

# Metody stosowane w diagnostyce genetycznej chorób dziedzicznych

Typ zastosowanego testu genetycznego zależy od rodzaju nieprawidłowości, która znajduje się u podstawy danego problemu medycznego. Obecnie dostępne są dwie kategorie testów genetycznych - testy cytogenetyczne, w tym cytogenetyczno-molekularne, oraz testy molekularne. Służą one wykryciu nieprawidłowości w strukturze chromosomu oraz w sekwencji DNA. Aberracje chromosomowe można również określać jako warianty liczby kopii (ang. CNV, Copy-Number Variation), zaś zmiany jednogenowe są wariantami pojedynczego nukleotydu (ang. SNV, Single-Nucleotide Variation). Zgodnie z zasadami amerykańskiej klasyfikacji ACMG/AMP, warianty CNV/SNV dzieli się na warianty patogenne (P, pathogenic) oraz prawdopodobnie patogenne (LP, likely pathogenic), warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym (ang. VUS, Variants of Unknown Significance) oraz warianty łagodne (B, benign) oraz prawdopodobnie łagodne (LB, likely benign). Jedynie warianty patogenne lub prawdopodobnie patogenne mają status mutacji, a zatem ich identyfikacja umożliwia rozpoznanie genetycznej przyczyny choroby.

W praktyce klinicznej, selektywność danego testu genetycznego definiuje jego zdolność do identyfikacji jedynie wybranych CNV/SNV lub oceny wybranych regionów genomu. Zgodnie z tą definicją, żadna ze znanych metod nie oferuje obecnie pełnej analizy genomu, jednak testy nieselektywne są w stanie dokonać jednoczesowej analizy wszystkich chromosomów lub genów.

## 1 Testy cytogenetyczne

Badania cytogenetyczne umożliwiają identyfikację zmian genomu o różnym zakresie - od dużych aberracji chromosomowych liczbowych oraz strukturalnych (cytogenetyka klasyczna) przez strukturalne zmiany submikroskopowe (np. mikrodelecje), do zmian punktowych, dotyczących pojedynczych genów (cytogenetyka molekularna).

### 1.1 Cytogenetyka klasyczna

Badania cytogenetyczne klasyczne polegają na ocenie kariotypu, czyli chromosomów wybarwianych metoda prążkową (najczęściej prążki G). Metoda ta uwidocznia prążkową strukturę chromosomów i umożliwia identyfikację poszczególnych chromosomów oraz rozpoznanie ewentualnych strukturalnych i/lub liczbowych nieprawidłowości - aberracji chromosomowych. Jako materiał do analizy wykorzystywane są płytki metafazalne komórek dzielących się mitotycznie. Analiza kariotypu należy do badań cytogenetycznych nieselektywnych (Tabela 1.1). Polega na mikroskopowej analizie wszystkich chromosomów w celu wykrycia aberracji ilościowych o średniej wielkości 5Mpz (np. w kierunku potwierdzenia

zespołu Downa lub Turnera) oraz aberracji zrównoważonych (np. w kierunku nosicielstwa translokacji chromosomowej w zaburzeniach prokreacji)

## 1.2 Cytogenetyka molekularna

**1.2.1 aCGH** (arrayCGH, Array Comparative Genome Hybridization, porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy) – bardzo czuła (20-200 kb) metoda molekularna, polegająca na kompetycyjnej hybrydyzacji mieszaniny odpowiednio wyznakowanego badanego i referencyjnego DNA do krótkich sond molekularnych (krótkich sekwencji oligonukleotydowych). Metoda wykorzystywana jest głównie do identyfikacji submikroskopowych niezrównoważonych zmian genomu – mikroduplikacji i mikrodelecji (np. w zespole Williama), jednak wykrywa także duże aberracje chromosomowe, w tym monosomie i trisomie. Zestaw sond umieszczony na platformie może pokrywać cały genom. Technika aCGH stosuje się w pierwszej linii w diagnostyce przyczyn niepełnosprawności intelektualnej, autyzmu, zaburzeń neurorozwojowych i/lub wad wrodzonych. Metoda aCGH może być wykorzystywana także w diagnostyce prenatalnej płodów, u których stwierdzono nieprawidłowości w badaniu ultrasonograficznym. Macierze całogenomowe nie mają zastosowania do identyfikacji aberracji zrównoważonych (łącznie ze zmianami obejmującymi heterochromatynę), dodatkowych małych chromosomów markerowych, wariantów nukleotydowych i badania mozaicyzmu poniżej 10%. Technika aCGH należy do nieselektywnych metod cytogenetyki molekularnej (Tabela 1.1).

