria. Obtížně klasifikovatelné vzácné varianty neznámého významu se nacházejí zhruba u 10 % rodin. U těchto variant nemůžeme jednoznačně prokázat nebo vyloučit přímou souvislost s výskytem nádorového onemocnění. V těchto případech se většinou jedná o nukleotidové substituce v intronech nebo substituce v kódující sekvenci vedoucí k záměně aminokyseliny v polypeptidovém řetězci. Mezi varianty neznámého významu také řadíme drobné delece/inzerce. Ty buď čtecí rámec nenarušují, nebo jsou lokalizovány na C-terminálním konci proteinu a není jasný jejich důsledek na funkci proteinu.⁽²⁰⁾

2.4.2. Mikrodeleční syndromy

Mikrodeleční syndrom patří mezi nejčastější a klinicky nejzávažnější submikroskopické aberace. Je způsoben intersticiálními mikrodelecemi či duplikacemi různých chromosomů, vznikajících zejména následkem nereciprokého crossing-overu při meiotickém dělení a to konkrétně v bivalentu při výměně různě dlouhých chromosomových segmentů. Na tyto drobné léze lze přijít při vyšetření prometafázických chromosomů, které byly získané pomocí FISH. ^(2, 22)

Mikrodeleční syndromy také označujeme jako syndromy sousedících nebo-li na sebe navazujících genů a vzhledem k tomu, že tyto geny mohou mít dosti odlišné funkce, tak se vytváří variabilní spektrum symptomů. Mikrodelece většího počtu genů, které leží v chybějícím segmentu, se uplatňují při fenotypovém vyjádření těchto chromosomových změn. Vzhledem k tomu, že tyto geny mohou mít značně odlišné funkce, tak se vytváří spektrum symptomů v různých lokalizacích. ^(2, 22)

Mikrodelece může například způsobit mentální retardaci, ale stejný klinický obraz může v některých případech být způsoben bodovými mutacemi příslušných genů a to, aniž bychom prokázali delecí jako je tomu např. v 90% u Rubstein-Taybiho syndromu. Dalším příkladem je Prader-Willi/Angelmann syndrom, který je způsoben mechanismem genomového imprintingu v souvislosti s uniparentální disomií. ⁽²²⁾

Rachel Sayuri Honjo *et.al* (2014) provedl studii, kdy bylo genetickým oddělením sledováno 55 pacientů trpících Williams-Beuren Syndrome (WBS). Všichni tito pacienti byly krom jiných diagnostických metod např. FISH vyšetřeny i metodou MLPA. Kit použitý pro detekci oblasti 7q11.23 odhalil WBS i u dvou pacientů s charakteristickými příznaky, ale s negativním výsledkem z vyšetření FISH. Charakteristika těchto 55 pacientů (34 mužů, 21 žen) byla následující: WBS facie 98,2% pacientů, neuropsychomotorické onemocnění 98,2% pacientů, hypersociální chování 94,5% pacientů, hyperacusis 94,5% pacientů a vrozené srdeční vady 81,8% pacientů. ⁽²³⁾

Khouzani *et.al* (2014) použil MLPA ve své studii, ve které se zabýval vyšetřováním mikrodelečních syndromů u Íránských pacientů. U těchto pacientů bylo prokázáno syndromové mentální postižení. ID může být způsobeno řadou genetických faktorů (chromosomální abnormality, změny v počtu kopií, a defekty jednotlivých genů). Této studii se zúčastnilo 100 osob, které byly klinicky vyšetřovány poprvé a řada z nich měla i normální

karyotyp. Khouzani *et.al* (2014) vyšetřovali pomocí MLPA kitu duplikace a delece pro 21 odlišných mikrolečnicích syndromů. Aberace byli schopni identifikovat u 12 (12%) klinicky vyšetřených pacientů a to následující: 5 Williams syndrom, 3 Miller- Dieker syndrom, 1 Sotos syndrom, 1 Angelman syndrom, 1 Di-George syndrom a jeden pacient měl abnormalitu v chromosomální oblasti 4p.⁽²⁴⁾

2.4.3. Subtelomerické delece

Jsou to aberace v subtelomerické oblasti různých chromosomů. Nejčastěji jsou nacházeny na chromosomech 1,2,5,6,8,9,12,16, 18p a 22q. Nejběžnějšími případy těchto aberací, jsou delece, ale translokace a duplikace nejsou taky nijak vzácné. U téměř 50% pacientů je tato přestavba nalezena i u jednoho z rodičů, protože právě tyto delece a duplikace jsou důsledkem balancované translokace.⁽²⁵⁾

2.4.3.1. Mentální retardace (MR)

Subtelomerické přestavby chromosomů v subtelomerických oblastech jsou zodpovědné za 5-10% neobjasněných případů mentální retardace. MR je heterogenní dysfunkce centrálního nervového systému vykazující navenek pozorovatelné znaky, nebo je také definována jako neschopnost lidí dostatečně se vyvinout na kognitivní a adaptivní úrovni. Z celkové populace postihuje 2-3% lidí. Většina mentálně retardovaných má IQ mezi 50 až 70 a jen okolo 0,4% má IQ nižší než 50.^(27, 2, 26)

Mentální retardaci lze podle hodnoty IQ rozdělit do 4 stupňů: (1) lehká (MR): v tomto případě má člověk omezenou vzdělatelnost a je mu doporučeno navštěvovat zvláštní školu. IQ se v tomto stupni MR pohybuje mezi 50-70.;(2) středně těžká MR (imbecilita): IQ pohybuje mezi 35-50 a dotyčná osoba má velmi omezenou vzdělatelnost a není schopna složitější komunikace a sebeobsluhy;(3) těžká MR (idiocie): člověk s tímto typem mentální retardace má IQ mezi 25-35.;(4) hluboká MR: tyto osoby mají IQ mezi 20-25 a nejsou schopny žít mimo kontrolované prostředí a vyžadují neustálou asistenci.⁽²⁾

Neetha *et.al* (2013) se ve své studii zahrnující 122 dětí s MR snažil identifikovat mikroskopické a submikroskopické chromosomální přestavby pomocí konvenční cytogenetiky a metody MLPA s využitím kitů od MRC Holland. Automatizovanými karyotypovými systémy nebyly v tomto testu u žádného pacienta nalezeny chromosomální abnormality, zato pomocí MLPA techniky jich bylo označeno 11 (9%).⁽²⁶⁾

3. Praktická část

3.1. Příprava vzorku

Pro MLPA reakci použijeme 50 až 250 ng lidské DNA v objemu 5 μ l pro každou MLPA reakci. Ideálně by to mělo být 50-100 ng lidské DNA. Vzorek DNA rozpustíme v 10 mM Trish-HCl (pH 8,2) + 0,1 mM EDTA. Tento pufr zabraňuje depurinaci během počáteční denaturace prováděné při 98 °C.⁽⁵⁾

Pokud máme pochybnosti o kvalitě DNA, tak (1) použijeme 50 ng lidské DNA; (2) využijeme dvou-zkumavkového PCR protokolu.⁽⁵⁾

Vzhledem k tomu, že MLPA je na nečistoty citlivá daleko více než ostatní metody, tak bychom se měli ujistit, že zkoumaný vzorek (1) pochází ze stejné tkáně a zároveň byl získán stejným extrakčním způsobem jako vzorek referenční; (2) má s referenčním vzorkem stejnou koncentraci DNA; (3) byl připravován stejným způsobem jako referenční vzorek.⁽⁵⁾

Koncentrace EDTA nesmí ve vzorcích přesáhnout 1,5 mM. To je důvod proč by koncentrace DNA neměla být zvyšována odpařováním, protože to vede k velmi vysoké koncentraci EDTA.⁽⁵⁾

