

Metody analizy DNA

- laboratorium genetyczne - cz. II

STRESZCZENIE | Artykuł jest kontynuacją prezentacji wybranych metod molekularnych stosowanych w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka w codziennej praktyce diagnostycznej, która ukazała się w wydaniu 11-12/2013. W niniejszej części artykułu zaprezentowane zostały techniki, których podstawę stanowi zdolność łączenia się cząsteczek kwasów nukleinowych o komplementarnych sekwencjach.

SŁOWA KLUCZOWE | DNA, hybrydyzacja, MLPA, MS-MLPA, RT-MLPA, mikromacierze DNA

SUMMARY | This article is a continuation of the presentation of selected molecular methods used in the Department of Medical Genetics, Institute of Mother and Child in daily diagnostic practice, which appeared in issue 11-12/2013. In this part of the article were presented techniques based on the ability to connect to the nucleic acid molecules with complementary sequences.

KEYWORDS | hybridization, MLPA, MS-MLPA, RT-MLPA, DNA microarrays

dr n. med. Monika Gos,
dr n. biol. Agnieszka Charzewska,
dr n. med. Katarzyna Wertheim-Tysarowska,
dr n. med. Sylwia Rzońca,
dr n. med. Beata Nowakowska,
dr n. biol. Dorota Hoffman-Zacharska

IZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ, INSTYTUT MATKI I DZIECKA, WARSZAWA

Hybrydyzacja jest jedną z pierwszych metod, które zastosowano w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych. Wykorzystuje ona zjawisko wiązania się jednoniciowego DNA (sondy oligonukleotydowej) do specyficznych, komplementarnych sekwencji w badanym DNA lub RNA unieruchomionych na filtrze lub w preparatach histologicznych/cytologicznych. Stosowana sonda zazwyczaj sprzężona jest z określonym znacznikiem, który pozwala na późniejszą detekcję specyficznie związanej sondy. We wczesnym okresie zastosowania tej techniki wykorzystywano sondy znakowane izotopowo, a metodą wykrywania była autoradiografia. W chwili obecnej stosuje się sondy połączone z fluorochromem lub określonym znacznikiem (np. digoksygeniną), który rozpoznawany jest przez specyficzne przeciwciało sprzężone z enzymem (np. fosfatazą alkaliczną, peroksydazą chrzanową) rozkładającym substrat dla reakcji chemiluminescencyjnej lub kolorymetrycznej.

