

# Primjena MLPA metode u molekularnoj dijagnostici Lynch sindroma

---

**Vodolšak, Ema**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:898662>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ema Vodolšak**

**Primjena MLPA metode u molekularnoj  
dijagnostici Lynch sindroma**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr.sc. Ivane Rako.

*Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Dunji Rogić na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem dr.sc. Ivani Rako na pruženoj pomoći i uloženom trudu pri izradi ovog rada. Hvala na prenesenom znanju i svim savjetima.*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima Mariu i Andreji, sestri Magdi i zaručniku Daniju na brizi, razumijevanju i potpori koju su mi pružali tijekom studiranja. Hvala baki i djedu i pokojnoj baki Štefici što su uvijek našli prave riječi ohrabrenja prije polaganja ispita.*

*Hvala svim kolegama i prijateljima koji su studiranje učinili jednim predivnim, nezaboravnim iskustvom.*

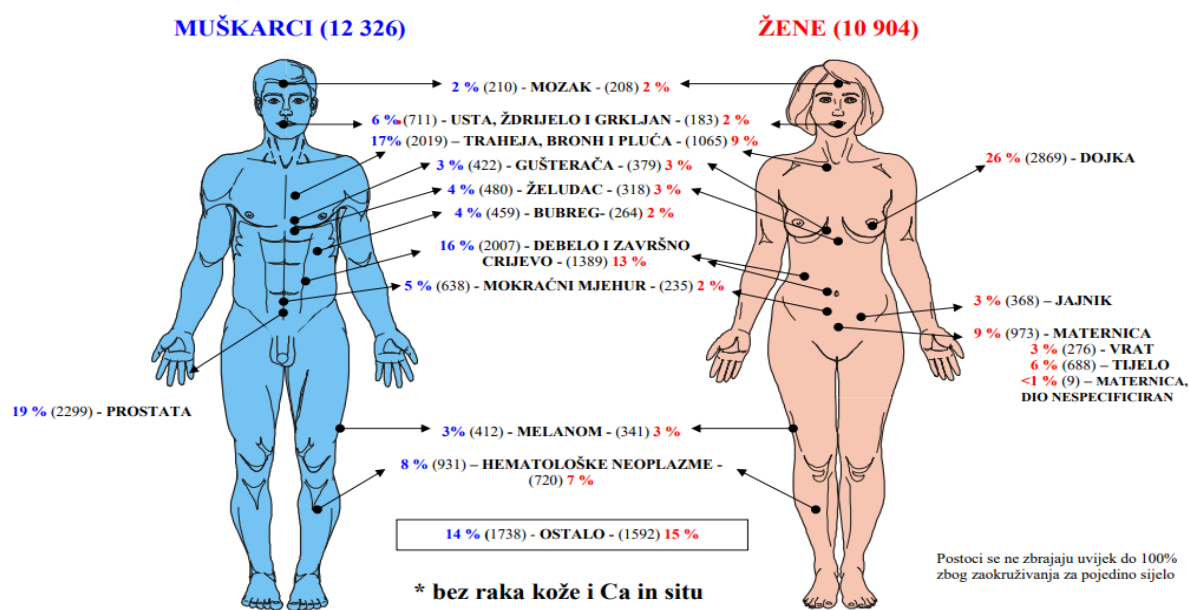
# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 Lynch sindrom .....	1
1.2 Sustav popravka krivo sparenih baza u molekuli DNA .....	6
1.3 Dijagnostika Lynch sindroma.....	8
1.3.1 Klinička dijagnoza.....	8
1.3.2 Imunohistokemijsko i MSI testiranje.....	10
1.3.3 Molekularno testiranje .....	11
1.4 MLPA metoda.....	12
1.4.1 Dizajn i izrada specifičnih sondi .....	14
1.4.2 Primjena MLPA metode .....	15
1.4.3 Prednosti i nedostaci MLPA metode .....	15
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>17</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE.....</b>	<b>18</b>
3.1 Ispitanici .....	18
3.2 Potrebna oprema i reagensi.....	18
3.3 MLPA protokol.....	19
3.4 Priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu .....	19
3.5 Analiza podataka i interpretacija rezultata MLPA.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
4.1 Rezultati.....	28
4.2 Rasprava .....	32
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>36</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....</b>	<b>37</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>38</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>41</b>

# 1. UVOD

## 1.1 Lynch sindrom

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih tumora (Sobocinska i sur., 2020). U Nacionalnom strateškom okviru protiv raka do 2030. navedeno je kako je „broj oboljelih od raka u stalnom porastu i nažalost, rak je jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u Republici Hrvatskoj“ (NN/141/2020). Također navode kako je „najčešći oblik raka kod muškaraca od 2016. godine rak prostate (do tada je bio rak pluća), dok je kod žena najčešći rak dojke. Pet najčešćih sijela odgovorno je za više od polovice svih slučajeva raka kod oba spola“ (NN/141/2020). Pojavnost raka u Hrvatskoj prati i proučava Registar za rak Republike Hrvatske, populacijski registar pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo. Slika 1. prikazuje raspodjelu novooboljelih od raka prema sijelima u 2020. godini za muškarce i žene. Prema učestalosti pojave, CRC je kod muškaraca na 3. mjestu, a kod žena na 2. mjestu (HZJZ-Bilten 45, 2022).



**Slika 1.** Raspodjela novooboljelih od raka prema sijelima u 2020. godini (preuzeto iz Registra za rak Republike Hrvatske, 2022)

Sa stajališta nasljeđivanja razlikujemo sporadični, obiteljski i nasljedni oblik raka (Liccardo i sur., 2017). Većina se pojavljuje sporadično (75-80%). Oni su posljedica stečenih genetičkih promjena, odnosno somatskih mutacija. Oko 20-25% su obiteljski karcinomi što znači da se često pojavljuju i nakupljaju u obiteljima zbog različitih uzroka koji mogu biti djelomično

genetički, ali i zbog utjecaja vanjskih faktora i načina života. Svega 5% su nasljedni karcinomi što znači da se nasljeđuju unutar obitelji zbog različitih genetičkih promjena, odnosno mutacija koje se prenose s roditelja na potomstvo (Kapitanović, 2017.) Upravo genetski opterećeni pojedinci, u sklopu raznih nasljednih sindroma raka (Lynch sindrom – LS, obiteljska adenomatozna polipoza - FAP i dr.), nose znatno veći rizik za razvoj raka u odnosu na rizik u općoj populaciji (Liccardo i sur., 2017). Brojni su čimbenici rizika nastanka i razvoja malignih bolesti, od obiteljske anamneze i genetske predispozicije, do različitih čimbenika povezanih sa stilom života (NN/141/2020). Prepoznavanje gena koji pridonose povećanom riziku olakšava procjenu rizika za razvoj karcinoma (Liccardo i sur., 2017).

Lynch sindrom jedan je od najčešćih nasljednih sindroma kolorektalnog karcinoma s pojavnošću od 3-4% među svim nasljednim sindroma raka (Giardiello i sur., 2014). Sve do 1984. godine, terminom „*hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC)*“ označavali su se sindromi kod pacijenata kod kojih je primijećeno obiteljsko pojavljivanje CRC-a, a kod kojih je isključena obiteljska polipoza, odnosno FAP (Giardiello i sur., 2014). Međutim, kako osim povećanog rizika od razvoja nepolipoznog oblika CRC-a, pojedinci u sklopu Lynch sindroma imaju znatno povećan rizik za razvoj čitavog spektra karcinoma izvan debelog crijeva (primjerice karcinoma endometrija, jajnika, dojke, urotelijalnog karcinoma i dr.), termin HNPCC nedostatan označava pacijentovo stanje i danas se više ne primjenjuje. U Lynch sindromu CRC je najčešće lokaliziran desno, česte su pojave metakronih i sinkronih kolorektalnih karcinoma, karcinogeneza je ubrzana, a tumori su slabo diferencirani s limfocitnom infiltracijom i upalnom reakcijom (Liccardo i sur., 2017).

