

MLPA АНАЛИЗ – ПРИЛОЖЕНИЕ В ДИАГНОСТИЧНАТА ДЕЙНОСТ НА МЕДИЦИНСКИЯ ГЕНЕТИК

Милена Стоянова¹, Мария Левкова¹, Мари Хачмериян¹, Трифон Червенков¹, Миглена Георгиева², Виолета Йотова², Людмила Ангелова¹

¹Катедра по медицинска генетика, МУ-Варна

²Катедра по педиатрия, МУ-Варна

MLPA ANALYSIS - APPLICATION IN THE DIAGNOSTIC ACTIVITY OF THE MEDICAL GENETICIST

Milena Stoyanova¹, Maria Levkova¹, Mari Hachmeriyan¹, Trifon Chervenkov¹, Miglena Georgieva², Violeta Iotova², Lyudmila Angelova¹

¹Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Статията е основно насочена към медици (болнични клиницисти, семейни лекари) без специфичен опит в медицинската генетика, чиито пациенти се презентират с клинична картина на подлежащо вероятно генетично състояние. Представяме същността, възможностите и ограниченията на мултиплексната лигазно зависима амплификация (MLPA) като метод за търсене на генетична диагноза. В статията са описани случаи от опита на Лабораторията по медицинска генетика – Варна в приложението на метода като таргетно и/или скринингово изследване при деца с дисморфични стигми и/или умствено изоставане. Акцентира се на ролята на медицинския генетик при подбора на пациенти, избора на анализ и коментар на резултата.

Ключови думи: MLPA, медикогенетична консултация, генетичен анализ, генетичен синдром

УВОД

Вариантите в броя копия (CNV) се определят като намножаване или загуба на участък от ДНК, отнесено към референтния човешки геном. Хромозомните микроделеции и микродупликации съставляват малка част от тях. Те могат да варират по размер от килобаза до няколко мегабази

ABSTRACT

The article is mainly focused on physicians (hospital clinicians, family doctors) without specific experience in medical genetics, whose patients present with a probable genetic condition. We present the essence, possibilities and limitations of multiplex ligase-dependent amplification (MLPA) as a method for establishing a genetic diagnosis. The article describes cases from the experience of the Laboratory of Medical Genetics, Varna in the application of the method as a target and/or screening test in children with dysmorphic features and/or mental retardation. We emphasize on the role of the medical geneticist in patient selection, the choice of analysis, and comment on the results.

Keywords: MLPA, genetic counselling, genetic analysis, genetic syndrome

или дори цяла хромозома, съответно да включват нула, един или множество гени. Играят роля като източник на генетично разнообразие в човешката ДНК, но имат и отношение към голям брой генетични състояния (5). Възможността за анализ с помощта на хромозомни микрочипове води до бързо повишаване на общия брой позна-

ти CNV, откривайки нови микроделеции и микродупликации, свързани с генетични заболявания (4).

Мултиплексната лигазно зависима амплификация (MLPA) е метод, който може да бъде предложен като анализ в случаите на клинично заподозрени микроделеционни/дупликационни синдроми. Той също така би бил полезен при селектирана група от пациенти, давайки възможност за изключване на някои по-чести диагнози. Въпреки че те имат познат фенотип, той често е вариабелен, възраст-зависим и може да остане клинично неразкрит. Това, заедно с финансовата достъпност на метода, определя MLPA анализа като подходящ за таргетно/скринингово изследване (1).

Широко застъпена част от дейността на специалистите по медицинска генетика е провеждането на медикогенетична консултация при деца с вродени аномалии, дисморфични стигми и/или изоставане в нервно-психичното развитие (НПР), при които няма точна генетична диагноза. Извън това, че в редица случаи се касае за състояния с неуточнена етиология, допълнителна трудност представляват ограничените диагностични възможности на рутинно прилаганите в нашата страна анализи, както и затрудненият достъп до по-високорезолутивни генетични изследвания.

Целта на настоящето проучване е да представи опита на Лабораторията по медицинска генетика, Варна, с приложението на този метод, неговите предимства и недостатъци и откритата патология в хода на проведения MLPA анализ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

MLPA анализ – описание на метода

MLPA анализът е един от молекулярно-генетичните методи, които могат да се използват за доказване на микроделеционни/дупликационни синдроми. Той представлява полуколичествена, неавтоматизирана техника, която се използва за определяне на относителния брой копия (до 60) в единична мултиплексна PCR базирана реакция. Основава се на едновременна амплификация на до 60 сонди, всяка от които открива специфична ДНК последователност с дължина приблизително 60 нуклеотида. След първоначална денатурация на изследваната ДНК, смес от сонди се добавя към пробата. Всяка от сондите се състои от два олигонуклеотида, които трябва да хибридизират съседни целеви последователности, за да бъдат свързани в една. По време на последваща PCR реакция всички свързани сонди се ам-

плифицират едновременно, използвайки една и съща двойка PCR праймери. В резултат се получават набор от уникални PCR ампликони с дължина между 64-500 нуклеотида. PCR праймерът е флуоресцентно маркиран, което позволява на амплифицираните продукти да се визуализират чрез капилярна електрофореза. Относителната височина на всеки отделен пик от електрофорограмата, в сравнение с относителната височина на пика на сондата от референтни ДНК проби, отразява относителния брой копия на съответната целева последователност. Вариации на MLPA метода могат също така да откриват наличие на единични нуклеотидни полиморфизми и да характеризират ДНК метилационен статус. Анализът на данни се осъществява със софтуера Coffalyser.Net.