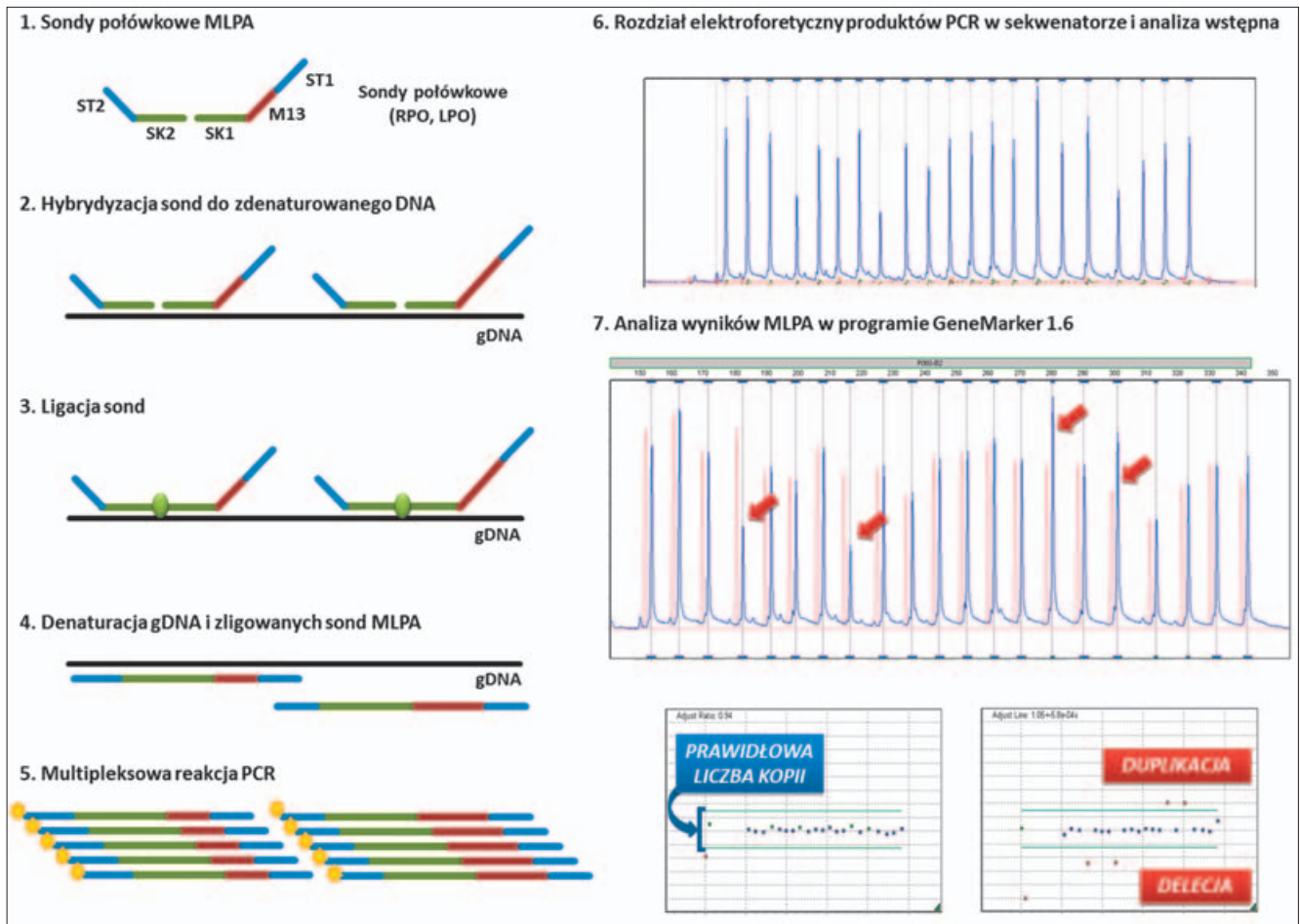
Rozwój takich metod, jak PCR i sekwencjonowanie, znacznie ograniczył wykorzystanie techniki hybrydyzacji. Klasyczna metoda hybrydyzacji typu Southern (hybrydyzacja DNA:DNA) wykorzystująca sondy specyficzne dla genu *FMR1* znakowane digoksygeniną oraz chemiluminescencyjną detekcję sygnału jest stosowana w diagnostyce molekularnej zespołu łamliwego chromosomu X - jednej z częstszych genetycznych przyczyn niepełnosprawności intelektualnej.

FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA *IN SITU*

Metoda hybrydyzacji jest również podstawą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) stosowanej w badaniach cytogenetycznych. W metodzie tej stosuje się sondy komplementarne do określonych regionów chromosomowych, znakowane barwnikami fluorescencyjnymi, zaś samo

badanie przeprowadza się na preparatach komórkowych utrwalonych na szkiełkach mikroskopowych. W zależności od problemu diagnostycznego stosowane są różne rodzaje sond pozwalających na wykrywanie chromosomowych aberracji liczbowych i strukturalnych. Najczęściej stosowane są sondy specyficzne dla określonego *locus* chromosomowego, zwłaszcza w przypadku podejrzenia klinicznego określonego zespołu chromosomowego (zespołu mikrodelecji lub mikroduplikacji), za który może być odpowiedzialna zmiana o charakterze submikroskopowym, niemożliwym do wykrycia w rutynowej ocenie kariotypu. Tego typu sondy stosowane są także w diagnostyce onkologicznej, gdzie określonemu nowotworowi mogą towarzyszyć specyficzne aberracje chromosomowe o znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym, np. amplifikacja konkretnego onkogenu (np. amplifikacja genu *HER2* w nowotworach piersi), delecja supresora nowotworowego (np. delecja *TP53* w przewlekłej białaczce limfocytowej) czy specyficzna translokacja (np. t(11;14) w chłoniaku z komórek płaszczą). W badaniach z wykorzystaniem techniki FISH stosuje się także sondy centromerowe, np. w badaniu RAPID-FISH, opracowanym na potrzeby szybkiej detekcji aneuploidii chromosomów 13, 18 i 21 oraz chromosomów płciowych w diagnostyce pre- i postnatalnej. W przypadku obecności chromosomów markerowych czy translokacji do określenia pochodzenia dodatkowego materiału genetycznego można wykorzystać sondy centromerowe i małe specyficzne dla określonych chromosomów.