Pojedinci u sklopu Lynch sindroma nose nasljednu mutaciju (eng. *germline mutation*) u jednom od tumor-supresorskih gena - MMR gena (eng. *mismatch repair*) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* ili *EPCAM*, što rezultira gubitkom jedne funkcionalne kopije navedenih gena (Sobocinska i sur., 2020). Sama se mutacija nasljeđuje autosomno-dominantno što znači da je za povećanje rizika dovoljno naslijediti jedan alel (jednu kopiju gena) koji nosi mutaciju. Prema tome, u Lynch sindromu se nasljeđuje rizik za nastanak tumora, a ne sama bolest, odnosno karcinom (Duraturo i sur., 2019). Rizik da potomak oboljelog roditelja naslijedi mutirani alel iznosi 50% (Idos i Valle, 2004). U čak 80-90% slučajeva mutacijom su zahvaćeni *MLH1* i *MSH2* geni, dok u preostalih 10-20% slučajeva mutacija zahvaća *MSH6* ili *PMS2* gene. Mutacije *EPCAM* gena su iznimno rijetke i javljaju se u svega 3% slučajeva (Sobocinska i sur., 2020). 3'-delecija terminalnih eksona *EPCAM* gena koji je lociran uzvodno od *MSH2* uzrokuje epigenetsko

utišavanje *MSH2* što onda rezultira tkivno-specifičnim nedostatkom proteina MSH2 (Sehgal i sur., 2014).

Prema podacima InSiGHT baze podataka glavina promjena u MMR genima su točkaste mutacije, a njih slijede velike genomske promjene ([www.insight-database.org](http://www.insight-database.org)). Najčešće točkaste promjene u MMR genima su mutacije krivog smisla (eng. *missense*) gdje supstitucija jednog nukleotida rezultira ugradnjom pogrešne aminokiseline u rastući polipeptidni lanac što uzrokuje promjenu fizikalno-kemijskih svojstava proteina i rezultira njegovom nefunkcionalnošću. Osim njih, prisutne su još i besmislene mutacije (eng. *nonsense*) gdje supstitucija jednog nukleotida dovodi do pojave stop-kodona i skraćivanja polipeptidnog lanca pa je protein opet nefunkcionalan (Bulić-Jakuš i Barišić, ured., 2011). Veliki udio promjena u MMR genima, 20-55% u genu *PMS2*, 10-20% u genu *MLH1*, 20-40% u genu *MSH2* i 0-10% u genu *MSH6*, čine velike genomske promjene (Tablica 1). U genu *EPCAM* velike genomske promjene su jedine promjene do sada zabilježene u literaturi (Idos i Valle, 2004). Upravo zbog prisutnosti različitih genomskih promjena u MMR genima, u dijagnostici Lynch sindroma neophodna je upotreba komplementarnih metoda koje će detektirati sve moguće promjene u genima.

**Tablica 1.** Udio pojedinih promjena u MMR genima (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*) i genu *EPCAM* detektiranih sekvenciranjem i analizom velikih genomskih delecija i duplikacija/insercija (Idos i Valle, 2004)

Gen	Ukupni doprinos patogenih varijanti u određenom genu u patogenezi LS-a	Udio detektiranih patogenih promjena	
		Promjene detektirane sekvenciranjem (točkaste promjene ili male delecije/duplikacije/insercije)	Velike genomske promjene (delecije/duplikacije/insercije)
<i>MLH1</i>	15%-40%	80%-90%	10%-20%
<i>MSH2</i>	20%-40%	60%-80%	20%-40%
<i>MSH6</i>	12%-35%	90%-100%	0%-10%
<i>PMS2</i>	5%-25%	45%-80%	20%-55%
<i>EPCAM</i>	<10%	Nema zabilježenih podataka u literaturi	100%

Sustav za popravak krivo sparenih baza (eng. *mismatch repair, MMR*) nužan je za održavanje stabilnosti i integriteta genoma (Li, 2008). Kod Lynch sindroma, u tumorskim je stanicama spomenuti sustav nefunkcionalan što pridonosi povećanju brzine nastanka novih mutacija, hipermutabilnosti i progresivnosti karcinoma. Pacijenti s Lynch sindromom heterozigotni su nositelji mutacije u nekom od MMR gena. Međutim, za inicijaciju tumorigeneze, u samim tumorskim stanicama obje kopije gena moraju biti disfunkcionalne, odnosno mora se dogoditi druga genetska promjena na drugom, zdravom alelu čime se gubi heterozigotnost (najčešće somatskom, stečenom promjenom) što rezultira potpunim gubitkom ekspresije MMR proteina. Ova je teorija poznata kao Knudsonova hipoteza dvostrukog udara (Giardiello i sur., 2014).

Kada u stanici ne funkcionira MMR, dolazi do nakupljanja mutacija, posebice u mikrosatelitnim područjima DNA. Mikrosatelitna DNA sastoji se od ponavljajućih nukleotidnih parova baza (Bulić-Jakuš i Barišić, ured., 2011). To su kratke ponavljajuće sekvence (eng. *short tandem repeats*) koje se nalaze nasumično po čitavom genomu, a koje su zbog svoje specifične građe izrazito podložne nakupljanju mutacija. Iako je većina mikrosatelitnih sekvenci locirana u nekodirajućim regijama genoma (telomere i centromere), mnogi geni sadrže mikrosatelite i u svojim kodirajućim regijama, a neki od tih gena imaju ključnu ulogu u održavanju staničnog ciklusa. Akumulacija pogrešno ugrađenih i sparenih baza u mikrosatelitnim područjima DNA fenotipski rezultira mikrosatelitnom nestabilnošću (eng. *microsatellite instability, MSI*) (Giardiello i sur., 2014; Sobocinska i sur., 2020). U MMR-deficijentnim tumorskim stanicama duljina mikrosatelitnih nukleotidnih ponavljanja se razlikuje od duljine nukleotidnih ponavljanja iz okolnog zdravog tkiva (Liccardo i sur., 2017). Stoga je MSI jedna od glavnih molekularnih karakteristika nepolipoznog CRC-a u sklopu Lynch sindroma. Kako se preko 90% CRC-a u sklopu LS-a opisuje kao mikrosatelitno nestabilno, može se reći da MSI služi kao pouzdan marker MMR deficijencije (Liccardo i sur., 2017). Navedena se karakteristika u patohistološkom nalazu označava kao MSI-H (eng. *MSI – High*).

Međutim, 10-15% sporadičnih oblika karcinoma također izražava MSI-H fenotip, pa dokazana MSI u tumorskom tkivu ne može potvrditi dijagnozu LS-a, već samo usmjeriti daljnju dijagnostiku prema tome. U sporadičnom je karcinomu MSI posljedica epigenetske promjene, najčešće hipermetilacije *MLH1* genskog promotora (Sobocinska i sur., 2020). Ako su obje kopije gena inaktivirane (bialelna hipermetilacija), funkcija MLH1 je u potpunosti izgubljena. Stoga, u MLH1-deficijentnim MSI tumorima *MLH1* hipermetilacija može poslužiti kako bi se razlikovali sporadični i LS-povezani CRC. Isto tako, specifične aktivirajuće mutacije u

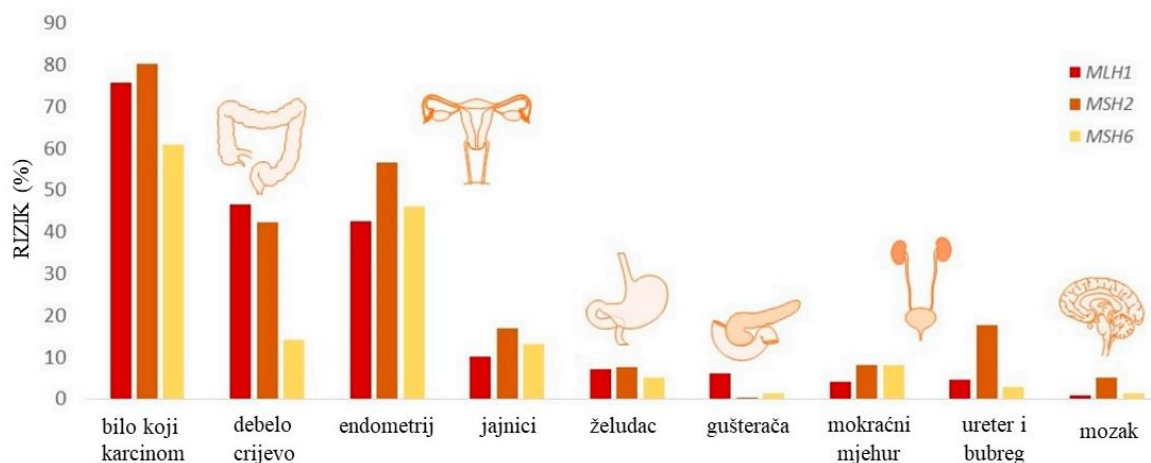


onkogenu *BRAF* mogu poslužiti za razlikovanje sporadičnih slučajeva CRC-a od LS-a. Mutacija krivog smisla (eng. *missense*) u genu *BRAF* V600E detektirana je u 40-87% svih sporadičnih MSI-H tumora i povezana je s metilacijom *MLH1*-promotora u sporadičnom CRC-u (Liccardo i sur., 2017).