Pro MLPA reakci by neměla být použita heparinizovaná krev. Heparin je totiž velmi obtížné odstranit a tak by mohl narušit MLPA PCR reakci.⁽⁵⁾

Pro izolaci DNA by neměl být použit systémy: Qiagen M6, M48 a M96, protože obsahují vysokou koncentraci soli. A u Qiagen EZ1 použijte dodatkový protokol pro použití Third Wave Invarder testů.⁽⁵⁾

Pro MLPA reakci není vhodné používat DNA z celogenomové amplifikační reakce (WGA). Její amplifikace je totiž zkreslená.⁽⁵⁾

3.2. Výběr referenčních vzorků

Každá MLPA reakce by měla obsahovat referenční vzorky, jejichž sekvence by měly mít normální počet kopií a jsou získané od zdravých jedinců. Tyto vzorky by se měly co nejvíce podobat testovaným vzorkům a to v: (1) metodě extrakce; (2) typu tkáně; (3) koncentraci DNA; (4) přípravě. Ale pokud se jedná o tkáně fixované formalínem a zalité v parafínu, tak by referenční vzorky měly být získány z alespoň podobně upravených tkání.⁽⁵⁾

V MLPA reakci by měla být přítomna i kontrola bez DNA. Takovou kontrolu připravíme tak, že 5 μ l DNA nahradíme pufrům TE.⁽⁵⁾

3.3. Pracovní postup MLPA reakce⁽⁵⁾

(1) Denaturace:

- a. Zkumavky s 5 μ l naředěné DNA vložíme do termocykleru na 98 °C po dobu 5 min. Následuje ochlazení vzorku na 25 °C

(2) Hybridizace:

- a. Pro každou reakci si připravíme master mixy, které obsahují 1,5 μ l směsi sond a 1,5 μ l MLPA pufru. Vše důkladně pomocí pipety promícháme.
- b. Dalším krokem po přidání master mixu je inkubace po dobu 1 min při teplotě 95 °C a následné ochlazení na 60 °C. Tuto teplotu udržujeme 16-20 hodin.

(3) Ligace:

- a. Po 16-20 hodinách (druhý den) připravíme master mix s ligázou-65 a to následovně: pro každou reakci smícháme 25 μ l dH₂O, 3 μ l ligázového pufru A, 3 μ l ligázového pufru B a 1 μ l enzymu ligázy 65. Vše samozřejmě opět důkladně pipetou promícháme.
- b. Tuto směs (32 μ l) přidáme přímo ke vzorkům zchlazeným na 54 °C přímo v termocykleru a vše pomocí pipety opatrně promícháme. Pokračujeme 15 min v ligačním programu při 54 °C.
- c. Po uplynulých 15 min zvýšíme teplotu na dobu 5 min na 98 °C. Toto zvýšení teploty trvající 5 min děláme kvůli tepelné inaktivaci ligázy 65.

d. Následně vzorky ochladíme na 20 °C.

(4) PCR reakce:

- a. Připravíme si PCR master mix a to pro každou reakci (7,5 µl dH₂O, 2µl SALSA PCR směsi a 0,5 µl SALSA polymerázy). Celou směs pomocí pipety opatrně promícháme a při pokojové teplotě přidáme do zkumavek.
- b. Samotná PCR reakce se skládá z 35 cyklů střídání teploty: 95 °C / 30 s, 60 °C / 30 s a 72 °C / 60 s. Celý krok je zakončen inkubací při teplotě 72 °C po dobu 20 min.
- c. Poté vzorky necháme zchladnout na 15 °C a můžeme je uložit do 4 °C. V případě potřeby je možno je uskladnit na dobu delší než týden do -25 °C / -15 °C.

Celý program termocykleru pro metodu MLPA je uveden i v tabulce č. III.

Tab.III: Program termocycleru pro MLPA reakci

1. Denaturace			
1.	98 °C	5 min	
2.	25 °C	Pauza	
2. Hybridizace			
3.	95°C	1 min	
4.	60 °C	Časový úsek (16-20h)	
3. Ligace			
5.	54 °C	Pauza	
6.	54 °C	15 min	
7.	98 °C	5 min	
8.	20 °C	Pauza	
4. PCR reakce			
9.		95 °C	30 s
		60 °C	30 s
		72 °C	60 s
	35 cyklů		
10.	72 °C	20 min	
11.	15°C	pauza	

3.4. Separace fragmentů pomocí kapilární elektroforézy

Pomocí kapilární elektroforézy získáme elektroforetogram, kdy relativní výška každého píku jednotlivých sond po srovnání s relativní výškou píku sond různých referenčních vzorků DNA odráží relativní počet kopií, který odpovídá cílové sekvenci ve vzorku. Delece je

znázorněná relativním snížením výšky píku jedné nebo více cílových sekvencí. A duplikace je znázorněna naopak relativním zvýšením.⁽⁵⁾

3.5. Kontrola MLPA reakce

Každý SALSA MLPA kit obsahuje kontrolní fragmenty, které nám usnadňují interpretaci výsledků.

3.5.1. 92 nt měřítková sonda

Jedná se o normální sondu, která tvoří měřítko umožňující porovnání s dalšími fragmenty kontroly kvality.⁽⁵⁾

3.5.2. D-fragmenty

88 a 96 nt dlouhý D-fragment detekuje sekvence v mimořádně silné CpG oblasti, které mají vysoký obsah GC a jsou tak obtížně denaturovány. V případě špatné denaturace je signál tohoto fragmentu nízký. Problém s denaturací značí signál $\leq 40\%$ 92 nt kontrolního fragmentu.^(5, 28)

3.5.3. Q fragmenty

Q-fragmenty jsou dlouhé 64, 70, 76 nebo 82 nt. Pokud nastane situace, že je v reakci přítomno příliš malé množství DNA nebo se nezdaří ligace, tak je tento Q-fragment vysoký. Nedostatečné množství DNA nám značí to, že je signál všech čtyř Q-fragmentů $\geq 33\%$ 92 nt kontrolního fragmentu.^(5, 28)

3.5.4. X a Y fragmenty

Tyto fragmenty jsou dlouhé 100 a 105 nt a používají se pro kontrolu záměny vzorku.⁽⁵⁾

3.6. Analýza dat

Pro analýzu dat jsme použily software Coffalyser.Net, který vybere nejvhodnější metody pro analýzu každého MLPA kitu a navíc nabízí rozsáhlou kontrolu kvality. Tento software je volně dostupný na mlpa.com.

3.7. SALSA MLPA probemixy

3.7.1. SALSA MLPA preobemix P002-D1 BRCA1

Pro detekci aberací v genu BRCA1 je v Nemocnici České Budějovice a.s. používán kit SALSA MLPA probemix P002-D1 BRCA1. Informace zjistitelné tímto kitem nám pomohou určit, zda se v daném případě jedná o genetickou predispozici k dědičné rakovině prsu a/nebo vaječníku (HBOC).