Niewątpliwie technika FISH ma znacznie większą rozdzielczość i jest bardziej dokładna niż klasyczna analiza kariotypu. W określonych sytuacjach możliwe jest jej zastosowanie w preparatach przygotowanych bezpośrednio z pobranego materiału, bez konieczności wcześniejszej ▶



Rys. 1. Schemat przedstawiający zasadę i etapy podstawowej metody MLPA: (1) Zasada konstruowania sond połówkowych wykorzystywanych w reakcji MLPA, które hybridyzowane są do zdenurowanego genomowego DNA (SK1, SK2 – sekwencje komplementarne do analizowanego regionu DNA, M13 – „wstawka” sekwencja z faga M13 o zmiennej długości, ST1, ST2 – sekwencje komplementarne do sekwencji starterów do reakcji multiplexowego PCR) (2). Jeżeli w danym *locus* zostaną przyłączone obie sondy połówkowe, łączone są ze sobą w procesie ligacji (3), a następnie zostają wykorzystane jako matryce (4) do multiplexowej reakcji PCR (5). Produkty otrzymane w procesie amplifikacji rozdzielane są elektroforetycznie (6). (7) Schemat analizy wyników reakcji MLPA dla zestawu P060-B1 SMA (MRC-Holland), wykorzystywanego w diagnostyce rdzeniowego zaniku mięśni (mutacje w genie /SMN1/). Analizę przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania GeneMarker 1.6 (SoftGenetics LLC). Reprezentacja graficzna elektroforegramu prezentującego porównanie wysokości pików próbki badanej (niebieskie) i kontrolnej (czerwone). Na wykresie widoczne obniżenie wysokości pików dla eksonów 7 i 8 genu SMN1 i podwyższenie wysokości pików dla eksonów 7 i 8 genu SMN2 w próbce pacjenta, charakterystyczne dla delekcji i duplikacji. Poniżej wykresy normalizacji danych dla badanego pacjenta względem kontroli – delekcja eksonu 7 i 8 genu SMN1 i duplikacja eksonów 7 i 8 genu SMN2. O obecności duplikacji lub delekcji fragmentów DNA świadczy położenie na wykresie punktów dla reprezentujących je markerów powyżej lub wartości progowych (0,7-1,3).

▷ hodowli komórek (tzw. badanie jąder interfazowych). Jednocześnie jej zasadniczą wadą jest to, że w badaniu możliwa jest analiza jedynie wybranych *loci* chromosomowych, których liczbę ogranicza liczba dostępnych barwników fluorescencyjnych. Zastosowanie tej techniki wymaga więc dokładnego sprecyzowania problemu diagnostycznego, który chcemy rozwiązać z jej wykorzystaniem. Jednocześnie rozwój nowych metod diagnostycznych o większej rozdzielczości, takich jak MLPA czy mikromacierze, których podstawą jest również hybridyzacja kwasów nukleinowych, powoli wypiera technikę FISH, zwłaszcza w przypadku podejrzenia niezrównoważenia materiału genetycznego.

❖ **MULTIPLEKSOWA AMPLIFIKACJA SOND ZALEŻNA OD LIGACJI (MLPA)**
Metoda multipleksowej amplifikacji sond zależnej od ligacji – MLPA (ang. *multi-*

plex ligation-dependent probe amplification) została opracowana przez firmę MRC-Holland. Technikę tę po raz pierwszy opisał w 2002 roku Schouten i wsp. jako metodę względnej oceny ilościowej wybranych fragmentów DNA pod względem liczby ich kopii w genomie. W oryginalnej pracy autorzy przedstawili możliwości zastosowania metody MLPA w identyfikacji delekcji/duplikacji ludzkich genów *BRCA1*, *MSH2* i *MLH1*, trisomii chromosomu 21 w zespole Downa, aberracji chromosomowych w liniach komórkowych i biopatach nowotworów oraz zmian pojedynczych nukleotydów (polimorfizmów/mutacji). Podstawową metodą MLPA rozszerzono następnie o MLPA z zastosowaniem odwrotnej transkrypcji tzw. RT-MLPA (ang. *reverse transcriptase MLPA*), używaną do określenia poziomu mRNA oraz MLPA do analizy profilu metylacji, tzw. MS-MLPA (ang. *methylation specific MLPA*).