Innym rodzajem macierzy są macierze pojedynczego nukleotydu (ang. SNP, Single-Nucleotide Polymorphism), dedykowane do wykrywania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Umożliwiają one nie tylko detekcję CNV, ale również mogą identyfikować utratę heterozygotyczności, mutacje punktowe oraz disomię jednorodzicielską (ang. UPD, UniParental Disomy).

**1.2.1. FISH** (Fluorescentce In situ Hybridization, fluorescencyjna hybrydyzacja in situ) jest molekularną techniką cytogenetyczną, pozwalającą na identyfikację znanych aberracji chromosomowych, mniejszych niż 5Mb (rozdzielczość ok. 100 kb). Wykorzystuje ona specyficzne, znakowane fluorescencyjnie sondy molekularne, o sekwencji komplementarnej do sekwencji badanego regionu. Sondy mogą być dedykowane do całych chromosomów (tzw. sondy malujące), do centromerów lub telomerów, do regionów subtelomerowych, konkretnych regionów chromosomu lub unikalnych loci genowych.

Metodą FISH z sondami dedykowanymi wykrywane są przede wszystkim określone niezrównoważone zmiany genomu (delecje, mikrodelecje, addycje, aneuploidie). Przy

odpowiednio dobranych sondach, można analizować także niektóre zmiany zrównoważone, takie jak translokacje. FISH często jest uzupełnieniem badań metodami cytogenetyki klasycznej i, tym samym, najczęściej wykorzystywana jest jako technika selektywna (Tabela 1.1)

**1.2.2. MLPA** (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) – metoda molekularna wykorzystująca reakcję ligacji i multipleksową łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) do identyfikacji znanych zmian liczby kopii (delecji i duplikacji) oraz oceny statusu metylacji. MLPA służy do wykrywania sondami dedykowanymi określonych najczęstszych aneuploidii, mikrodelecji lub mikroduplikacji w znanych zespołach (MLPA mikrodelecyjne/mikroduplikacyjne, np. w zespole DiGeorge'a), identyfikacji wariantów nukleotydowych i polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), oceny regionów subtelomerowych (MLPA subtelomerowe, np. w zespole delecji 5p), badania chromosomów markerowych, oraz oceny statusu metylacji regionów promotorowych lub podlegających imprintingowi (MLPA metylacyjne, np. w zespole Pradera-Willego). Mimo że w badaniu MLPA można, podobnie jak w technice FISH,

jednocześnie analizować do kilku-kilkudziesięciu loci chromosomowych, uznaje się tę metodę za selektywną (Tabela 1.1)

Tabela 1.1 Rodzaje testów cytogenetycznych, w tym cytogenetyczno-molekularnych, stosowanych w celu identyfikacji wariantów CNV