Kao što je prethodno spomenuto, u Lynch sindromu se nasljeđuje rizik za razvoj tumora, a ne sama bolest (Duraturo i sur., 2019). Rizik za razvoj CRC-a varira ovisno o spolu i zahvaćenom MMR genu što je prikazano u Tablici 2. (Giardiello i sur., 2014) Osim za CRC, znatno je povećan rizik i za razvoj drugih karcinoma izvan debelog crijeva opet ovisno o zahvaćenom MMR genu i spolu (Giardiello i sur., 2014). Karcinom endometrija (EC) najčešći je karcinom izvan debelog crijeva u sklopu LS-a koji se u žena javlja jednako često kao karcinom debelog crijeva. Tako se rizik za razvoj EC-a kreće između 14-54% kada je mutiran gen *MLH1*, 17-71% kada je mutiran gen *MSH6* i 15% kada je mutiran gen *PMS2*. Rizik za razvoj karcinoma jajnika je nešto niži, 4-20%, i uglavnom se povezuje s mutacijama u genu *MSH2*. Na Slici 2. prikazan je rizik za razvoj pojedinog karcinoma s obzirom na zahvaćeni MMR gen, pri čemu je za sve osim karcinoma jajnika i endometrija, rizik izražen kumulativno za oba spola, a za ova dva navedena samo za ženski spol (Sobocinska i sur., 2020).

**Tablica 2.** Gen-specifični kumulativni rizik za razvoj CRC-a do 70. godine starosti u Lynch sindromu (preuzeto iz Giardiello i sur., 2014)

Gen	Rizik (%)	Prosječna dob pri dijagnozi
---	5,5	69
(Sporadični CRC)		
<i>MLH1/MSH2</i>	M: 27-74 Ž: 22-53	27-46
<i>MSH6</i>	M:22 Ž:10	54-63
<i>PMS2</i>	M: 20 Ž: 15	47-66



**Slika 2.** Rizik za razvoj različitih karcinoma do 75. godine života u Lynch sindromu (preuzeto i prilagođeno iz Sobocinska i sur., 2020.)

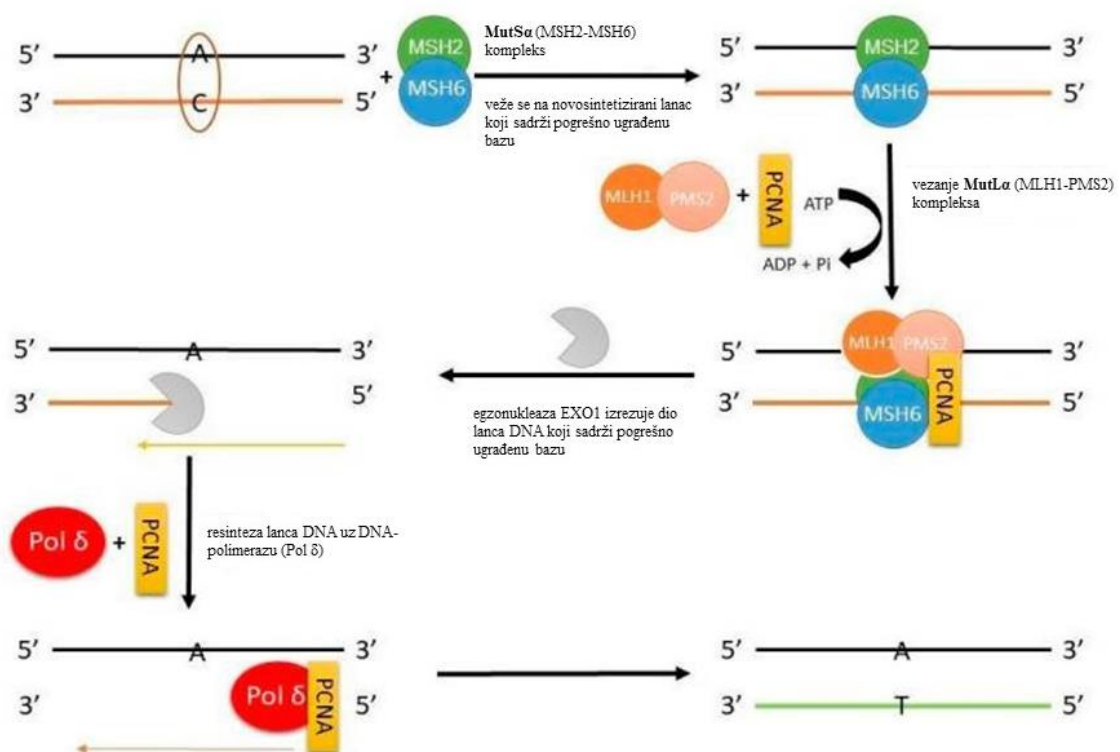
## 1.2 Sustav popravka krivo sparenih baza u molekuli DNA

Sustav popravka krivo sparenih baza u molekuli DNA (MMR sustav) visoko je konzerviran biološki mehanizam neophodan za očuvanje stabilnosti genoma. Tijekom replikacije, rekombinacije ili popravka DNA često se događaju greške. Pogrešno ugrađeni nukleotidi tijekom sinteze DNA generiraju krivo sparivanje baza. Osim toga, stanična je DNA neprestano izložena brojnim egzogenim i endogenim agensima koji ju oštećuju. Nastalo nepopravljeno oštećenje DNA povećava mogućnost nastanka mutacija u somatskim ili zametnim stanicama što posljedično mijenja stanični fenotip i dovodi do stanične disfunkcije. Upravo iz tog razloga stanica posjeduje popravne sustave koji popravljaju oštećenu DNA čime preveniraju pojavu mutacija. Jedan od tih sustava je MMR. MMR sustav je zadužen za popravak krivo ugrađenih baza tijekom replikacije DNA kako bi se spriječio nastanak mutacije u stanici koja se dijeli (Li G., 2008).

Bilo kakva promjena u stanici koja onemogućava funkcioniranje MMR sustava povećava brzinu nastanka mutacija što s vremenom dovodi do nakupljanja mutacija, pa se nefunkcioniranje sustava povezuje s nasljednim i sporadičnim oblicima karcinoma. Dakle, mehanizam popravka krivo sparenih baza ima ključnu ulogu u mutagenezi i tumorigenezi. Spomenuti je sustav izvorno opisan u *E. coli* gdje uključuje tri proteina: MutS, MutL i MutH. Skupina MMR gena ostala je visoko konzervirana u svojoj strukturi i funkciji tijekom evolucije od bakterije do čovjeka te je nakon otkrića bakterijskih i kvašćevih gena za popravak krivo

sparenih baza u DNA uslijedila brza identifikacija prokariotskih homologa u genomu čovjeka (Li G., 2008).

Iako im je ključna biološka uloga zajednička, prokariotski i eukariotski MMR sustav prvenstveno se razlikuju u komponentama samog sustava. U eukariota je taj sustav nešto složeniji i sastoji se od šest strukturnih homologa bakterijskih proteina – MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 i PMS2. hMSH2 u kompleksu sa hMSH6 tvori hMutS $\alpha$  heterodimer, a u interakciji sa hMSH3 tvori hMutS $\beta$ . Oba kompleksa imaju aktivnost ATPaze te igraju ključnu ulogu u prepoznavanju pogrešno sparene baze te u iniciranju popravka. Najmanje su 4 humana MutL homologa poznata – hMLH1, hMLH3, hPMS1 i hPMS2. hMLH1 dimerizira s hPMS2 ili s hPMS1 ili s hMLH3 pri čemu redom nastaju hMutL $\alpha$ , hMutL $\beta$  ili hMutL $\gamma$  kompleks. Humani homolozi bakterijskog MutH do danas još nisu identificirani (Li G., 2008). Shematski prikaz eukariotskog sustava popravka pogrešno sparenih baza prikazan je na Slici 3.