Podstawą wszystkich wariantów techniki MLPA jest zasada, że matrycą w reakcji PCR (produkty tej reakcji podlegają końcowej ocenie ilościowej) nie jest materiał analizowanej próbki (DNA/mRNA), lecz sondy MLPA hybridyzujące do badanego DNA (cDNA w przypadku RT-MLPA) i w ten sposób liczba fragmentów uzyskana po reakcji PCR zależy od liczby kopii sekwencji badanej w wyjściowym materiale.

❖ PODSTAWOWA METODA MLPA

MLPA jest odmianą metody PCR multipleks, która umożliwia analizę nawet 50 różnych regionów chromosomowych podczas jednej, prostej reakcji. Technika ta może być stosowana w większości laboratoriów, wyposażonych w podstawowy sprzęt do badań molekularnych, taki jak: urządzenie do pomiaru stężenia DNA, termocykler i zestaw do elektroforezy

kapilarnej. Całe oznaczenie, pomimo że jest procesem kilku-etapowym, przeprowadzane jest w „pojedynczej probówce”, a wyniki uzyskiwane są w ciągu 24-48 godzin.

MLPA jest techniką powszechnie wykorzystywaną w wielu laboratoriach, o czym świadczą liczne doniesienia literatury światowej. Wykorzystywana jest w wielu aplikacjach, takich jak identyfikacja zmian liczby kopii sekwencji w genomie, identyfikacja mutacji i polimorfizmów, analiza profili metylacji i profili ekspresyjnych, a także w diagnostyce nowotworów i zaburzeń mikrodelecyjnych/mikroduplikacyjnych. Znajduje ona także zastosowanie w badaniach postnatalnych i prenatalnych.

W technice MLPA wyróżniamy trzy podstawowe etapy procedury (rys. 1): hybrydyzację sond MLPA do docelowych sekwencji DNA, reakcję ligacji sond i reakcję PCR typu multipleks. W pierwszym etapie procedury zdenaturowany DNA inkubowany jest z mieszaniną sond MLPA. Sonda dla każdego badanego *locus* składa się z dwóch fragmentów – oddzielnych oligonukleotydów tzw. sond połówkowych (ang. *half-probes*), rozpoznających sekwencje przyległe do siebie. Regiony komplementarne do sond obejmują od 19 do 46 nukleotydów. Sondy położone od strony 5' nazywane są również „sondami krótkimi” i/lub lewymi sondami oligonukleotydowymi (ang. *left probe oligonucleotide*, LPO). Na 5' końcu tych oligonukleotydów znajduje się sekwencja wiążąca jeden starter do reakcji PCR. Sondy 3' końca określane są jako prawe sondy oligonukleotydowe (ang. *right probe oligonucleotides*, RPO), zawierają sekwencje wiążące drugi starter dla reakcji PCR oraz fragment dodatkowy – „wstawkę” – pochodzący z DNA faga M13 o długości od 19 do 370 nukleotydów. Pary sond hybrydują do badanej sekwencji bezpośrednio obok siebie, tak że mogą zostać połączone w procesie ligacji, który jest następnym etapem procedury.

Amplifikacja wszystkich sond zachodzi z udziałem jednej pary uniwersalnych starterów, ale tylko wtedy gdy, „obie połówki sond” po hybrydyzacji i ligacji połączą się, tworząc matrycę dla reakcji PCR z dwoma fragmentami rozpoznawanymi przez parę uniwersalnych starterów. Sondy, które nie przyłączyły się do badanego regionu (delecja) lub nie zostały połączone (brak przyłączenia jednej sondy połówkowej z powodu niepełnej zgodności sekwencji, np. mutacje punktowe), zawierają sekwencję tylko jednego startera PCR, zatem nie ulegają amplifikacji i nie generują sygnału.

Obecność „wstawki” DNA o zmiennej wielkości w prawej sondzie połówkowej umożliwia syntezę w reakcji PCR unikalnych fragmentów o długości w zakresie wielkości od 130 do 480 pz. Połączone w reakcji ligacji sondy, a zatem uzyskane na ich matrycy produkty PCR, różnią się między sobą długością, co pozwala na identyfikację poszczególnych badanych *loci*.