Pro test s tímto kitem je optimální použít DNA z periferní krve. Absolutně není doporučeno používat DNA získanou ze vzorku ošetřeného parafínem nebo formaldehydem. Dále taky není určen pro vyšetření čerstvého nádorového materiálu.⁽³⁵⁾

Výsledky delecí nebo duplikací získané pomocí tohoto kitu by měly být ověřeny pomocí kitu SALSA MLPA probemix P087 BRCA1 nebo odlišné techniky. Tento test není určen jako nástroj pro samostatné klinické rozhodnutí. Většina defektů v BRCA1 genu jsou totiž bodové mutace, z nichž většina nebude MLPA detekována. Proto je doporučeno MLPA testování zkombinovat se sekvenční analýzou.⁽³⁵⁾

Tento kit obsahuje 48 MLPA sond s amplifikačními produkty v délce mezi 130 a 469 nt. Dále obsahuje 38 sond pro oblast BRCA1 gen a 10 referenčních sond, které detekují oblast mimo tuto oblast. Dále je zde alespoň jedna sonda pro každý exon v hlavním BRCA1 transkriptu. Je zde přítomno i 8 sond pro exon 11 (3426 nt), 3 sondy pro exon 13 (často odstraněn nebo je duplicitní), 3 sondy pro exon 24, 2 sondy pro exon 16, 1 sonda pro exon 1b (první exon v přepisu varianty 1 a 5) a 2 sondy určené k detekci sekvence lokalizované 4,6 kb a 0,7 kb v protisměru od genu BRCA1. Dále samozřejmě tento kit obsahuje D a Q fragmenty pro kontrolu kvality.⁽³⁵⁾

Je očekáváno, že pomocí MLPA techniky a použitím tohoto kitu by se mělo vyhledat okolo 0,5 až 25 % všech patogenních přestaveb v BRCA1 genu. Toto očekávání je samozřejmě závislé na typu testované populace. Díky negativním vzorkům s mutací a rodinnou historií je analytická citlivost a specifčnost velmi vysoká > 99%.

Výkon tohoto kitu může být snížen několika faktory: (1) SNPs (Single nucleotide polymorphisms), nebo další polymorfismy v cílové sekvenci; (2) nečistoty v DNA vzorku; (3) neúplná DNA denaturace; (4) nedostatečné množství DNA ve vzorku atd..⁽³⁵⁾

3.7.2. SALSA MLPA P045 BRCA2/CHEK2 probemix

SALSA MLPA P045 BRCA2/CHEK2 probemix je v Laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. používán pro detekci aberací v genu BRCA2.

Gen BRCA2 nebyl doposud spojen s rakovinou ovaria a jeho aberace jsou u pacientek méně často diagnostikovány. Toto však neplatí u rodin s výskytem mužské rakoviny prsu, v tomto případě je frekvence diagnostiky daleko vyšší.⁽³⁶⁾

Probemix P045-B3 obsahuje: (1) sondy pro všechny exony BRCA2 genu (13q12.3); (2) dvě sondy pro exony 1, 3, 27 a dlouhý exon 11; (3) 8 sond pro další lidské geny na dalších chromosomech; (4) dvě sondy pro sekvence před a po BRCA2 genu; (5) 3 sondy pro CHEK2 gen na 22q12.1. Jedna z těchto sond bude viditelná pouze v případě, že vzorek obsahuje CHEK2 1100delC mutaci. Přítomnost této mutace představuje pro ženy i muže (10x) zvýšené riziko rakoviny prsu.⁽³⁶⁾

Pro potvrzení výsledků získaných prostřednictvím tohoto probemixu může být použit SALSA MLPA P077 BRCA2 probemix.⁽³⁶⁾

3.7.3. SALSA MLPA P070 Subtelomerase Mix 2B probemix

Pro detekci subtelomerických delecí je v Nemocnici České Budějovice a.s. používán kit SALSA MLPA probemix P070 Subtelomeres Mix 2B probemix.

Tento druh kitu byl vyvinut pro detekci delecí nebo duplikací v subtelomerických oblastech. Tyto aberace mohou být příčinou vývojového zpoždění, dysmorfických rysů, dalších vrozených vad nebo potratu.⁽³⁸⁾

Pro vyšetření pomocí tohoto kitu může být použita: periferní krev, bukalní stěr, nekulturní amniocyty nebo choriové klky.⁽³⁸⁾

SALSA MLPA P70 Subtelomeres Mix 2B probemix obsahuje 47 MLPA sond s produkty amplifikace o délce mezi 121 a 490 nt z toho jsou 2 sondy pro každý chromosóm a 1sonda pro specifickou část chromosomu Y. 41 sond je umístěno v subtelomerických oblastech. Není zde obsažena žádná sonda pro subtelomerické oblasti akrocentrických oblastí (13, 14, 15, 21 a 22), protože pro ty je tu přítomna zvláštní sonda, která je součástí q ramene v blízkosti centromery.⁽³⁸⁾

3.7.4. SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix1 probemix

Pro detekci subtelomerických delecí je Laboratoří molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. používán krom předchozího probemixu používán i SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix.

Tento probemix obsahuje: 47 MLPA sond s produkty amplifikace mezi 118 a 483 nt z toho: 2 sondy pro každý chromosom, a 1 sonda pro specifickou část Y chromosomu. 41 sond je umístěno v subtelomerických oblastech. Není zde přítomno 5 akrocentrických chromosomů (13, 14, 15, 21 a 22). Pro detekci těchto chromosomů je zde přítomno q rameno v blízkosti centromery. Subtelomerické sondy pro chromosom X a Y jsou stejně jako u předchozího probemixu shodné.⁽³⁷⁾

3.7.5. SALSA MLPA probemix P245-B1 Microdeletion Syndrome-1

Tento typ kitu od MRC-Holland je v Laboratoří molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. používán na vyšetření mikrodelečních syndromů, které jsou příčinou řady nevysvětlených případů mentální retardace.

Probemix SALSA MLPA 245 má omezený počet sond pro každou specifickou oblast na chromosomu a to je důvod proč nedetekuje všechny možné případy zahrnutých syndromů. Např. Prader-Williho syndrom je z 70% způsoben velkými delecemi v oblasti 15q, přičemž tato oblast je detekovatelná SALSA MLPA 245, ale metylační změny v SNRPN (Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide), které jsou rovněž příčinou tohoto syndromu už tímto probemixem detekovatelné nejsou.⁽²⁹⁾

Tento probemix je navržen na detekci delece nebo duplikace jedné nebo více sekvencí v dané chromosomální oblasti DNA vzorku (Tab IV.). Heterozygotní delece by měla dávat o 35-50% sníženou výšku píku. Delece na X-chromosomu vede u mužů k úplné absenci sondy, zatímco ženský heterozygot je rozpoznatelný snížením relativní výšky píku o 35-50%.⁽²⁹⁾

Tab. IV: Mikrodeleční syndromy-1 detekované SALSA MLPA P245⁽²⁹⁾

Chromosomální oblasti v DNA vzorku
1p36 deleční syndrom
2p16 mikrodelece
2q23 mikrodelece / MBD5
2q23 mikrodelece / SATB2
3q29 mikrodelece
9q22.3 mikrodelece
15q24 deleční syndrom
17q21 mikrodelece
22q13 / Phela-McDermid
Cri Du Chat syndrom, 5q15
DiGeorge syndrom 22q11
Distal 22q11 oblast
DiGeorge oblast 2, 10p14
Langer-Giedion syndrom, Bq
Miller-Dieker syndrom, 17p
NF1 mikrodeleční syndrom
Prader-Willi / Angelman
MECP2 / Xq28 duplikace
Rubinstein-Taybi syndrom
Smith-Magenis syndrom

Sotos syndrom 5q35.3
Williams syndrom
Wolf-Hirschhorn 4p16.3

3.8. Cíle práce

Cílem této práce bylo představit metodu MLPA jako jednu z mnoha diagnostických možností v lékařské genetice. Srovnat ji s ostatními metodami detekující nebalancované změny genomu. Vyhodnotit výsledky pomocí analyzačních softwarů.