RODZAJ TESTU	SELEKTYWNOŚĆ	OCENA W KIERUNKU	PRZYKŁADY
Badanie kariotypu	nie	aberracji chromosomowej niezrównoważonej o średniej wielkości $\geq$ 5Mpz lub aberracji zrównoważonej	zespół Downa, zespół Turnera, zespół delecji 4p, 5p (nie wszystkie przypadki), translokacje robertsonowskie, niepowodzenia prokreacji
aCGH	nie	mikroaberracji oraz aberracji chromosomowej (mikro-/delecje lub mikro-/duplikacje)	zespół DiGeorge'a, zespół Williamsa, zespół Downa, zespół Turnera, zespół delecji 4p, 5p (wszystkie przypadki),
FISH	tak	najczęściej tylko wybranego regionu chromosomowego	zespół DiGeorge'a, zespół Williamsa, zespół delecji 4p, 5p (wszystkie przypadki), potwierdzenie/wykluczenie u obojga rodziców obecności lub nosicielstwa znanej aberracji występującej u ich dziecka
MLPA	tak	najczęściej kilku-kilkudziesięciu wybranych regionów chromosomowych (gotowe zestawy służące rozpoznaniu częstszych aberracji)	zespół DiGeorge'a, zespół Williamsa, zespół delecji 4p, 5p (wszystkie przypadki), potwierdzenie/wykluczenie u obojga rodziców obecności znanej aberracji występującej u ich dziecka

## 2. Testy molekularne

Analizy molekularne umożliwiają identyfikację zmian pojedynczego nukleotydu i służą wykrywaniu genetycznych przyczyn chorób monogenowych. Najczęściej przed wykonaniem analizy ocenia się jakość DNA, które ma zostać poddane analizie oraz przeprowadza się reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR), dzięki której otrzymuje się wystarczającą ilość badanego DNA.

## 2.1 Sekwencjonowanie metodą Sanger (Sanger Sequencing)

metoda molekularna wykorzystująca reakcję syntezy DNA z udziałem polimerazy. W jej przebiegu w syntetyzowaną nić DNA wbudowywane są znakowane nukleotydy. Metoda Sanger służy wykrywaniu wariantów typu SNV pojedynczego genu i znajduje zastosowanie w diagnostyce wybranych fragmentów określonych genów lub całych genów. Analizy metodą Sanger należą do testów selektywnych (Tabela 2.1).

## 2.2 Hybrydyzacja metodą Southern (Southern blot)

metoda molekularna polegająca na hybrydyzacji sond molekularnych do wybranych fragmentów DNA oraz odpowiednim odczytaniu wyznakowanego DNA. Metoda Southern znajduje obecnie zastosowanie w diagnostyce niektórych chorób jednogenowych, w tym spowodowanych ekspansją motywów trójnukleotydowych (np. w zespole łamliwego chromosomu X). Jest to technika selektywna (Tabela 2.1).

## 2.3 Ilościowe PCR z zastosowaniem specyficznych sond (qPCR)

Dzięki zastosowaniu sond typu w sprzężeniu z techniką PCR możliwe jest m.in. genotypowanie określonych wariantów pojedynczego nukleotydu (SNV). Metoda ta używana jest m.in. w celu wykrywania znanych mutacji w genach predyspozycji do nowotworów (np. w zespole BRCA1). Jest to technika selektywna (Tabela 2.1).

## 2.4 Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. NGS, Next-Generation Sequencing)

technika pozwalająca na analizę w pojedynczym eksperymencie sekwencji DNA o wielkości znacząco przekraczającej 1Mpz. W praktyce oznacza to odczytanie pełnej sekwencji DNA wielu lub nawet wszystkich genów w ramach jednej analizy. Istotnym elementem NGS jest zastosowanie tzw. sekwencjonowania wysokoprzepustowego (ang. Massive Parallel Sequencing), które umożliwia w zminiaturyzowanym eksperymencie analizę wielu tysięcy do milionów cząsteczek DNA. Wydajność takiego procesu jest zatem nieporównywalnie wyższa niż tradycyjnego sekwencjonowania metodą Sanger. Miarą wydajności techniki NGS jest tzw. pokrycie sekwencji DNA, czyli informacja, ile razy dana pozycja nukleotydowa została zsekwencjonowana (odczytana, ang. read) w ramach pojedynczej analizy. Wiarygodny wynik uzyskiwany jest przy minimalnym dwudziestokrotnym (20x) pokryciu co najmniej 80% docelowej sekwencji DNA.