! MLPA W ANALIZIE METYLACJI (MS-MLPA)

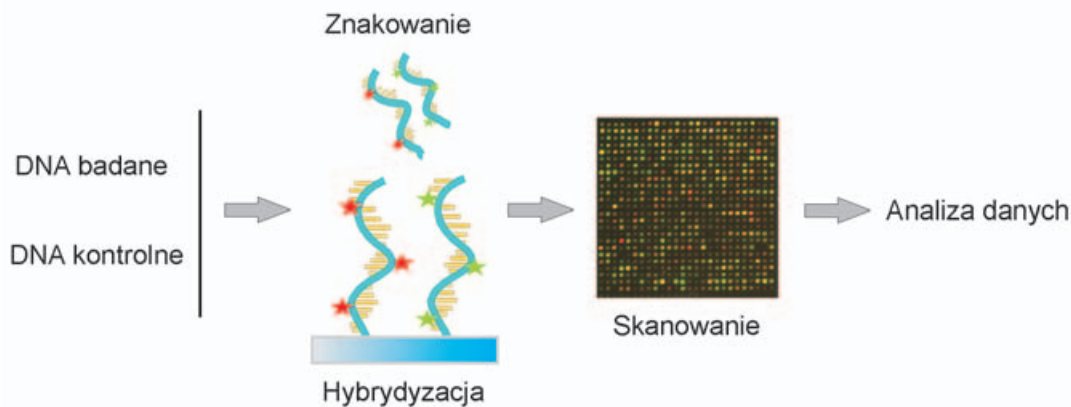
Metoda ta jest wariantem podstawowej techniki MLPA i służy do badania profilu metylacji określonych sekwencji DNA. Wykorzystywana jest więc do analizy zaburzeń tzw. piętna genomowego (ang. *imprinting*) i nieprawidłowej inaktywacji genów związanej z metylacją wysp CpG. Technika MS-MLPA (ang. *methylation-specific MLPA*) jest używana do badania wzoru metylacji m.in. w zespołach Angelmana/Pradera-Willego, Beckwitha-Wiedemanna, a także zmian profilu metylacji genów supresorowych w komórkach nowotworowych. Zasada metody

MS-MLPA jest identyczna z podstawowym MLPA, z jednym wyjątkiem – zastosowania wrażliwej na metylację restryktazy HhaI, rozpoznającej niemetylowaną sekwencję GCGC.

Po etapie hybrydyzacji sond (sondy w tym wypadku muszą być zlokalizowane w miejscach rozpoznawanych przez enzym HhaI) produkt reakcji hybrydyzacji rozdzielany jest na dwie części, w których prowadzone są równoległe dalsze etapy procedury. W pierwszej części prowadzona jest typowa reakcja MLPA, która umożliwia identyfikację ewentualnych zmian liczby kopii badanych sekwencji. W drugiej części zachodzi reakcja ligacji i trawienia enzymem HhaI. Sondy zhybrydowane do niemetylowanych fragmentów DNA są trawione enzymem restrykcyjnym, co uniemożliwia powstanie matrycy dla reakcji PCR i produktu reakcji dla danego *locus*.

! MLPA W ANALIZIE EKSPRESJI (RT-MLPA)

Metoda RT-MLPA (*reverse transcriptase MLPA*) została opracowana do analizy profilu ekspresji genów poprzez analizę poziomu kodowanych przez nie mRNA. Zmiany profilu ekspresji genów odgrywają istotną rolę w rozwoju i różnicowaniu komórek oraz procesach patologicznych (w chwili obecnej dostępne są zestawy sond do badania genów związanych z apoptozą i procesami zapalnymi). W celu zastosowania techniki MLPA do analizy mRNA konieczne było wprowadzenie kilku modyfikacji. Główna z nich to wprowadzenie wstępnego etapu odwrotnej transkrypcji, jako że ligaza używana w MLPA nie łączy dupleksów RNA/DNA. Wprowadzono także specjalny sposób projektowania sond, tak aby były one zlokalizowane w obrębie złączy ekson/ekson. Za- ▶



Rys. 2. Schemat eksperymentu mikromacierzowego z zastosowaniem macierzy CGH – DNA badane i kontrolne znakowane są barwnikami fluorescencyjnymi (Cy3 i Cy5). Następnie obie próbki po zmieszaniu w równych proporcjach hybrydowane są do mikromacierzy. Po hybrydyzacji płytkę odpłukuje się i suszy, a następnie skanuje za pomocą czytnika laserowego. Obraz płytki jest bazą do analizy bioinformatycznej oraz klinicznej weryfikacji otrzymanych wyników

▷ stosowano także normalizację poziomu ekspresji badanych genów w stosunku do genu referencyjnego – genu o ekspresji konstytutywnej.