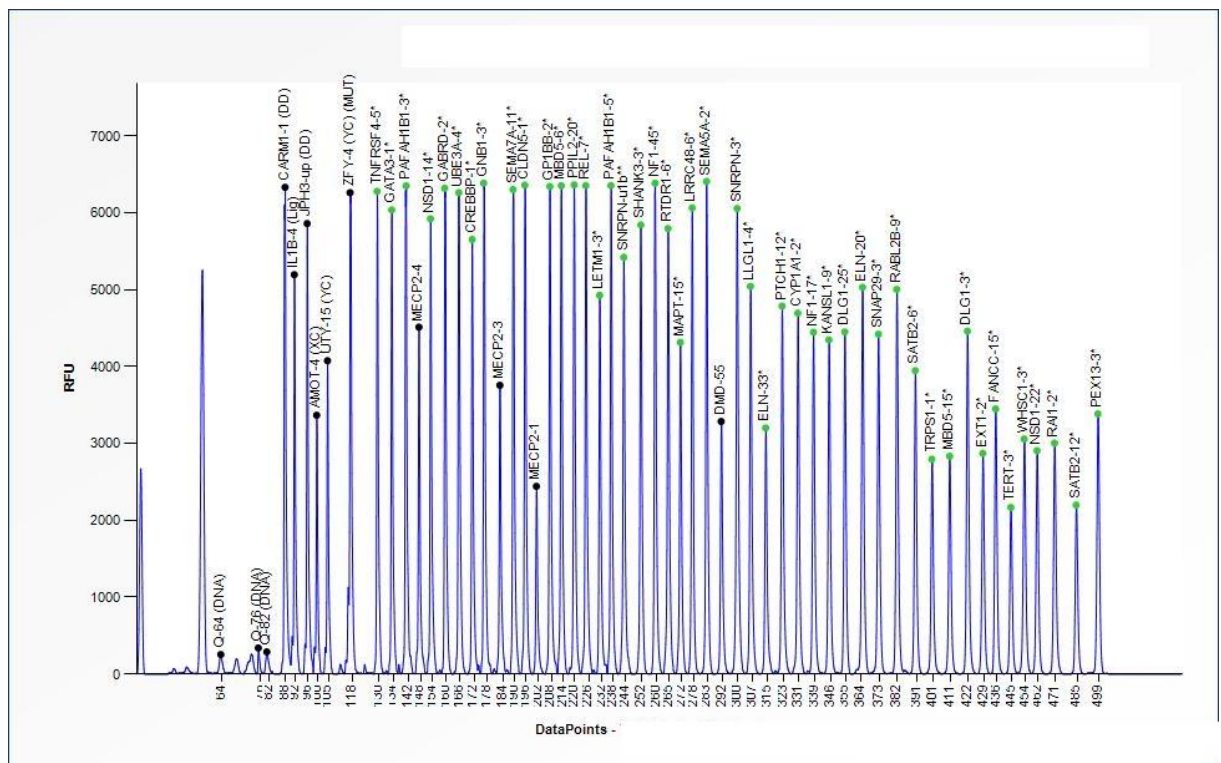
3.9. Hypotéza

Domnívám se, že tato metoda je schopna plnit své cíle v diagnostice nebalancovaných změn genomu, pro jejíž účely byla vyvinuta. Dále si myslím, že je tato metoda široce využívána v lékařské genetice.

4. Výsledky

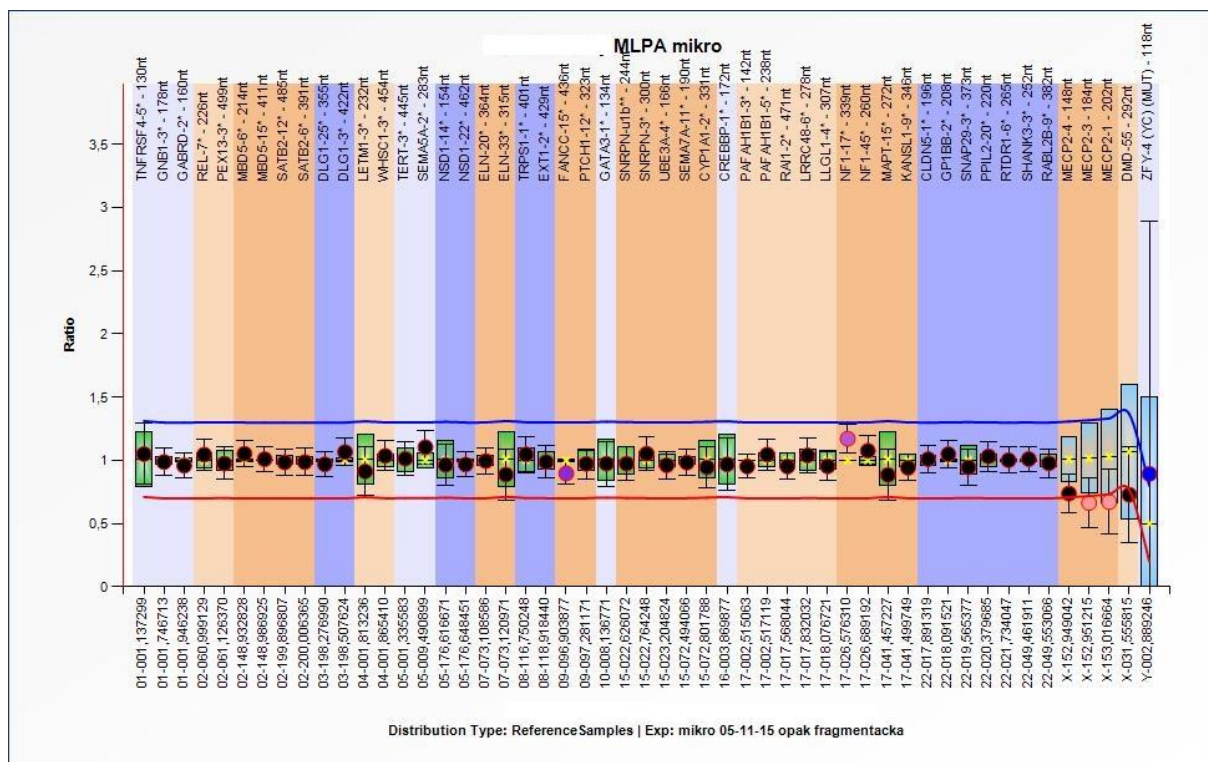
V rámci praktické části této práce jsem pod vedením svého školitele Mgr. Ondřeje Scheinosta kvůli optimalizaci metody provedla desítky MLPA testů. Poměrně dlouhou dobu nám trvalo, než se podařilo odstranit chyby, které měly za následek neinterpretovatelné výsledky. Námí získané výsledky jsou zobrazeny na obrázcích 1-6. Dále jsme se zabývali srovnáním metody MLPA a Array CGH. Jednotlivé body srovnání jsou uvedeny v tabulce (Tab V).

Na obrázku č.5 je vyobrazen výsledek kapilární elektroforézy před zanalyzováním pomocí Coffalyse.Net. Vzorek byl testován na přítomnost mikrolečních syndromů za použití kity SALSA MLPA 245 Microdeletion Syndrome (MRC-Holland). Na ose Y je znázorněna relativní fluorescence a na ose X délka fragmentů (počet nukleotidů). Názvy jednotlivých detekovaných lokusů jsou uvedeny u píků.