**Slika 3.** Mehaniizam popravka pogrešno sparenih baza u eukariotskoj stanici (preuzeto i prilagođeno iz Sobocinska i sur., 2020)

Četiri su ključna koraka popravka krivo sparenih baza (Martin-Lopez i Fishel, 2013):

1. Prepoznavanje pogrešno ugrađene baze od strane MSH proteina (hMutS $\alpha$ /hMutS $\beta$ )
2. Regrutacija MLH proteina (hMutL $\alpha$ /hMutL $\beta$ /hMutL $\gamma$ ) od strane MSH kompleksa

3. Izrezivanje dijela lanca koji sadrži pogrešno ugrađenu bazu
4. Resinteza nastale praznine uz DNA-polimerazu i DNA-ligazu

Popravak krivo sparenih baza u eukariotskim stanicama iniciran je od strane MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) heterodimera koji prepoznaje pogrešno sparene baze ili male insercije/delecije (do 2 nt) ili od strane MutS $\beta$  (MSH2-MSH3) heterodimera koji prepoznaje veće insercije/delecije (do 16 nt). Mehanizam popravka pogrešno sparenih baza opisan je tzv. teorijom molekularnog prekidača/klizne stezaljke. Sama teorija zamišlja MSH heterodimere kao molekularni prekidač koji isprovociran pogrešno ugrađenom bazom poput G-proteina koristi mehanizam vezanja i izmjene ATP-a (Martin-Lopez i Fishel, 2013). Vezanje ATP-a od strane MSH kompleksa uzrokuje konformacijsku promjenu heterodimera što rezultira formacijom hidroliza-neovisne klizne stezaljke koja slobodno difundira uzduž DNA i kreće se kao matica koja se okreće na vijak. Slijedi vezanje MutL $\alpha$  heterodimera (MLH1-PMS2). PMS2 posjeduje endonukleaznu aktivnost ovisnu o PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) i RFC (eng. *replication factor C*). MutL $\alpha$  odgovoran je za izrezivanje pogrešno ugrađene baze. Nakon prepoznavanja pogrešno ugrađenog nukleotida, dio lanca koji sadrži tu pogrešno ugrađenu bazu se izrezuje pomoću ezgonukleaze, a zatim se nastala praznina popunjava uz polimerazu  $\delta$  i ligazu (Fishel, 2015).

### 1.3 Dijagnostika Lynch sindroma

Za postavljanje dijagnoze LS-a potreban je složen dijagnostički pristup. Prema definiciji, Lynch sindrom uzrokovan je nasljednom mutacijom u nekom od MMR gena ili delecijom terminalnih eksona gena *EPCAM* što dovodi do epigenetskog utišavanja *MSH2*. Iz te definicije proizlazi da nema potvrdne dijagnoze Lynch sindroma bez pronađenih nasljednih mutacija u MMR genima *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* ili *EPCAM*. Pravovremeno postavljanje dijagnoze povećava stopu preživljenja oboljelih, kao i ostalih srodnika koji se testiraju i nadziru (Sobocinska i sur., 2020).

#### 1.3.1 Klinička dijagnoza

Dijagnostički postupak obično započinje identifikacijom pojedinca s povećanim rizikom za rak temeljem pozitivnih obiteljskih anamneza i drugih karakterističnih obilježja nasljednog sindroma raka. Kliničarima mogu poslužiti Amsterdamski kriteriji i revidirane Bethesda

smjernice za postavljenje sumnje na LS i početnu identifikaciju slučajeva (Tablica 3) (Sobocinska i sur., 2020).

*Internacionalna kolaborativna grupa za hereditarni nepolipozni CRC* donijela je 1990. godine Amsterdamske kriterije I za identifikaciju obitelji koje bi bile kandidati za genetičko testiranje. Kriteriji su kasnije dopunjeni uključivanjem karcinoma koji se u sklopu LS-a pojavljuju izvan debelog crijeva (Amsterdamski kriteriji II). Međutim, navedeni kriteriji pokazali su se vrlo restriktivnima što je rezultiralo propuštenom identifikacijom pojedinih nositelja mutacije u MMR genima (Liccardo i sur., 2017). Bethesda revidirane smjernice za testiranje na mikrosatelitnu nestabilnost daju detaljne upute u kojem slučaju testirati pacijenta na MSI (Sobocinska i sur., 2020). Ipak, Amsterdamski kriteriji (I i II) i revidirane Bethesda smjernice nisu uvijek dostatne za identifikaciju pacijenata s LS-om zbog čega nisu u potpunosti implementirane u kliničku praksu. One od kliničara zahtijevaju uzimanje detaljne obiteljske anamneze kako bi identificirali potencijalnog nositelja mutacije (Sehgal i sur., 2014).

**Tablica 3.** Prikaz Amsterdamskih kriterija I, II i revidiranih Bethesda smjernica

<b>Amsterdamski kriteriji I</b>
1. Najmanje 3 srodnika s histološki potvrđenim kolorektalnim karcinomom pri čemu je barem jedan srodnik prvog koljena dvama drugima
2. Najmanje dvije sukcesivne generacije pogođene karcinomom
3. Najmanje jedan srodnik s CRC-om dijagnosticiranim prije 50 godine starosti
4. FAP isključen

<b>Amsterdamski kriteriji II</b>
1. Najmanje 3 srodnika s histološki potvrđenim LS-karcinomom (CRC, endometrij, želudac, jajnik, urotelijalni, tanko crijevo, hepatobilijarni itd.) pri čemu je barem jedan srodnik prvog koljena dvama drugima
2. Najmanje dvije sukcesivne generacije pogođene karcinomom
3. Najmanje jedan LS-karcinom dijagnosticiran prije 50 godine starosti
4. FAP isključen

<b>Revidirane Bethesda smjernice</b>
1. CRC dijagnosticiran prije 50 godine starosti
2. Prisutnost sinkronih i metakronih CRC tumora i drugih LS-povezanih tumora neovisno o starosti
3. MSI-H CRC dijagnosticiran prije 60 godine starosti
4. CRC ili neki drugi LS-karcinom dijagnosticiran prije 50 godine starosti kod barem jednog srodnika prvog koljena

---

5. CRC ili neki drugi LS-karcinom dijagnosticiran neovisno o dobi kod barem 2 srodnika prvog ili drugog koljena

---

Kada pacijent ispunjava Amsterdamske kriterije ili barem jedan kriterij revidiranih Bethesda smjernica, preporučuje se testiranje mikrosatelitne nestabilnosti i/ili imunohistokemijsko bojenje (IHC) ako je tumorsko tkivo dostupno (Sobocinska i sur., 2020). Ipak, danas je sve prihvaćeniji pristup univerzalnog IHC/MSI testiranja svih novo dijagnosticiranih kolorektalnih karcinoma neovisno o ispunjenju kriterija iz smjernica jer je primijećeno da isključivim praćenjem smjernica dosta LS slučajeva može biti propušteno (Giardiello i sur., 2014). Kod pacijenta s MSI-H tumorom ili izgubljenom ekspresijom MMR proteina u tumorskom tkivu, dalje se radi genetičko testiranje u svrhu identifikacije mutacije, odnosno promjene u specifičnom genu koja je uzrokovala MSI ili gubitak ekspresije MMR proteina (Sobocinska i sur., 2020). Genetičkim testiranjem možemo detektirati mutaciju u tumorskom tkivu ili perifernoj krvi. Obzirom da se potvrda dijagnoze LS-a temelji na nasljednoj mutaciji, uzorak izbora je periferna krv. U slučaju identifikacije nasljedne mutacije u nekom od MMR gena dobiveni rezultat može poslužiti za ciljano testiranje članova obitelji u svrhu prevencije razvoja bolesti (Sobocinska i sur., 2020).