ANALIZA WYNIKÓW MLPA

Ostatnim etapem każdego typu MLPA jest multipleksowa reakcja PCR, której produkty są następnie rozdzielane z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej (jeden ze starterów wyznakowany jest barwnikiem fluorescencyjnym). Analiza wyników polega na porównaniu wysokości uzyskanych pików lub pola powierzchni pików dla danej sondy w próbce badanej i kontrolnej. Konieczne jest użycie do tego celu odpowiedniego oprogramowania, np. Coffalyser. Net MLPA data analysis software lub GeneMarker. Wyniki zazwyczaj analizowane są z zastosowaniem normalizacji prób badanych względem kontroli prawidłowej, co pozwala na ustalenie wzajemnego stosunku pików (ang. *peak ratio*) pomiędzy próbkami. Jeżeli stosunek zawiera się w granicach 0,7-1,3, to wynik jest prawidłowy. Stosunek powyżej 1,3 wskazuje na duplikację sekwencji badanej, a poniżej 0,7 – na jej delecję. Teoretycznie wzajemny stosunek pików dla duplikacji i delecji w układzie heterozygotycznym powinien wynosić odpowiednio 1,5 i 0,5, jednakże praktycznie uzyskiwane wyniki zawierają się w zakresach 1,3-1,7 i 0,3-0,7.

MLPA – PODSUMOWANIE

Niewątpliwą zaletą metody MLPA są stosunkowo niskie koszty badania, wynikające między innymi z możliwości jednoczesnej analizy w reakcji do 50 sekwencji, przy zastosowaniu 50-200 ng DNA, oraz stosunkowo krótki czas trwania badania.

Wadą tej metody jest natomiast konieczność stosowania zestawów komercyjnych (opracowanie własnych zestawów sond oraz ustawienie nowej aplikacji jest czasochłonne) oraz w badaniach diagnostycznych, w wielu przypadkach, konieczność potwierdzania pozytywnego wyniku inną metodą. Jest to związane między innymi z faktem, że MLPA jest metodą „wrażliwą” na takie czynniki, jak jakość i zanieczyszczenie DNA, które wpływają na ilość końcowego produktu PCR.

Jak wykazały badania walidacyjne przeprowadzone przez EuroGenTest, istotnymi czynnikami zaburzającymi końcowy wynik analizy są stopień zasolenia badanej próbki DNA oraz modyfikacje warunków prowadzenia reakcji w sposób niezgodny z zaleceniami producenta zestawów. Ponadto należy pamiętać, że zestawy MLPA firmy MRC-Holland nie posiadają atestów CE (ang. *CE Marking*), nie wyklucza to jednak ich użycia w laboratoriach diagnostycznych przy zastosowaniu odpowiednich testów weryfikujących badanie.

MIKROMACIERZE DNA

Techniki wykorzystujące wysokorozdzielcze mikromacierze DNA rozpoczęły nową erę w diagnostyce molekularnej, która wcześniej ograniczona była do badania jednego *locus* genowego lub kilku *loci* genowych. Mikromacierze wykorzystywane obecnie w badaniach to najczęściej niewielkie szklane płytki, na które naniesione są zszyntetyzowane sondy oligonukleotydowe. Sondy te są krótkimi fragmentami DNA (60-80 nukleotydów), reprezentującymi wybrane fragmenty genomu lub transkryptomu, do których poprzez hybrydyzację przy-

łączają się komplementarne nici kwasów nukleinowych z badanej próbki. W zależności od rodzaju kwasu nukleinowego wykorzystywanego w badaniu, sposobu przygotowania próbki do analizy czy wreszcie analizowanej informacji wśród zastosowań mikromacierzy mogą się znaleźć: analiza struktury chromosomów, analiza profilu ekspresji genów (tzw. mikromacierze ekspresyjne), analiza epigenetyczna (tzw. mikromacierze metylacyjne) czy genotypowanie (mikromacierze SNP, wykrywające polimorfizmy pojedynczych nukleotydów).