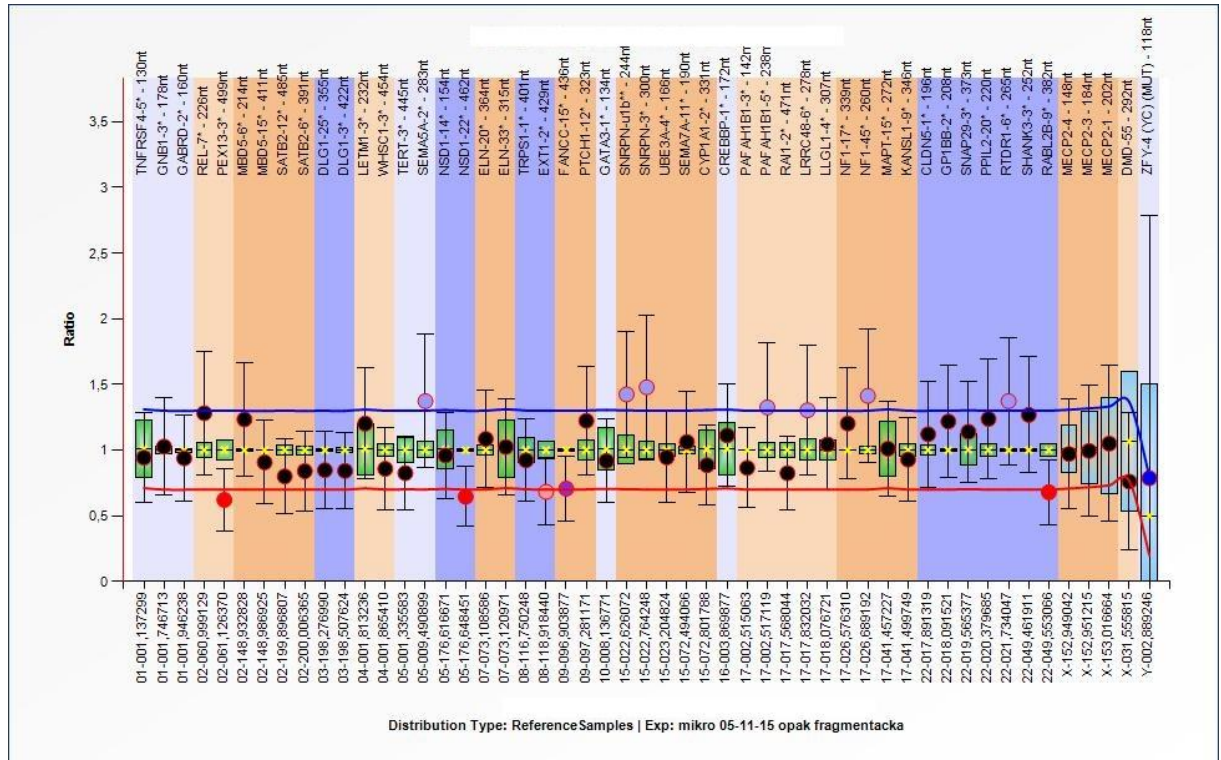
Obr. 5: Výsledky kapilární elektroforézy u pacienta vyšetřovaného na přítomnost mikrolečních syndromů.

Na obrázku č. 6 je zobrazen fyziologický stav (bez aberací). Pro tento výsledek byl použit kit SALSA MLPA 245 Microdeletion Syndrome (MRC-Holland). Osa X nám znázorňuje délky fragmentů (počet nukleotidů) a osa Y relativní fluorescenci. Detekované lokusy jsou pojmenované vždy u jednotlivých piků.



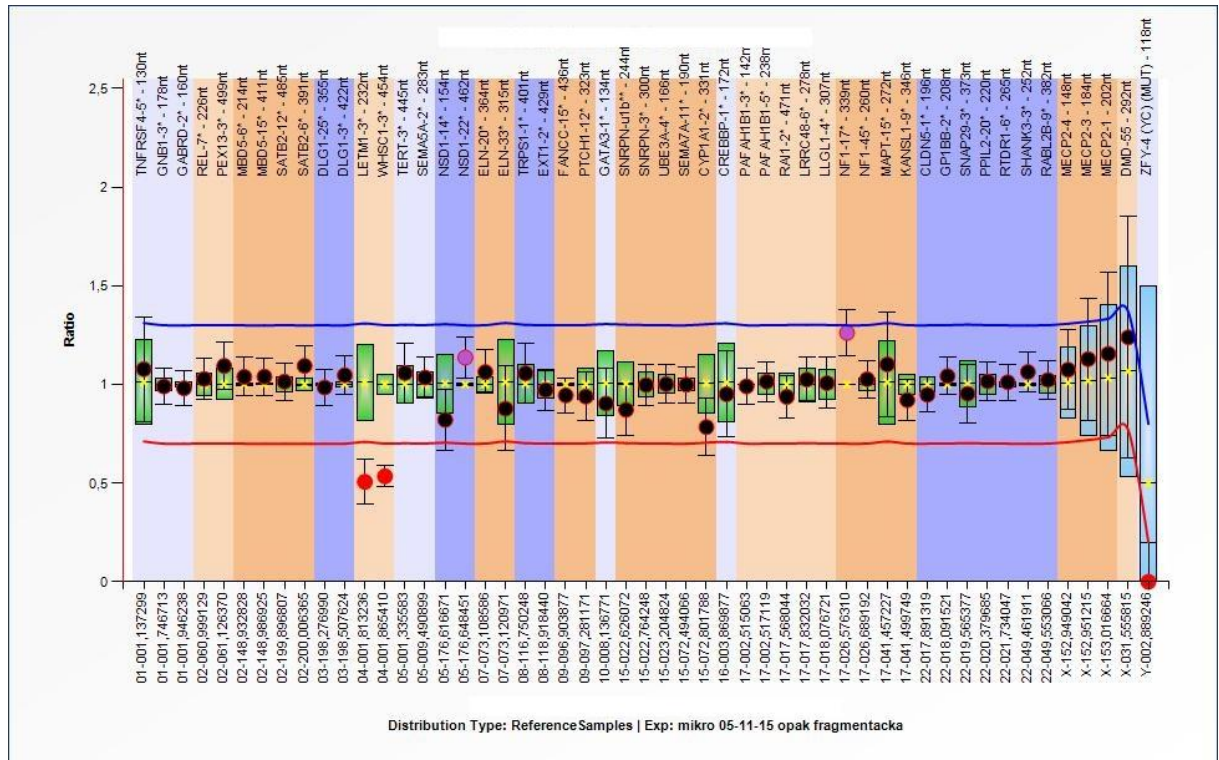
Obr. 6: Fyziologický stav – pacient bez mikrodeleci prokazatelných SALSA MLPA 245 Microdeletion Syndrome (MRC-Holland)

Na obrázku č. 7 je vidět chybný výsledek MLPA reakce. Jednotlivé a zcela rozdílné lokusy totiž vykazují aberantní poměr fluorescence. Na tento test byl použit kit SALSA MLPA 245 Microdeletion Syndrome (MRC-Holland). Na ose Y je vyobrazen (1) poměr relativní fluorescence u vyšetřovaného a referenčního vzorku; (2) názvy detekovaných lokusů a na ose X je zobrazeno umístění testovaných lokusů na jednotlivých chromosomech.