### **1.3.2 Imunohistokemijsko i MSI testiranje**

Kod pacijenata oboljelih od CRC-a sa sumnjom na LS prvo se provode testovi na uzorku tumorskog tkiva. U primjeni su dva testa: test na prisustvo MSI metodom PCR (eng. *polymerase chain reaction*) i test na prisustvo/aktivnost proteinskih produkata MMR gena imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko bojenje pokazuje prisustvo ili nedostatak ekspresije specifičnog MMR proteina što onda usmjerava daljnje testiranje na gen koji kodira za protein čija ekspresija u tkivu izostaje. MSI testiranje se temelji na usporedbi duljine mikrosatelitnih ponavljanja DNA u tumorskom tkivu i zdravom ne-tumorskom tkivu koje okružuje tumor. Mikrosatelitna nestabilnost ispituje se PCR amplifikacijom mikrosatelitnih lokusa. Prisutnost amplifikacijskog produkta različite duljine u tumorskom tkivu označava nestabilnost na pojedinom lokusu. Promjena duljine mikrosatelita posljedica je insercije/duplikacije ili delecije u ispitivanoj mikrosatelitnoj sekvenci (Liccardo i sur., 2017).

Nacionalni institut za rak (NCI) još je 1997. godine preporučio korištenje tzv. „Bethesda panela“ za ispitivanje MSI koji se sastoji od 5 mikrosatelitnih lokusa: 2 mononukleotidna

ponavljanja (BAT25, BAT26) i 3 dinukleotidna ponavljanja (D2S123, D17S250, D5S346). Od pet lokusa, dva ili više moraju odudarati da bi se dokazala MSI, odnosno koristi se prag od 30% za testove s više lokusa. Dakle, tumori koji pokazuju nestabilnost na 2 ili više lokusa definiraju se kao MSI-H (eng. *high*), dok se oni s nestabilnošću <30% klasificiraju kao MSI-L (eng. *low*). Ako nema detektirane promjene u mikrosatelitima, onda se radi o mikrosatelitno stabilnim tumorima tj. o mikrosatelitnoj stabilnosti (eng. *microsatellite stable, MSS*). Naknadno, da bi se povećala osjetljivost i specifičnost panela, u testiranje su dodani drugi lokusi. Uz BAT25 i BAT26, dodana su tri nova mononukleotidna ponavljanja – NR21, NR24 i NR27 (Gelsomino i sur., 2016).

Kod interpretacije imunohistokemijskih rezultata treba uzeti u obzir da ekspresija MMR proteina PMS2 i MSH6 ovisi o ekspresiji glavnih komponentni MMR-a – MLH1 i MSH2 - jer stupaju u međusobnu interakciju i tvore heterodimere. Tako je gubitak ekspresije i MSH2 i MSH6 uglavnom povezan s nasljednom mutacijom u genu *MSH2*. Simultani gubitak ekspresije proteina MLH1 i PMS2 može biti rezultat nasljedne mutacije u genu *MLH1* ili stečene somatske hipermetilacije promotora gena *MLH1*. Izolirani gubitak ekspresije proteina MSH6 ili PMS2 obično je posljedica nasljedne mutacije u istoimenim genima (Gelsomino i sur., 2016).

Ukoliko se imunohistokemijski pronade gubitak ekspresije proteina MLH1 i PMS2, prije genetičkog testiranja potrebno je isključiti *BRAF* V600E mutaciju u tumoru ili ispitati metilacijski status *MLH1*-promotora koji također dovode do fenotipa MSI-H tumora, ali mogu se naći isključivo u sporadičnom obliku CRC-a. Kada se pronade spomenuta mutacija u genu *BRAF*, LS se isključuje (Sobocinska i sur., 2020).

### **1.3.3 Molekularno testiranje**

U Nacionalnom strateškom okviru protiv raka do 2030. kao jedna od aktivnosti koja se planira provesti unutar desetogodišnjeg plana je „unaprjeđenje genetskih savjetovališta i genetskog testiranja pojedinaca prema protokolu probira za osobe s posebno visokim rizikom za karcinom debelog crijeva“ (NN/141/2020).

Za potvrdu dijagnoze Lynch sindroma nužno je definirati promjenu u MMR genima. To zahtjeva korištenje nekoliko različitih metoda jer nijedna sama po sebi ne može detektirati sve vrste promjena u MMR/EPCAM genima koje se mogu javiti u LS-u. Uputno je prvo koristiti metodu koja obuhvaća što veći broj gena. Najčešće se koristi sekvenciranje nove generacije korištenjem multigenih panela (eng. *next generation sequencing, NGS*) koje može detektirati

točkaste mutacije, ali i male delecije i insercije/duplikacije u nekoliko stotina gena istovremeno (Sobocinska i sur., 2020). Međutim, ovisno o dostupnom programskom paketu koji se koristi za analizu NGS podataka te poznatih programskih ograničenja, ovom metodom često nije moguće detektirati velike delecije i/ili insercije/duplikacije i strukturne rearanžmane te mutacije u regijama gena koje nisu pokrivena multigenim panelom koji se primjenjuje. Stoga se kao nadopuna koriste druge metode koje će ispitati prisutnost većih promjena u genomu, velikih delecija i insercija/duplikacija, jer upravo takve promjene čine povećani udio (> 20%) svih promjena u MMR genima. Prema Cohenu i sur. (2019) velike delecije čine 22% *MHL1* i *PMS2* mutacija, 26% *MSH2* i oko 7% *MSH6* mutacija.

Kako je u *Nacionalnom okviru* navedeno: „Temeljem rezultata genetičkog testiranja i podataka iz osobne i obiteljske anamneze, procjenjuje se rizik obolijevanja od specifičnog tumora te se, sukladno tome, pacijent upućuje na redovite preventivne preglede ili se poduzimaju preventivne farmakološke, odnosno kirurške intervencije“ (NN/141/2020).

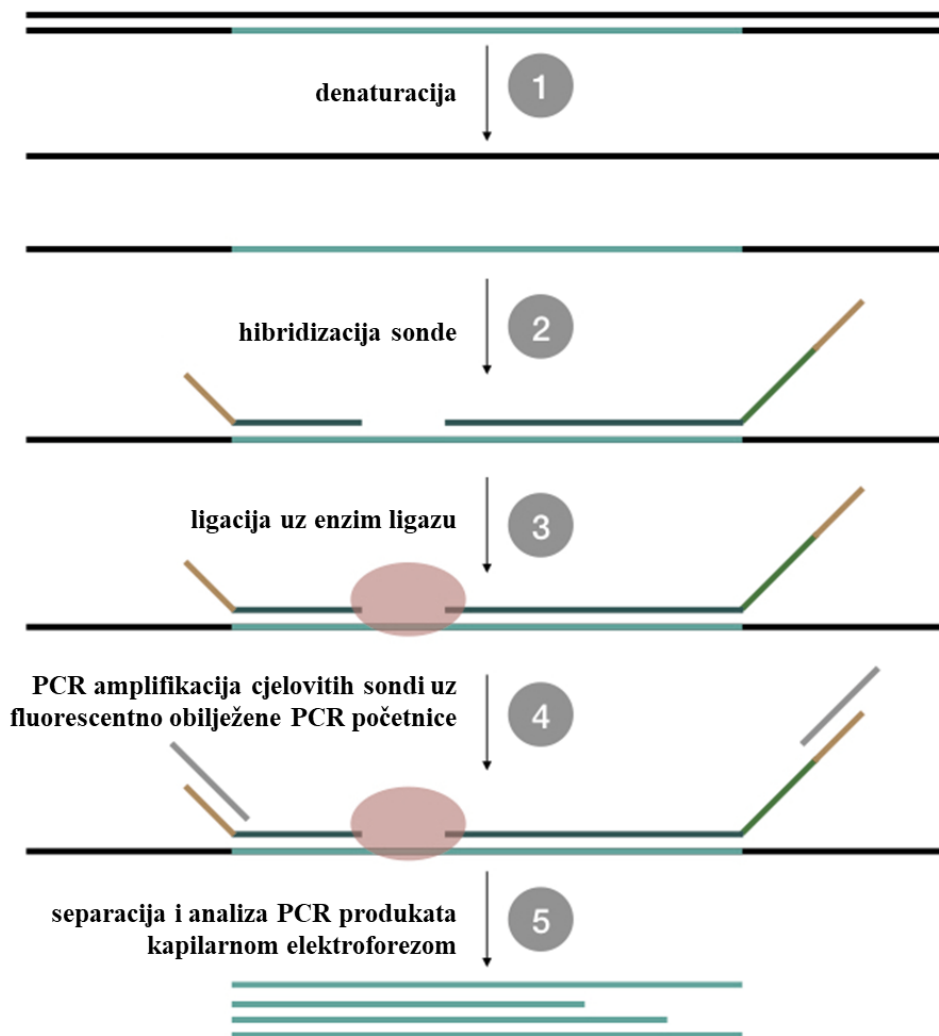
## 1.4 MLPA metoda

Velike delecije i duplikacije povezane su s mnogim bolestima i mogu obuhvatiti jedan ili više eksona ili čak cijeli gen. Nekoliko je tehnika razvijeno za otkrivanje takvih mutacija (Bulić-Jakuš i Barišić, ured., 2011). Jedna od njih je MLPA metoda shematski prikazana na Slici 4.