Obecnie w diagnostyce molekularnej mikromacierze najczęściej wykorzystywane są jako narzędzie do wykrywania nie zrównoważonych aberracji chromosomowych odpowiedzialnych za choroby genetyczne (tzw. zespoły chromosomowe). Wykorzystuje się tutaj technikę porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (ang. *array comparative genomic hybridization*, aCGH), która umożliwia identyfikację strukturalnych zmian genomu określanych jako zmiany liczby kopii sekwencji DNA (ang. *copy number variations*, CNVs). Badanie z wykorzystaniem mikromacierzy umożliwia wykrywanie nieprawidłowości w całym genomie człowieka (we wszystkich chromosomach), tzw. delecji (czyli braku) lub duplikacji (czyli podwojenia fragmentów DNA), które ze względu na wielkość nie mogły zostać zidentyfikowane za pomocą klasycznej metody analizy kariotypu. Obecnie produkowane mikromacierze mogą zawierać nawet kilka milionów różnych sond molekularnych na powierzchni płytki o wielkości niespełna 2 cm², co imponująco zwiększa rozdzielczość, z jaką można identyfikować nie zrównoważone aberracje chromosomowe.

Istnieje wiele platform oferujących mikromacierze o różnych rozdzielczościach, dedykowanych do analizy całego genomu lub wybranych regionów chromosomowych. Produkuje się także macierze multipleksowe – na jednej płytce znajduje się kilka/kilkanaście osobnych mikromacierzy, co umożliwia analizę do 12 pacjentów równocześnie i znacząco przyspiesza proces diagnostyczny, jak również redukuje jego koszty. Możliwe jest także, poza wykorzystaniem macierzy dostępnych komercyjnie, przygotowanie macierzy na zamówienie. Na macierzach tych można projektować dodatkowe zagęszczenie sond w interesujących regionach genomu, gdzie zlokalizowane są geny czy też sekwencje regulacyjne związane z określonymi jednostkami chorobowymi.

Metoda aCGH polega na hybrydyzacji dwóch genomowych DNA, badanego i referencyjnego (kontrolnego), wyznakowanych dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (najczęściej stosowane są barwniki cyjanowe Cy3 – zielony i Cy5 – czerwony), zmieszanych w proporcji 1:1, do mikromacierzy. W trakcie hybrydyzacji cząsteczki wyznakowanego DNA wiążą się do komplementarnych sond unieruchomionych na płytce. Proces ten trwa kilkanaście godzin, po czym odpływane są niesparowane lub sparowane niespecyficzne fragmenty DNA. Tak przygotowana macierz skanowana jest w specjalnym wysokorozdzielczym skanerze, który odczytuje sygnał z wzbudzonych laserowym światłem fluorochromów związanych z badanym i kontrolnym DNA. Intensywność sygnału dla poszczególnych sond jest wprost proporcjonalna do ilości DNA o danej sekwencji w próbce badanej lub kontrolnej. Odchylenia od prawidłowego stosunku intensywności fluorescencji obu sygnałów względem siebie wskazują na obecność zmian liczby kopii sekwencji DNA (ang. CNV) – delecji lub duplikacji w badanym regionie chromosomu.

Ocena pod kątem obecności ewentualnych CNV wymaga oczywiście szczegółowej komputerowej analizy uzyskanych danych liczbowych – natężeń fluorescencji we wszystkich punktach płytki. Uzyskane w procesie skanowania mikromacierzy surowe dane liczbowe poddaje się procesowi korekty tła, normalizacji i sumaryzacji. Podstawowym celem normalizacji jest niwelacja tej części sygnału, która jest efektem niedoskonałości technicznych metody, takich jak nierównomierne od-

mięcie poszczególnych regionów macierzy, różnice w natężeniu sygnału emitowanego przez barwniki fluorescencyjne czy też różnice w wydajności znakowania kolejnych próbek DNA. Wykrywanie błędów ułatwia sama konstrukcja mikromacierzy, polegająca na umieszczeniu wielu powtórzeń tej samej sondy w różnych miejscach. Sumaryzacja stanowi sumowanie wartości intensywności fluorescencji sygnałów pochodzących od zestawu sond specyficznych dla określonego *locus*. Analiza komputerowa prowadzona jest z wykorzystaniem programów (np. Deva, CytoSure™ Interpret Software), które umożliwiają nie tylko analizę surowych danych, lecz również identyfikują automatycznie geny i/lub eksony i umożliwiają powiązanie stwierdzonej aberracji chromosomowej z konkretnymi jednostkami chorobowymi.