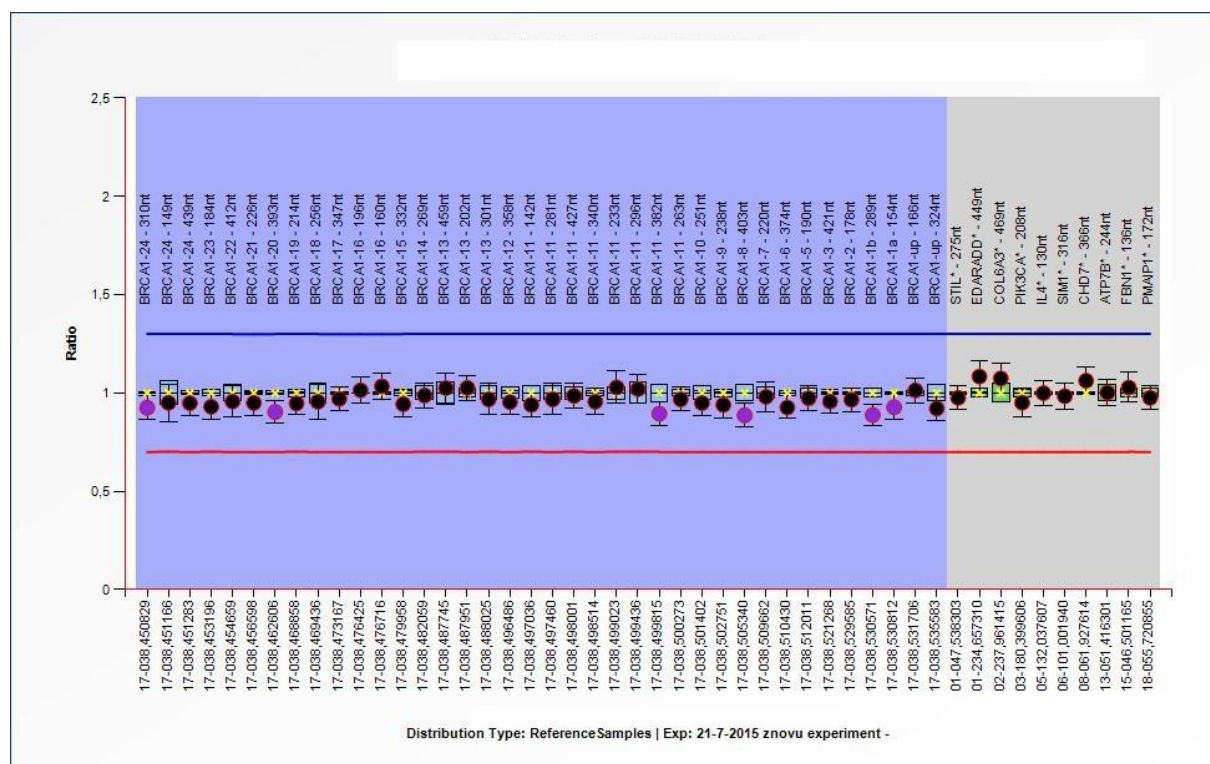
Obr. 7: Chybný výsledek testování mikrodelečních syndromů.

Na obrázku č. 8 je možné vidět mikrodelece v oblasti 4p zobrazené za použití kitu SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndrome (MRC-Holland). Osa X: umístění testovaných lokusů na jednotlivých chromosomech. Osa Y: (1) poměr relativní fluorescence u vyšetřovaného a referenčního vzorku; (2) názvy detekovaných lokusů.



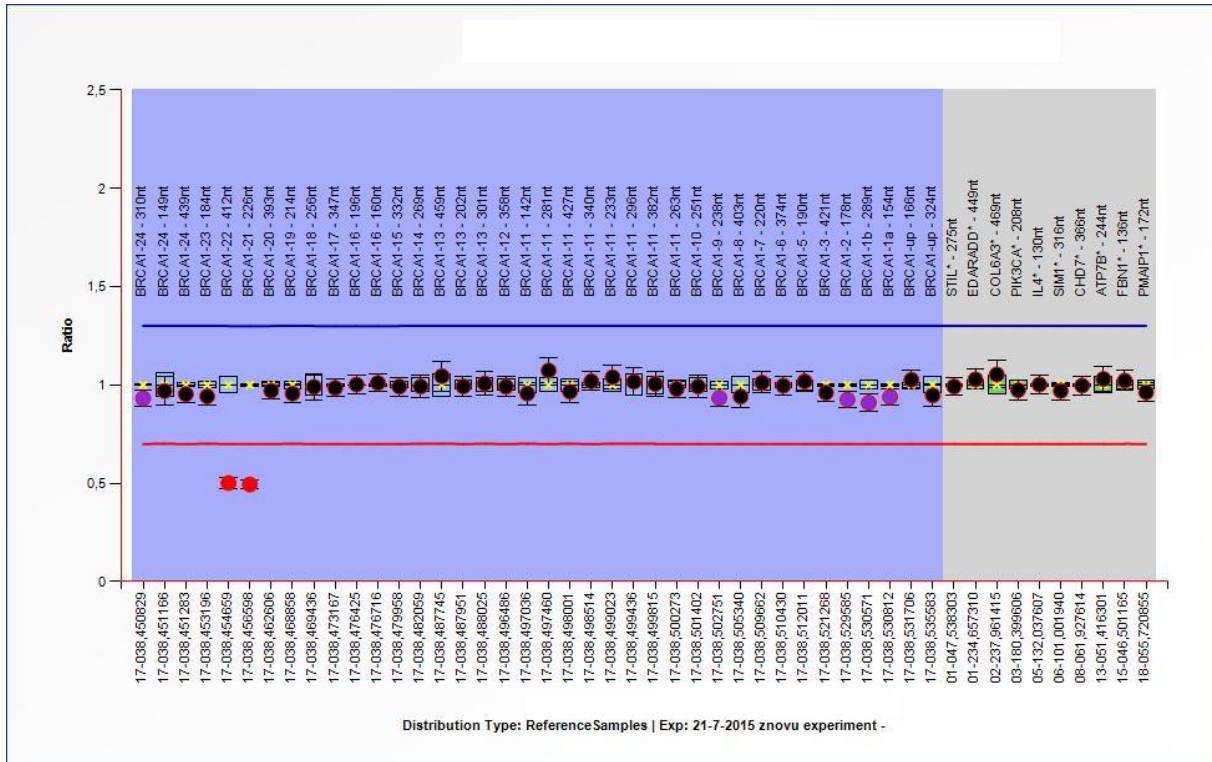
Obr. 8: Mikrodelece v oblasti 4p.

Na obrázku č. 10 je zobrazen fyziologický stav v genu BRCA1. Na detekci aberací u tohoto genu byl použit kit SALSA MLPA P002 BRCA1 (MRC-Holland). Osa X zobrazuje umístění testovaných lokusů na jednotlivých chromosomech – pro BRCA 1 chromosom 17 – modrá oblast, kontrolní lokusy z jiných částí genomu – šedá oblast. Na ose Y je znázorněn (1) poměr relativní fluorescence u vyšetřovaného a referenčního vzorku; (2) názvy detekovaných lokusů.



Obr. 10: Fyziologický stav v genu BRCA1.

Na obrázku č. 11 je patrná delece exonů 21 a 22 genu BRCA 1. Opět byl u tohoto genu použit kit: SALSA MLPA P002 BRCA1 (MRC-Holland). Na Ose X je umístění testovaných lokusů jednotlivých chromosomů pro BRCA1 (chromosom 17) modrá oblast a kontrolní lokusy z jiných částí genomu – šedá oblast. Osa-Y znázorňuje: (1) poměr relativní fluorescence u vyšetřovaného a referenčního vzorku; (2) názvy detekovaných úseků.



Obr. 11: Delece exonů 21 a 22 genu BRCA1.

Ačkoli je k analýze dat možno využít řadu softwarů, tak my jsme využily Coffalyser.Net, protože je firmou MRC-Holland doporučována a také je volně přístupný.

5. Diskuse

Cílem mé práce bylo porovnání metody MLPA s ostatními diagnostickými metodami, které jsou v lékařské genetice využívány pro určení nebalancovaných změn genomu. Výsledky pro mou bakalářskou práci jsem získala z databáze Nemocnice České Budějovice a.s. U získávání některých výsledků jsem byla přítomna a osobně je pod odborným dohledem provedla.

Moji hypotézu, že je tato metoda široce používána se mi po průzkumu odborných publikací podařilo potvrdit.

FISH spolu ještě s STRs (Short tandem repeat) porovnává s MLPA ve svém článku Fenrandéz L.. Do této studie bylo zahrnuto 30 pacientů s delečním syndromem 22q11.2. Tento deleční syndrom byl běžně diagnostikován užitím metody Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) s užitím běžně dostupných sond. Chromosomální bodové zlomy a místa delece byly následně charakterizovány pomocí short tandem repeat (STR) segregčního testu nebo pomocí metody FISH s použitím dalších sond. MLPA metodou bylo shodně diagnostikováno všech 30 pacientů, kteří byli předtím diagnostikováni pomocí FISH a STR, krom toho bylo pomocí MLPA metody určeno dalších sedm pacientů, kteří STR analýzou diagnostikováni nebyli.⁽¹⁶⁾

My jsme provedli srovnání MPLA s metodou Array CGH viz obr. 8 a 9. a jejich vzájemné vlastnosti jsme shrnuli pro porovnání do tabulky V.