MLPA (eng. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) ili metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda semikvantitativna je i neautomatizirana metoda koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (eng. *polymearse chain reaction, PCR*) gdje je uz jedan par PCR početnica moguće istovremeno umnožiti i do 60 vezanih sonda jedinstvene sekvence i duljine ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)). Schouten i suradnici prvi su je puta opisali još davne 2002. godine. Za razliku od klasičnog PCR-a gdje se umnaža ciljani fragment DNA omeđen početnicama, u MLPA reakciji umnažaju se MLPA sonde (Schouten i sur., 2002).

MLPA se sastoji od nekoliko osnovnih koraka koji redom uključuju denaturaciju DNA molekule, hibridizaciju sonda, ligaciju vezanih sonda te njihovo umnažanje PCR-om (Sertić i sur., 2014). Nakon PCR amplifikacije slijedi kapilarna elektroforeza te analiza podataka pomoću Coffalyser.Net programa proizvođača MRC Holland. ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com))





**Slika 4.** Shematski prikaz MLPA metode

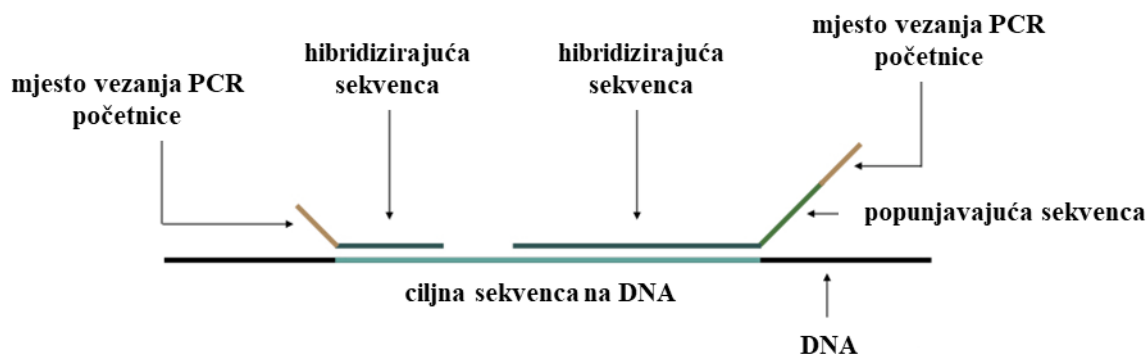
U prvom se koraku MLPA reakcije izolirana i pročišćena DNA toplinski denaturira. Zatim se u otopinu DNA dodaje smjesa sonda (tzv. hibridizacijski probemix) specifičnih za određeno područje DNA te se takva reakcijska smjesa ostavi inkubirati preko noći (16-20 h na 60°C). Svaka se sonda sastoji od dva oligonukleotidna dijela koja se moraju vezati neposredno jedan uz drugoga na ciljnoj DNA kako bi se u sljedećem koraku povezali u jedinstvenu sondu pomoću termostabilne ligaze. Hibridizacija s ciljnom DNA temelji se na komplementarnosti sekvence sonde i DNA-kalupa. Savršeno sjedanje oligonukleotida na DNA sekvencu preduvjet je za daljnju ligaciju i umnažanje cjelovitih sonda. ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com))

Nakon ligacije vezanih sonda slijedi njihovo umnažanje u multiplex PCR reakciji uz samo jedan par PCR početnica. Poseban dizajn MLPA sonda omogućava simultano umnažanje svih sonda nekog probemixa višestrukom PCR reakcijom. Kako se samo povezani oligonukleotidi,

odnosno cjelovite sonde umnažaju, nije potreban međukorak ispiranja nevezanih i neligiranih sondi. Naposljetku se PCR amplikoni detektiraju i kvantificiraju kapilarnom elektroforezom. Rezultat elektroforeze je obrazac pikova gdje svaki pik odgovara pojedinoj umnoženoj sondi. Najprije slijedi vizualna procjena obrasca pikova elferograma ispitivanih i referentnih uzoraka, a zatim se pomoću programa računaju relativne visine pikova pojedinih sondi u odnosu na referentne uzorke. Dobivene pikove u ispitivanim uzorcima pacijenata treba usporediti sa zdravim kontrolama gdje očekujemo po dvije kopije neke DNA sekvence. Stoga je u jednu seriju uzoraka potrebno uključiti barem tri referentna uzorka prema kojima se procjenjuje relativan broj kopija neke DNA sekvence u uzorku. Taj se relativan broj kopija DNA sekvence određuje iz omjera visine pikova referentnih i ciljnih sondi u uzorcima te usporedbom sa zdravim kontrolama. ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com))

#### **1.4.1 Dizajn i izrada specifičnih sondi**

Upravo je poseban dizajn sondi temelj svake MLPA reakcije. Svaka se sonda sastoji od dva oligonukleotidna dijela, lijevog oligonukleotida koji je obično kraći i desnog koji je duži. Sonde su karakteristično građene (Slika 5.). Desni oligonukleotid je obično sintetske prirode. Sadrži hibridizirajuću sekvencu na 3'-kraju i sekvencu komplementarnu fluorescentno obilježenoj PCR početnici na 5'-kraju. Lijevi se oligonukleotid proizvodi pomoću virusnog vektora. On, osim hibridizacijske sekvence na 5'-kraju i sekvence komplementarne neobilježenoj PCR početnici na 3'-kraju, sadrži i tzv. popunjavajuću sekvencu (eng. *Stuffer sequence*) umetnutu između dva spomenuta dijela kako bi se cjelovite sonde i njihovi PCR produkti naposljetku razlikovali u duljini. Dakle, sve povezane sonde imaju identične 3' i 5' krajeve što omogućuje simultanu PCR amplifikaciju uz samo jedan par početnica, dok varijabilna duljina popunjavajuće sekvence pridonosi razlici u duljini sondi. Tako PCR rezultira smjesom amplikona različite duljine koji se mogu elektroforetski razdvojiti i kvantificirati (Schouten i sur., 2002; Bulić-Jakuš i Barišić, ured., 2011).



**Slika 5.** Građa MLPA sonde

### 1.4.2 Primjena MLPA metode

MLPA ima široku primjenu u molekularnoj dijagnostici. Primjenjuje se u detekciji promjena broja kopija (eng. *copy number variants, CNV*) pojedinačnih eksona i gena do cijelih kromosoma, zatim u detekciji promjena metilacijskog statusa DNA, otkriva delecije i duplikacije u genomu (otkriva višak ili manjak genetičkog materijala), diskriminira pseudogene, a primjenjuje se i u onkogenomici gdje detekcijom somatskih CNV-i optimizira molekularno profiliranje tumora. MLPA metoda može detektirati promjene veličine od 1 bp do 100 Mb. ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com))

CNV ili promjene u broju kopija genoma definiraju se kao višak ili manjak odsječka DNA u odnosu na referentni humani genom ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)). Neke varijante su patogene što znači da uzrokuju bolest, ali mogu biti i benignog karaktera. Ipak, promjene u broju kopija nekog gena nerijetko su uzrok različitih bolesti i sindroma ili pak povećavaju sklonost za određeni poremećaj (Schouten, 2002).

Stoga je MLPA neizostavna u dijagnostici numeričkih kromosomskih aberacija prvenstveno zbog ograničenosti rezolucije klasične citogenetike, zatim u dijagnostici različitih subtelomernih poremećaja, mikrolelecijskih sindroma, monogeničkih bolesti, u detekciji točkastih mutacija i poremećaja metilacije koji mijenjaju gensku ekspresiju (Schouten, 2002).