Zmiany liczby kopii sekwencji DNA (CNVs) są szczególnie istotne w przypadku genów wrażliwych na dawkę, gdyż mogą zaburzać ich ekspresję, prowadząc do powstania choroby. Jednocześnie nie wszystkie zmiany liczby kopii sekwencji DNA mają charakter patogenny. Dlatego też analiza wyników uzyskanych z wykorzystaniem techniki mikromacierzy wymaga użycia specjalnych baz danych (np. DECIPHER, ISCA, Database of Genomic Variants), w których katalogowane są patogenne i łagodne delecje oraz duplikacje genów i/lub regionów chromosomowych. Bazy te ułatwiają interpretację wyników, w tym powiązanie zidentyfikowanej aberracji chromosomowej z określonym fenotypem. Mikromacierze aCGH stosowane są obecnie do identyfikacji niezrównoważenia genomu w szeroko pojętej klinicznej diagnostyce molekularnej – w niepełnosprawności intelektualnej, autyzmie, zespołach wad wrodzonych, a także w diagnostyce onkologicznej. Ocenia się, że dzięki zastosowaniu mikromacierzy całogenomowych możliwa stała się identyfikacja delecji oraz duplikacji chromosomów u około 12-15% chorych z niepełnosprawnością intelektualną, cechami dysmorfii i/lub wrodzonymi wadami rozwojowymi, które nie zostały wykryte podczas badania standardowymi metodami oceny kariotypu.

Wysoka rozdzielczość metody i możliwość analizy całego genomu w jednym badaniu to główne zalety techniki mikromacierzy, które sprawiają, że coraz więcej

laboratoriów genetycznych wprowadza ją do rutynowych procedur diagnostycznych. Wadą metody jest natomiast brak możliwości wykrycia zmian zrównoważonych, takich jak inwersje, translokacje zrównoważone czy ploidia całego genomu, które wymagają innych metod analizy (np. analiza kariotypu). Mimo tej wady technika porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy jest obecnie rekomendowana jako test pierwszego wyboru w badaniu aberracji chromosomowych.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej i w pierwszej części artykułu metody molekularne są stosowane w diagnostyce i badaniach naukowych dotyczących chorób genetycznych uwarunkowanych, chociaż na pewno nie obejmują wszystkich dostępnych metod. Należy pamiętać, że specyfika badań genetycznych wymusza pewien określony sposób postępowania w kontaktach z pacjentem lub jego rodzicami/opiekunami prawnymi. Wynika to w dużej mierze z faktu, że badanie molekularne w przypadku podejrzenia choroby genetycznej uwarunkowanej wykonywane jest raz w życiu pacjenta, a jego wynik ma implikacje kliniczne oraz stanowi podstawę do uzyskania odpowiedniej opieki lekarskiej, w tym poradnictwa genetycznego dla pacjenta, jego rodziców i krewnych. Stąd też wykonanie badań molekularnych nie jest możliwe bez uprzedniego wypełnienia i podpisania deklaracji świadomej zgody na wykonanie badań genetycznych. Ponadto wynik badania genetycznego powinien zostać skonsultowany i omówiony z lekarzem specjalistą w zakresie genetyki klinicznej w trakcie tzw. porady genetycznej, która umożliwia wyjaśnienie wszelkich wątpliwości dotyczących zarówno procedury diagnostycznej, jak i otrzymanego wyniku analizy DNA. Jednocześnie ze względu na specyfikę badania personel laboratorium powinien dołożyć wszelkich starań, aby wynik badania był wiarygodny (np. stosowanie kontroli negatywnych i pozytywnych w trakcie badania, poddawanie się testom kontroli jakości organizowanym przez ośrodki zewnętrzne), a samo badanie – wykonane rzetelnie, z zastosowaniem dobrej praktyki laboratoryjnej. □

Piśmiennictwo dostępne na stronie
www.laboratorium.elamed.pl