### 2.4.1 Panele NGS

grupują geny, w których warianty patogenne lub prawdopodobnie patogenne stanowią przyczynę choroby/problemu medycznego. Przykładami paneli NGS znajdujących zastosowanie w diagnostyce są panele genów predyspozycji do nowotworzenia lub genów powiązanych etiologicznie z padaczką, zwłaszcza padaczką wczesnoniemowlęcą. Mimo że liczba analizowanych genów jest ograniczona, jest ona jednocześnie reprezentatywna dla danego problemu medycznego, a pokrycie poszczególnych genów lub ich fragmentów może przekroczyć wartość 300-400x. W odniesieniu do określonej grupy/liczby genów w ramach danego problemu medycznego o relatywnej homogenności klinicznej należy uznać tę technikę za selektywną (Tabela 2.1)

## 2.4.2 Sekwencjonowanie całoeksomowe (ang. WES, Whole-Exome Sequencing)

jest to technika pozwalająca na otrzymanie w ramach pojedynczego eksperymentu gotowej sekwencji wszystkich fragmentów kodujących białka (eksom). Warianty sekwencji są następnie analizowane, najczęściej w kontekście danego problemu medycznego. Przykładami zastosowania techniki WES są heterogenne etiologicznie zaburzenia neurorozwojowe oraz wady wrodzone w populacji dziecięcej, gdzie WES uznaje się za metodę diagnostyczną pierwszego rzutu. Pokrycie poszczególnych genów/fragmentów eksomu jest zazwyczaj niższe w porównaniu z pokryciem odpowiednich genów w ramach paneli NGS. W ramach techniki WES coraz częściej dokonuje się również odczytów i analiz CNV. Nie jest to jednak metoda przeznaczona do identyfikacji zaburzeń chromosomowych. WES jest techniką nieselektywną (Tabela 2.1).

## 2.4.3 Sekwencjonowanie całogenomowe (ang. WGS, Whole-Genome Sequencing)

w odróżnieniu od eksomu WGS odczytuje cały genom, a więc pełną sekwencję DNA. Oznacza to kilkadziesiąt do kilkuset razy więcej uzyskiwanych wariantów w porównaniu z techniką WES, z których w ramach WGS część poddawana jest następnie analizie. WGS jest coraz częściej i szerzej wprowadzane do diagnostyki genetycznej, zwłaszcza w tych przypadkach, w których pomimo przeprowadzenia badań WES i aCGH przyczyna genetyczna choroby nie została poznana. Dotyczy to w szczególności noworodków hospitalizowanych w oddziałach intensywnej opieki medycznej oraz dzieci ze złożonym i ciężkim problemem klinicznym.

Tabela 2.1 Rodzaje testów molekularnych stosowanych w diagnostyce chorób jednogenowych

RODZAJ TESTU	SELEKTYWNOŚĆ	OCENA W KIERUNKU	PRZYKŁADY
Sekwencjonowanie metodą Sangera	tak	choroby pojedynczego genu	zespół Marfana, neurofibromatoza typu I
Hybrydyzacja metodą Southerna	tak	ekspansji trójnukleotydowych	zespół łamliwego chromosomu X
Ilościowe PCR z zastosowaniem sond TaqMan	tak	określonych wariantów pojedynczego genu	zespół BRCA1
Panel NGS	tak	grupy genów powiązanych z chorobą/problemem medycznym	zespół Kabuki, zespół Cornelli de Lange, padaczka wczesnoniemowlęca, predyspozycja do nowotworzenia
WES (sekwencjonowanie całoeksomowe)	nie	Sekwencji-kodujących wszystkich genów	fenotypy o znacznej heterogenności genetycznej i klinicznej, zaburzenia neurorozwojowe, wrodzone wady rozwojowe, nowe jednostki chorobowe

WGS (sekwencjonowanie genomowe)	nie	całego DNA,	przypadki prawidłowych wyników badania WES/aCGH i/lub po wyczerpaniu dotychczasowych opcji diagnostycznych, w tym w populacji noworodkowo- niemowlęcej i wczesnodziecięcej
---------------------------------------	-----	-------------	---

---

Źródło strony:

<http://choroby rzadkie.gov.pl/edukacja/metody-stosowane-w-diagnostyce-genetycznej-chorob-dziedzicznych>