Клиничен контингент

Проведен е ретроспективен по документи и проспективен клинично-генетичен анализ при деца с неуточнени генетични състояния с нарушение в нервно-психичното развитие и/или дисморфизъм. Селектирани са общо 54 деца, преминали консултативен кабинет на Лабораторията по медицинска генетика – Варна за период три години. След подписване на информирано съгласие е вземана венозна кръв за екстракция на ДНК, извършена чрез солеви метод. Проби са подложени на MLPA анализ, извършен съгласно препоръките за производителя (SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletion Syndromes-1A и P036 Subtelomers Mix 2B, MRC Holland). Кит P245-1A съдържа 50 специфични сонди за гени, асоциирани с 33 заболявания, кит P036 2B – 41. Електрофорезата се извършва с помощта на генетичен анализатор GeXP Beckman Coulter със стандарт за размер 600 (Sciex). Данните са експортирани и анализирани със специализиран софтуер Coffalyser. За нормализиране на данните са включени 10 референтни ДНК последователности.

Проучването е проведено с разрешение на етичната комисия №83 от 16.05.2019 г.

РЕЗУЛТАТИ

Сред общо 54 пациенти, преминали през кабинета за генетично консултиране, е селектирана група от 19 момчета и 35 момчета на възраст между 2 месеца и 17 години. Според водещия фенотип се оформиха 2 групи:

- деца с водеща клинична изява на множество аномалии и/или дисморфични стигми бяха насочени към анализ за известни по-чести микроделеционни/ми-

кродупликационни синдроми (проведени 41 анализа)

- пациенти с водещо изоставане в нервно-психичното развитие (независимо от наличието/липсата на дисморфизъм) се анализираха за субтеломерни микроделеции и дупликации (проведени 36 анализа).

В резултат на приложения алгоритъм на селективен MLPA анализ са разкрити 5 (9.26%) микроделеционни/микродупликационни аномалии, асоциирани с фенотип, припокриващ се с клинична картина при пациента.

При 3-ма от пациентите изследването е потвърдило клинично подозираната диагноза (синдром на Прадер-Вили, синдром на Волф-Хиршхорн и синдром на ДиДжордж), при 2-ма е спомогнало за разкриване на неочаквана патология (1q44 del и 14q11.2 dup).

Случай 1. Пациент на два месеца с лицев дисморфизъм, хипотония, крипторхизъм и ненаддаване на тегло. MLPA анализът разкрива делеция в регион 15q11.2, синдром на Прадер-Вили.

Случай 2. Пациент на една година с водещи клинични симптоми лицев дисморфизъм хипоспадия, пес еквиноварус, нисък ръст, гърчове и изоставане в НПР. MLPA анализът разкрива делеция в регион 4p16.3, включващ синдром на Волф Хиршхорн.

Случай 3. Пациент на седем месеца с лицев дисморфизъм, хипотония, крипторхизъм и изоставане в НПР. MLPA анализа делеция в регион 22q11.21 – синдром на ДиДжордж.

Случай 4. Пациент на шест години с лицев дисморфизъм, хидроцефалия, пектус каринатум, хиперактивност и стереотипии, леко умствено изоставане и изоставане в НПР. MLPA анализът разкрива делеция в регион 1q44 del – микроделеция 1q44.

Случай 5. Пациент на осем месеца с лицев дисморфизъм, мозъчна аномалия, микропенис, нисък ръст, хипотония, гърчове и изоставане в НПР. MLPA анализът разкрива дупликация в регион 14q11.2 – микродупликация 14q11.2.

ОБСЪЖДАНЕ

Микроделеционните и микродупликационните синдроми се причисляват към редките болести, каквито са в по-големия си процент генетичните състояния. Диагнозата се поставя трудно, често със значително закъснение поради: ниска честота, клинична и генетична хетерогенност. Това е проблем в световен мащаб, като тенденцията за нисък процент диагности-

цирани пациенти се наблюдава и сред преминалите медико-генетична консултация в нашата лаборатория (2).

Изключителната клинично-генетична хетерогенност ги определя като диагностично предизвикателство както за разпознаване на специфичния фенотип, така и за приложението на адекватно генетично изследване. Оптимални резултати биха могли да се достигнат при първоначална насоченост за конкретна нозологична единица или група от състояния със сходна патогенеза и позната молекулярна етиология. Именно генетичният консултант, като част от мултидисциплинарния екип, спомага за ефективното прилагане на наличните генетични анализи (3). Такива например са случаите на потвърдени синдром на Прадер-Вили, синдром на Волф-Хиршхорн и синдром на ДиДжордж с MLPA анализ. Те бяха диагностицирани поради клинично съмнение за специфичен синдром, но генетичното изследване, освен потвърждаващо специфична диагноза на рядък синдром, уточнява и конкретния патогенетичен механизъм, по който възниква нарушението (напр. при микроделеция 15q11.2).