### 1.4.3 Prednosti i nedostaci MLPA metode

Metoda MLPA ima mnogobrojne prednosti, ali i određene nedostatke. Velika je prednost to što sama metoda ne zahtjeva visoku koncentraciju DNA. Optimalnim se pokazala količina od 50-

100 ng DNA zadovoljavajuće čistoće ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)). MLPA metoda isto tako premošćuje nedostatak klasične multiplex PCR reakcije čije je glavno ograničenje dizajn velikog broja početnica uslijed preklapanja emisijskih spektara fluorescentnih boja, ali tu je i problem nespecifičnog vezanja početnica na DNA izvan ciljnog mjesta. Kako se u MLPA za umnažanje sonda koristi isti par početnica, moguće je umnožiti i do 60 sonda istovremeno, pri čemu nije potrebno ispiranje nevezanih i nepovezanih sonda. Kako sonde reflektiraju prisutnost određene DNA sekvence u uzorku, time je omogućeno otkrivanje promijenjenog broja kopija tih DNA sljedova u genomu u jednoj višestrukoj PCR reakciji (Schouten, 2002). Još jedna prednost MLPA reakcije je jednostavnost njenog izvođenja, a radni je protokol identičan za puno različitih aplikacija. Isto tako, ispitivanje velikog broja uzoraka odjednom olakšava njenu implementaciju u rutinski rad. S druge strane, vrlo je važno poznavati ograničenja metode koja utječu na njenu kliničku primjenu. Glavni nedostatak metode je to što ona ne može detektirati promjene u broju kopija DNA sekvenci koje nisu pokrivena specifičnim sondama, a isto tako neće detektirati balansirane promjene u genomu. Stoga, negativan nalaz MLPA ne isključuje postojanje genomske promjene. Prisutnost polimorfizma jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism, SNP*) ili točkaste mutacije na mjestu vezanja sonde, može dovesti do izostanka njenog vezanja i umnažanja što bi se tumačilo kao lažno pozitivna delecija. MLPA zahtjeva DNA visoke čistoće jer visoke koncentracije soli i druga onečišćenja mogu interferirati i uzrokovati lažne rezultate ([www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com)). Naposljetku još valja istaknuti da je MLPA manualna metoda koja zahtjeva da operater posjeduje određenu vještinu pipetiranja, kao i znanja prilikom interpretacije rezultata analize.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U dijagnostici tumora koriste se različite molekularne metode kojima se može otkriti sklonost za razvoj zloćudnih tumora. Cilj genetičkog testiranja je identificirati rizične osobe za razvoj raka. Dakle, u sklopu preventivne onkologije procjenjuje se rizik, odnosno predispozicija da pacijent razvije zloćudni tumor, najčešće karcinom, iako u tom trenutku pacijent uopće ne treba biti pogođen bolešću.

Obično kada mnogo srodnika u obitelji ima karcinom u ranim godinama života ili se kod jedne osobe jave višestruki tumori (čak i bilateralni karcinom dojke), za takvu obitelj kažemo da nosi visoki rizik nasljeđivanja raka. Kod pacijenata sa sumnjom na LS u fokusu testiranja su genetičke promjene u MMR genima – *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH6* i *EPCAM*. Iako su točkaste mutacije najčešći tip mutacije MMR gena i mogu se detektirati NGS metodom, >20% otpada na velike genomske promjene kao što su velike delecije i insercije/duplikacije koje se često ne mogu detektirati ukoliko program koji se koristi u analizi NGS podataka nije u mogućnosti raditi CNV analizu (Gylling i sur., 2009). Stoga je potrebno, nakon dobivenog negativnog rezultata NGS metodom, upotpuniti testiranje MLPA metodom koja će nam omogućiti detekciju većih delecija i insercija/duplikacija u MMR genima koja može potvrditi dijagnozu LS-a.

Hipoteza ovog istraživanja je da će korištenje MLPA metode, kao komplementarne metode NGS metodi, povećati dijagnostičku osjetljivost genetičkog testiranja pacijenata sa postavljenom kliničkom sumnjom na Lynch sindrom, odnosno da će se primjenom MLPA metode povećati stopa detekcije većih genomskih promjena u MMR genima uključenih u patogenezu Lynch sindroma.

Cilj ovog rada je procijeniti korisnost uvođenja MLPA analize u rutinsku dijagnostiku LS-a.

## 3. ISPITANICI I METODE

### 3.1 Ispitanici

U istraživanje su uključena 22 ispitanika koja su prošla genetičko savjetovanje i kod kojih je postavljena klinička sumnja na Lynch sindrom. Nakon genetičkog savjetovanja, prema zahtjevu liječnika, upućeni su u Odjel za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb na genetičko testiranje. Nakon uzorkovanja EDTA - periferne krvi i izolacije genomske DNA, svi DNA uzorci su sekvencirani NGS metodom korištenjem multigenkog panela koji obuhvaća 113 gena, uključujući i MMR gene, te analizirani korištenjem programskog paketa proizvođača NGS panela (Variant Studio programski paket – Illumina). Sekvenciranje je provedeno na sekvenceru MiSeq (Illumina). Za interpretaciju varijanti korištene su različite baze podataka (ExAC, gnomAD, 1000 Genomes, ClinVar, OMIM, COSMIC, PubMed). Za procjenu patogenosti korišteni su SIFT, PolyPhen i Mutation Tester *in silico* programi. Promjene u sekvenci definirane su prema referentnom genomu (hg19) i interpretiraju se u kontekstu klinički relevantnog transkripta (NM\_).

Podaci o pacijentima uključenim u istraživanje prikazani su u Tablici 5. Za svakog je ispitanika navedena jedinstvena laboratorijska oznaka uz redni broj uzorka, dob, spol te podaci dostupni iz osobne i obiteljske anamneze koji su relevantni za postavljanje sumnje na LS. Dodatno, navedeni su rezultati imunohistokemijske analize (IHC) za one ispitanike kod kojih je bila učinjena IHC tumorskog tkiva na prisutnost ekspresije MMR proteina (u Zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb), kao i patogene varijante u MMR genima utvrđene tijekom NGS analize, što je bilo relevantno za istraživanje.

### 3.2 Potrebna oprema i reagensi

Za izvođenje analize korišteni su reagensi proizvođača MRC Holland (Amsterdam, Nizozemska) – Probemix P003 MLH1/MSH2, Probemix P008 PMS2, Probemix P072 MSH6-MUTYH i Probemix P248 MLH1-MSH2 Confirmation. Korišten je PCR uređaj MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) i uređaj za kapilarnu elektroforezu ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

### **3.3 MLPA protokol**

MLPA protokol provodi se prema preporuci proizvođača reagensa MRC Holland tijekom dva radna dana. Generalni je protokol za različite aplikacije jednak neovisno o korištenom setu sonde te redom uključuje:

- 1) Denaturaciju DNA i hibridizaciju specifičnih SALSA MLPA sonda
- 2) Reakciju ligacije
- 3) Amplifikaciju sonda u višestrukoj PCR reakciji

#### **POSTUPAK:**

U eppendorf epruvetama (1,5 mL) pripremiti razrjeđenje DNA koncentracije 17 ng/μL. Razrjeđenja se pripremaju TE puferom (0,1 mM, pH=8,2). Zatim, 5 μL DNA u razrjeđenju otpipetirati u PCR tubice (0,2 mL) i uzorke staviti na denaturaciju u PCR uređaj na 98°C 5 minuta, nakon kojih se temperatura spušta na 25°C. Za to vrijeme pripremiti smjesu sonda i pufera, tzv. hibridizacijski mastermix. Svaki se mastermix priprema za jedan uzorak više no što ima uzoraka u seriji. U mastermix dodati 1,5 μL SALSA probemixa i 1,5 μL MLPA pufera po uzorku. U svaki uzorak zatim dodati 3 μL hibridizacijskog mastermixa, vratiti ih u PCR uređaj gdje nakon denaturacije na 98°C jednu minutu, slijedi hibridizacija 16-20 h (obično preko noći) na 60°C. Sljedeći dan pripremiti ligaza65-mastermix u koji po uzorku dodati 25 μL redestilirane vode, 3 μL ligaza pufera A, 3 μL ligaza pufera B i 1 μL enzima ligaza-65. Temperaturu u PCR-u spustiti na 54°C i u uzorke koji se ne vade iz uređaja dodati po 32 μL pripremljenog ligacijskog mastermixa. Ligacijska se reakcija odvija 15 minuta na 54°C, a zatim se enzim inaktivira podizanjem temperature na 98°C kroz 5 minuta. Za to vrijeme pripremiti PCR-polimeraza mastermix koji sadrži 7,5 μL redestilirane vode, 2 μL SALSA PCR primermixa i 0,5 μL SALSA polimeraze po uzorku. Na sobnoj temperaturi u svaku PCR tubicu dodati 10 μL pripremljenog polimeraza-mastermixa. Uzorke vratiti u PCR uređaj i pokrenuti PCR program (35 x {95°C 30", 60°C 30", 72°C 60"}, 72°C 20') po završetku kojeg se temperatura spušta na 15°C. Uzorci se zatim pripremaju za kapilarnu elektroforezu.