Tab. V: Shrnutí vlastností MLPA a Array CGH

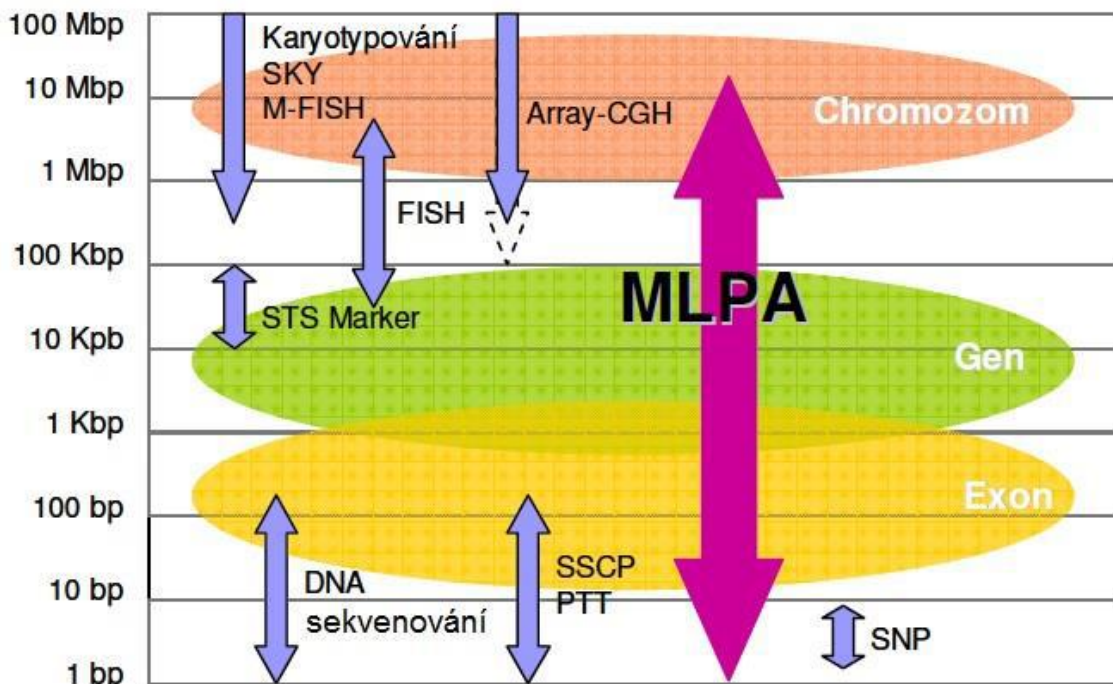
	MLPA	Array CGH
Technologie	multiplex PCR ve zkumavce + kapilární elektroforéza	multiplex hybridizace k DNA na nosiči
Použití	nebalancované přestavby	nebalancované přestavby
Velikost detekovaných sekvencí v multiplexu	50-70 nukleotidů	60 nukleotidů
Velikost detekované sekvence	do 60 nt	40.000 – 3.000.000 nt
spolehlivost	aberantní výsledek jednoho lokusu je významný (doporučeno ověřit)	aberantní výsledek jednoho lokusu není významný, významná je větší oblast několika sousedících lokusů (statistické hodnocení)
Detekovaná oblast	vybrané úseky genomu (1 gen, vybrané sekvence – např. mikrodeleční syndromy apod.)	celý genom, vybrané oblasti (např. vrozené choroby, onkogeny...)
Cena reagensů	stovky Kč	tisíce Kč

Madrigal ve své studii doporučuje aby MLPA metoda byla používána jako první pro detekci duplikací a delecí u na X-vázané mentální retardace. Do své studie zahrnul 80 pacientů (mužů) u kterých bylo podezření na tento typ postižení. Ve výsledku byly u 4 pacientů (5%) zjištěny změny v počtu chromosomů.³³⁾

Výhodami MLPA je, že ji můžeme použít k různým testům a jediným rozdílem mezi nimi je mix sond. Jinak jsou všechny reagentie stejné. Jedna reakce je schopna nám poskytnout informace až o 50 vzorcích, které je možno testovat současně a přesto se jedná o relativně levnou a snadnou výzkumnou techniku. Výsledky získané touto metodou jsou snadno reprodukovatelné a nejsou závislé na množství vzorku, kterého je potřeba pouze 20 ng DNA. MLPA je schopna rozpoznat rozdíl v jednom nukleotidu a je schopna detekovat malé rozdíly v počtu kopií. Dokonce detekuje sekvence jen o 60 nukleotidech a může tak detekovat i delece a duplikace v jednom exonu.⁽¹⁴⁾

A naopak nevýhodou MLPA je, že se jedná o velmi na nečistoty citlivou metodu, které pro běžnou PCR nejsou překážkou. Ale pokud nastane nějaká chyba související s nečistotami ve vzorku, tak je to velmi snadno zjistitelné. Přestože je MLPA na nečistoty citlivá, tak dokáže dobré výsledky získat i z DNA extrahované s formaldehydem ošetřeného vzorku nebo zalitého do parafínu. Oproti FISH se nedá MLPA použít k vyšetření jednotlivých buněk. MLPA totiž DNA analyzuje z mixu buněk a dává tak průměrný počet kopií na buňku. V případě analýzy nádoru je obtížné detekovat delece daných genů, pokud vzorek, z něhož byla DNA extrahována, obsahuje méně než 50% rakovinných buněk.⁽¹⁴⁾

Porovnání MLPA s ostatními metodami je vyobrazeno na Obr. 12.



Obr. 12: Porovnání MLPA metody z pohledu citlivosti detekce změn s ostatními metodami⁽³¹⁾

6. Závěr

Celkem bylo provedeno několik desítek testů jen pro normalizaci dat a pro odstranění chyb, které nám způsobovali chybné výsledky. Interpretovatelné výsledky jsme porovnali s Array CGH a prokázalo se, že metoda MLPA má své nezastupitelné místo v klinické diagnostice. Vhodně doplňuje metody, které jsou zaměřeny na sekvenční změny genomu a detekci nebalancovaných změn různého rozsahu. Obě tyto metody lze použít pro detekci nebalancovaných změn.

7. Seznam informačních zdrojů

1. COFFA, Jordy a Joost VAN DEN BERG. Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser.NET by MRC-Holland. *Modern Approaches to Quality Control*. 2011, s. 125–151.
2. KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. 2006. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 120 s. ISBN 80-246-1069-8.
3. About MRC-Holland. 2015. *About MRC-Holland* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: http://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_G1U3PYAOzf1CKUYbfGWqf8Pu6Ry9zubLiupe67yfWQk.
4. STUPPIA, Liborio, Ivana ANTONUCCI, Giandomenico PALKA a Valentina GATTA. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, roč. 13, č. Dmd, s. 3245–3276. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms13033245
5. MLPA Protocol One-Tube MDP-v005 (1). 2014. *MLPA Protocol One-Tube MDP-v005 (1)* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: Result interpretation-v02.2
6. MLPA General information presentation (PDF). *MLPA General information presentation (PDF)* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: www.mlpa.com
7. MLPA® - an introduction. 2015. *MLPA® - an introduction* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: http://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wl2zCjirCGANQgZPuTixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g.
8. DANADOVA, Jitka. *QF PCR v molekulární diagnostice NF1*. Brno v2013. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie Oddělení genetiky a molekulární biologie.
9. Result interpretation-v02.2. *Result interpretation-v02.2* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: www.mlpa.com