Разкритите 1q44 del и 14q11.2 dup са находки, несвързани с известни често срещани микроделеционни синдроми. Припокриването на клинична картина при съответните пациенти и съобщенията в литературата случаи дава основание за приемане на разкритото преустройство като вероятна патогенетична причина (7), въпреки това е необходимо приложение на потвърждаващ анализ – изследване чрез пробимикс за потвърждение или независима техника. Това се свързва с технологичните възможности на метода – напр. отклонения, открити от една сонда, какъвто е случаят при други пет проби от изследваните пациенти (dupl. 15q11.2, del 22q11.21, dupl. 12p, del 22q13.33 и del 22q). В случаите на възможна делеция това може да се дължи на мутация/полиморфизъм и несвързване на сондата. От друга страна, някои отклонения в броя на копията могат да се дължат на соматични промени. В случай на очевидна хомозиготна делеция електроферограмата трябва да се провери визуално, за да се идентифицира дали сигналът наистина липсва, тъй като липсващи сигнали на сондата могат да се дължат на проблеми с биннинга или слаби сигнали (6).

Подходящ метод за потвърждаване на откритите отклонения с MLPA е комперативната геномна хибридизация с възможност за анализ на целия геном. От друга страна, резултатът от него допълва информацията, получена от MLPA анализа, уточнявайки гените, попадащи в делети-

рания/дуплицирания участък. Познаването на точния регион, ангажиран в преустройството, дава възможност за по-точна генотипно фенотипна корелация.

Диагностичните предизвикателства са свързани както с избора на най-подходящ генетичен тест, така и с ограничени възможности за по-масов достъп до съвременни генетични изследвания. Внедряването на новите лабораторни платформи напр. NGS (секвениране от следващо поколение), в т.ч. и у нас, значително подобряват възможностите за последващи стъпки към диагностично изясняване в пациенти без установено микроделеционно/микродупликационно нарушение чрез изследване на екзомни генни панели и цялоекзомно секвениране. За съжаление, здравните системи в много страни не покриват такъв вид разход. Поради икономически съображения е подходящо да се прилага последователен подход на анализ, въпреки че в повечето случаи методите не са взаимнозаменяеми, а по-скоро се допълват.

Съществено значение има не само адекватността на назначеното генетично изследване като първи метод на избор, но и генотипно-фенотипната корелация и интерпретация на резултата от специалиста генетик при всеки конкретен случай в контекста на сигурна етиологична генетична диагноза. Т.е. освен необходимостта от валидиране на резултата, често се налага и прилагане на комбинация от изследвания.

Предоставянето на пре- и постаналична генетична консултация играе съществена роля при избора на анализ, като коментира възможностите и ограниченията на използваните технологични методи (5). Медицинският генетик предоставя компетентна генетична консултация и осигурява коментар на получените резултати с обсъждане на възможностите за последващо поведение. Липсата на специалист, ангажиран с коментара на резултат от проведен генетичен анализ, може да доведе до объркване и грешна интерпретация, съответно до фалшива сигурност или излишно безпокойство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въпреки напредъка в молекулярно-генетичните методи, все още не съществува анализ, който да осигурява абсолютна успеваемост в поставянето на диагнозата при всеки един изследван пациент. MLPA методът дава възможност за таргетно и/или скринингово изследване на пациенти с дисморфични стигми и/или умствено изоставане. Водеща роля обаче при подбора на па-

циенти и анализа на резултатите има медицинският генетик. Получените резултати ще спомогнат за изграждане на адекватен подход при индексния пациент от лекарите клиницисти, а от друга страна – за генетичната профилактика в семейството при бъдеща бременност. Не на последно място, установяването на конкретна диагноза ще има съществен позитивен психологичен ефект в тези семейства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Laczmańska I, Jakubiak A, Słęzak R, Pesz K, Stembalska A, Laczmański L et al. Multiplex Ligation - dependent Probe Amplification (MLPA) as a screening test in children with developmental defects and intellectual disability of unknown etiology. *Med Wieku Rozwoj* Apr-Jun 2011;15(2):132-9.
2. Martínez F, Caro-Llopis A, Roselló M, et al. High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *Journal of Medical Genetics* 2017;54:87-92.
3. Patch C, Middleton A. Genetic counselling in the era of genomic medicine. *Br Med Bull.* 2018 Jun; 126(1): 27–36.
4. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(3): 3245–3276.
5. Watson C, Marques-Bonet T, Sharp A, Mefford H. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014;15:215-244.
6. www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique (последно достъпен на 20.10.2020)
7. www.orpha.net (последно достъпен на 20.10.2020)

Адрес за кореспонденция:

Милена Стоянова
 Катедра по медицинска генетика
 Медицински университет – Варна
 ул. „Марин Дринов“ 55
 Варна, 9002
 e-mail: milena.stoyanova@mu-varna.bg,
 mp.stoyanova@abv.bg