

Molekulárně patologické profilování vybraných nádorů centrálního nervového systému metodou MLPA

Iva Dolinová¹, Eliška Tvrzníková¹, Veronika Janoušková¹, Aleš Vícha², Lenka Krsková³, Tomáš Jirásek⁴

¹ Oddělení molekulární genetiky a diagnostiky, Centrum PATOS, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

² Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

³ Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

⁴ Oddělení patologie, Centrum PATOS, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

SOUHRN

Současný trend a zvyšující se znalosti o genetických příčinách vzniku a progresi zhoubných nádorů otevírá nové možnosti pro jejich léčbu. Nicméně je nutné výsledky získané pomocí klasických metod spojit s citlivými, molekulárně patologickými metodami. Metodou, která splňuje požadovaná kritéria, je multiplexní na ligaci závislá PCR reakce (MLPA) založená na multiplexní PCR reakci. Touto metodou jsou detekovány jak změny v počtu kopií genu, tak i metylační status DNA ve specifických oblastech a v neposlední řadě i bodové mutace. MLPA reakce je použitelná i na vysoce fragmentované DNA. Zároveň se jedná o metodu robustní, kterou lze provádět na standardních termocyklerech, fluorescenční značení vyžaduje analýzu pomocí automatického sekvenátoru. V jedné reakci lze testovat až 50 genetických markerů, což je počet, který umožňuje diagnostický a prognostický závěr. Všechny tyto vlastnosti vedou k rutinnímu využití MLPA analýzy nejen při diagnostice, ale i ve výzkumu nádorů. Předkládaný článek si klade za cíl popsat jednotlivé typy MLPA reakcí, její výhody, ale i potenciální úskalí.

Klíčová slova: MLPA – PCR – nádory centrálního nervového systému – molekulární patologie

Molecular pathological profiling of selected tumors of the central nervous system using the MLPA method

SUMMARY

The current progress and increasing knowledge about the genetic causes of cancer opens up new possibilities for its treatment. However, it is necessary to combine the results obtained using classical pathological methods with sensitive, multiplex molecular pathological methods. The method that meets the required criteria is MLPA based on multiplex PCR reaction. This method detects both changes in gene copy number and DNA methylation and, last but not least, point mutations. The MLPA reaction is applicable to even highly fragmented DNA. At the same time, it is a robust method that can be performed on standard thermocyclers, the fluorescent tip label requires automatic sequencers. Up to 50 genetic markers can be tested in one reaction, a number that allows a diagnostic and prognostic conclusion. All these features lead to the routine use of MLPA analysis not only in diagnosis but also in cancer research. The present article aims to summarize the different types of MLPA reactions, its benefits, but also the potential pitfalls.

Keywords: MLPA – PCR – Tumors of the central nervous system – Molecular pathology

Cesk Patol 2022; 58(3): 139–150

Metoda multiplexní na ligaci závislé PCR (MLPA) byla vyvinutá firmou MRC-Holland a poprvé popsána v roce 2002 (1). Původním záměrem metody bylo sledovat změny v počtu kopií segmentů DNA, takzvaných CNV Copy Number Variation (CNV), tedy delece nebo naopak duplikace v sekvenci DNA. Později MLPA analýza umožnila, za pomoci metylačně senzitivního restriktivního enzymu, charakterizovat míru metylace ve sledovaných oblastech. Pomocí MLPA reakce lze také detekovat vybrané bodové mutace.

Metoda MLPA je založena na principu PCR. Amplifikován ale není sledovaný úsek DNA, nýbrž sondy, které do cílových sekvencí hybridizují. Specifita reakce je zajištěna použitím dvou sond. V jedné reakci je možné analyzovat signál až 50 sond najednou. Sondy hybridizují do specifických oblastí genů roz-

místěných po celém genomu, v závislosti na konkrétním panelu vyšetření. Jednotlivé sondy detekují oblasti 50–100 nukleotidů dlouhé, což umožňuje využití této metody i na vysoce fragmentovanou DNA. Zároveň tato vlastnost umožňuje detekci malých delecí, které mohou často zasahovat jednotlivé exony vyšetřovaných genů (1). Touto metodou lze tedy vyšetřit celé spektrum markerů, od genetických predispozic k dědičným onemocněním až po profilování nádorů. Firma MRC-Holland nabízí více než 400 panelů pro specifická vyšetření genetických změn.

Předkládaný článek vychází z review autorů Hömig-Hölzel a Savola z roku 2012 (2).

MLPA V PĚTI KROCÍCH

Průběh MLPA reakce lze rozdělit do pěti samostatných kroků. Prvním krokem je denaturace DNA při teplotě 98 °C, při níž dochází k rozvolnění vodíkových vazeb dvoušroubovice. Druhým krokem je hybridizace neboli navázání sond na specifické úseky genů. Přidávané sondy jsou složeny z několika částí. Vždy obsahují univerzální PCR primer, jehož sekvence se nevyskytuje v lidském genomu. Druhou částí sondy je sekvence specifická ke sledovanému genu. Poslední částí sondy je „stuffer“ sekvence, jejíž

✉ Adresa pro korespondenci:

Mgr. Iva Dolinová, Ph.D.

Oddělení molekulární genetiky a diagnostiky, Centrum PATOS

Husova 357/10, 460 63, Liberec

tel: 485 313 008

e-mail: iva.dolinova@nemlib.cz