10. WILLIS, Alecia S, Ignatia VAN DEN VEYVER a Christine M ENG. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal diagnosis* [online]. 2012, roč. 32, č. 4, s. 315–20 [vid. 5. říjen 2014]. ISSN 1097-0223. Dostupné z: doi:10.1002/pd.3860
11. HÖMIG-HÖLZEL, Cornelia a Suvi SAVOLA. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagnostic Molecular Pathology* [online]. 2012, roč. 21, č. 4, s. 1. ISSN 1052-9551. Dostupné z: doi:10.1097/PDM.0b013e3182595516
12. MS-MLPA Protocol One-Tube MSP-v004. 2013. *MS-MLPA Protocol One-Tube MSP-v004 (2)* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: www.mpla.com
13. Methylation-specific MLPA® (MS-MLPA). *Methylation-specific MLPA® (MS-MLPA)* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: https://www.mpla.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhMUCJLqQzwZq_fiQWQTnAP-0V13AZUzpnKmyAPu7IsFt
14. General folder MLPA-v33. 2012. *General folder MLPA-v33* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: www.mpla.com
15. ŠMARDA, Jan. 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
16. FERNÁNDEZ, L, P LAPUNZINA, D ARJONA, I LÓPEZ PAJARES, L GARCÍA-GUERETA, D ELORZA, M BURGUEROS, M L DE TORRES, M a MORI, M PALOMARES, a GARCÍA-ALIX a a DELICADO. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clinical genetics* [online]. 2005, roč. 68, č. 4, s. 373–378. ISSN 0009-9163. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00493.x
17. Array-CGH. *Integrované laboratoře molekulární cytogenetiky* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: <http://www.cba.muni.cz/cytogenlab/index.php?pg=metody--array-cgh>
18. PAVLŮ, Hana. Dědičná predispozice nádoru prsu a vaječníků. *Sestra*, 2013, roč. 23, č. 11, s. 35-37. ISSN: 1210-0404.

19. SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS. 2009. *Genetika*. Vyd. 1. Editor Jiřina Relichová. Překlad Anna Matalová. Brno: Masarykova univerzita, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
20. VAŠIČKOVÁ, Petra, Eva MACHÁČKOVÁ, Miroslava LUKEŠOVÁ, Ondřej HORKÝ, Hana PAVLŮ, Jitka KUKLOVÁ, Veronika URBÁNKOVÁ, Veronika FOLTÁNKOVÁ, Marie NAVRÁTILOVÁ, et al. 1988-. Varianty neznámého významu a intragenova přeskupenı v genech BRCA1 a BRCA2. *Klinicka onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. Brno: ApS [Application Software] Brno, **19**. ISSN 0862-495x.
21. MONTAGNA, Marco, Maurizia Dalla PALMA, Chiara MENIN, Simona AGATA, Arcangela DE NICOLO, Luigi CHIECO-BIANCHI a Emma D. D&APOS;ANDREA. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Human Molecular Genetics* [online]. 2003, roč. 12, č. 9, s. 1055–1061. ISSN 09646906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddg120
22. OTOVA, Berta, Milada KOHOUTOVÁ a Aleš PANCZAK. 2013. *Lekařská biologie a genetika*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 3 sv. (123; 202; 144 s.). ISBN 978-80-246-1594-3.
23. HONJO, Rachel Sayuri, Roberta Lelis DUTRA, Erika Arai FURUSAWA, Evelin Aline ZANARDO, Larissa SAMPAIO, De Athayde COSTA, Leslie Domenici KULIKOWSKI, Debora Romeo BERTOLA a Chong Ae KIM. Williams-Beuren Syndrome : A Clinical Study of 55 Brazilian Patients and the Diagnostic Use of MLPA. 2015, roč. 2015.
24. LOGHMANI, Houra, Khouzani MS, Ariana KARIMINEJAD, Gholamreza ZAMANI, Maryam Ghalandary MS, Bita BOZORGMEHR, Susan AMIRSALARI, Faezeh MOJAHEDI, Sayed Hassan TONEKABONI a Roxana Kariminejad RRVHLQ. Investigation of Microdeletions in Syndromic Intellectual Disability by MLPA in Iranian Population. 2014, roč. 17, č. 7, s. 471–474.
25. Subtelomerické přestavby chromozomu. 2014. *WikiSkripta* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Subtelomerick%C3%A9_p%C5%99estavby_chromozom%C5%AF

26. RAJASEKHAR, Moka, KattaMohan GIRISHA, Podila SatyaVenkata Narasimha SHARMA, PuthiyaMundyat GOPINATH a Neetha JOHN. 2013. Multiplex ligation-dependant probe amplification study of children with idiopathic mental retardation in South India. *Indian Journal of Human Genetics* [online]. **19**(2): 165- [cit. 2015-08-08]. DOI: 10.4103/0971-6866.116115. ISSN 0971-6866. Dostupné z: <http://www.ijhg.com/text.asp?2013/19/2/165/116115>
27. ROOMS, Liesbeth, Edwin REYNIERS, Rob VAN LUIJK, Stefaan SCHEERS, Jan WAUTERS, Berten CEULEMANS, Jenneke VAN DEN ENDE, Yolande VAN BEVER a R. Frank KOOY. Subtelomeric Deletions Detected in Patients with Idiopathic Mental Retardation Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Human Mutation* [online]. 2004, roč. 23, č. 1, s. 17–21. ISSN 10597794. Dostupné z: doi:10.1002/humu.10300
28. Coffalyser.Net - Overwiev. *COFFALYSER.NET* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: <https://coffalyser.files.wordpress.com/2013/08/coffalyser-net-analysis-manual1.pdf>
29. Product description P245-B1-0614 Microdeletion 1-v33. 2014. *Www.mlpa.com* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: <https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= rpaFvT21Qb8>.
30. General Questions on MLPA. *Www.mlpa.com* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: <https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= z0yYgH6VhBtZpHfoS8n5qA>.
31. MLPA MRC-Holland. *MLPA MRC-Holland* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= fNPBLedDVp38p-CxU2h0mQ>.
32. Coffalyser.Net. *MLPA MRC-Holland* [online]. [cit. 2015-08-08]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= 6MeHxYlkoncoMKK1IyFiVx6SeQwU9OOSN3VQziV 30Q>.

33. MADRIGAL, Irene, Laia RODRÍGUEZ-REVENGA, Celia BADENAS, Aurora SÁNCHEZ, Francisco MARTINEZ, Isabel FERNANDEZ, Miguel FERNÁNDEZ-BURIEL a M MILÀ. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* [online]. 2007, roč. 9, č. 2, s. 117–122. ISSN 1098-3600. Dostupné z: doi:10.1097/GIM.0b013e318031206e
34. HURYCH, Petr. *Molekulárně genetické testování hemofilie typu A*. Brno 2015.
Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie.
35. Product Description SALSA® MLPA® probemix P002-D1 BRCA1 To be used with the MLPA General Protocol. 2015. *Mlpa.com* [online]. [cit. 2015-08-10]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMj aDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= cntjdkpAKTM>.
36. SALSA MLPA probemix P045-B3 BRCA2/CHEK2.
2015. *Http://www.mlpa.com* [online]. [cit. 2015-08-11]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMj aDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= nbFCWKbNdrA>.
37. SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix.
2015. *Http://www.mlpa.com* [online]. [cit. 2015-08-11]. Dostupné z: http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMj aDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= Q8_3_dVQP-g.
38. SALSA MLPA P070 Subtelomeres Mix 2B probemix.
2015. *Http://www.mlpa.com* [online]. [cit. 2015-08-11]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMj aDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= qQ8oLJrSaVc>.
39. Analizy molekularne DNA i RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. 2008. *CzytelniaMedyczna.pl - publikacje medyczne online* [online]. [cit. 2015-08-11]. Dostupné z: <http://www.czytelniamedyczna.pl/2998,analizy-molekularne-dna-i-rna-w-wykrywaniu-dziedzicznych-predyspozycji-do-nowotw.html#>