### **3.4 Priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu**

Umnožene cjelovite MLPA sonde detektiraju se i kvantificiraju kapilarnom elektroforezom.

## POSTUPAK:

Formamid-ROX500 mastermix pripremiti tako da se po uzorku doda 9  $\mu\text{L}$  formamida (HiDi formamide, Applied Biosystems) i 0,3  $\mu\text{L}$  internog standarda ROX-500 (GeneScan 500-ROX Size standard, Applied Biosystems). Zatim 9,3  $\mu\text{L}$  tako pripremljenog mixa rasporediti u prazne jažice na pločici te dodati 0,7  $\mu\text{L}$  ohlađenog uzorka (PCR produkt). U jažice koje ne sadrže uzorak, umjesto mastermixa stavlja se 10  $\mu\text{L}$  čistog formamida. Pločicu prekriti gumenim poklopcem, po potrebi uzorke spustiti na dno jažice, pa onda pločicu staviti u PCR uređaj denaturirati 3 minute na 86°C. Kada se temperatura spusti na 4°C (u naredne 2 minute), pločicu staviti na uređaj za kapilarnu elektroforezu.

### 3.5 Analiza podataka i interpretacija rezultata MLPA

Rezultati se analiziraju pomoću Coffalyser.Net programskog alata proizvođača MRC Holland koji je dostupan na njihovim mrežnim stranicama. Proizvođač navodi da se isključivo korištenjem navedenog programa u kombinaciji s ostalim MRC Holland reagensima za izvođenje MLPA analize osigurava pouzdanost i točnost rezultata, što je dodatno regulirano oznakom IVD (eng. *in vitro diagnostics*) za program i za reagense.

MLPA metodom može se utvrditi samo relativan broj kopija neke DNA sekvence, stoga je u seriju uzoraka neophodno uključiti referentne (kontrolne) uzorke s kojima će se uspoređivati uzorci DNA pacijenata.

Za analizu podataka koriste se dva izračuna (Sertić i sur., 2014):

1. Prvi je normalizacija unutar uzorka koja uspoređuje pikove sonde koje detektiraju gene od interesa sa pikovima referentnih sonde. Referentne sonde detektiraju sekvence za koje očekujemo da imaju diploidan broj kopija u svim testiranim uzorcima.
2. Drugim izračunom radi se normalizacija između uzoraka. Dobiveni pikovi uzorka uspoređuju se sa pikovima referentnih DNA uzoraka. Referentni DNA uzorci su uzorci zdravih osoba za koje se očekuje da imaju diploidan broj kopija za referentne sonde i gene od interesa.

Skoro svaki MLPA set sonde sadrži 9 fragmenata kontrole kvalitete: „Benchmark“ fragment duljine 92 nt s kojim se uspoređuju drugi fragmenti kontrole kvalitete, zatim četiri Q-fragmenta duljine 64, 70, 76 i 82 nt, dva D-fragmenta duljine 88 i 96 nt te X i/ili Y-fragmente duljine 100 i 105 nt. Visina četiriju Q-fragmenata odražava količinu DNA u reakciji i uspješnost ligacije.



Fragmenti ne trebaju hibridizirati s ispitivanom DNA da bi se tijekom PCR reakcije umnožili. Q-fragmenti su visoki kada je količina DNA nedostatna ili kod neuspješne ligacije. U tom je slučaju medijan visine Q-fragmenata  $\geq 33\%$  visine „Benchmark“ fragmenta. Povećanjem količine DNA u reakciji, smanjuje se visina Q-fragmenata. D-fragmenti prepoznaju regije DNA koje sadrže puno CpG otoka sa izrazito visokim sadržajem GC baznih parova. Samim time ta se područja teže denaturiraju. Kada su dva D-fragmenta niska ( $\leq 50\%$  visine „Benchmark“ fragmenta), DNA iz uzorka se nije uspješno denaturirala.

Rezultati su dostupni u nekoliko oblika, od elferograma i tablice s broječanim vrijednostima omjera sonde, do grafičkog prikaza tih istih omjera. Idealno, kada je omjer sonde 1,0, takav se rezultat tumači kao da su sonde detektirale isti broj kopija i u testiranom i u referentnom uzorku. Omjer od 0,5 sugerira heterozigotnu deleciju, a 1,5 heterozigotnu duplikaciju. Ipak, u obzir treba uzeti standardnu devijaciju svake sonde koja iznosi oko 0,10, pa finalni omjer sonde u uzorku pacijenta bez velikih genomskih promjena uspoređen s minimalno tri kontrolna uzorka iznosi od 0,80 do 1,20 (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Granične vrijednosti koje se koriste za interpretaciju rezultata MLPA analize

Broj kopija DNA sekvence	Finalni omjer (FO)
bez promjene – normalan nalaz	$0.80 < FO < 1.20$
homozigotna delecija	$FO = 0$
heterozigotna delecija	$0.40 < FO < 0.65$
heterozigotna duplikacija	$1.30 < FO < 1.65$
heterozigotna triplikacija/homozigotna duplikacija	$1.75 < FO < 2.15$

**Tablica 5.** Podaci o ispitanicima uključenim u istraživanje

Broj uzorka		Dob, spol	Iz osobne anamneze	Obiteljska anamneza	Imunohistokemijski nalaz (IHC)/MSI	NGS rezultati
1	190	49, Ž	urotelijalni karcinom bubrega, uretera i mjehura (40.g.) zloćudna novotvorina uzlaznog debelog crijeva (46.g.)	otac - karcinom bubrega i mokraćnog mjehura, karcinom kolona (54.g.) majka - karcinom dojke	MSH2-, MSH6-, MLH1+, PMS2+	
2	233	52, M	karcinom mokraćnog mjehura karcinom debelog crijeva in situ (49.g.)	majka - karcinom maternice, karcinom debelog crijeva (60.g.), rak bubrega bratći i sestrične s majčine strane - karcinom debelog crijeva (između 45.-50. god. života)		
3	46	53, M	zloćudna novotvorina poprečnog debelog crijeva (transverzanog kolona) (48.g.)	baka i djed (po ocu) - karcinom želuca ujak - karcinom debelog crijeva (82.g.)	MSI-H MLH1-, PMS2- MSH2+, MSH6+	
4	48	32, Ž	zloćudna novotvorina završnog debelog crijeva (rektuma) (27.g.) zloćudna novotvorina dojke (29.g.)	djed - rak grla		

5	92	60, Ž	zloćudna novotvorina antruma pilorusa (54.g.)	majka - rak pluća sestrične (i po ocu i po majci) - karcinom jajnika majčina sestra - Hodgkinov limfom djed (po majci) - rak želuca otac - karcinom bubrega		
6	96	63, Ž	zloćudna novotvorina debelog crijeva (kolona) (59.g.) karcinom endometrija (55.g.)	brat - karcinom pluća	MSI-H MLH1-, PMS2-, MSH2-, MSH6+	
7	187	39, Ž	zloćudna novotvorina završnog debelog crijeva (rektuma) (31.g.) karcinom mokraćnog mjehura (21. g.)	otac- rak prostate djed (po ocu) - metastatski tumor nepoznatnog primarnog sijela (sumnja ca gušterače) baka (po majci) - metastatski tumor nepoznatnog primarnog sijela (sumnja ca maternice) majčina sestra - nepoznat primarni tumor ujak - melanom		
8	297	65, Ž	zloćudna novotvorina debelog crijeva (60.g.) karcinom dojke metastatski TNBC	otac - leukemija očeva sestra - karcinom debelog crijeva sestra - melanom		

9	166	48, Ž	Lynch sindrom	majka-karcinom dojke, karcinom bubrega, adenokarcinom kolona s metastazama na jetri otac - glioblastom baka (po ocu) - karcinom dojke (60.g.) očeva sestra - karcinom dojke (60.g.)		heterozigotna patogena <i>MSH6</i> c.741dupA
10	167	78, Ž	karcinom dojke (54.g.,ponovno u 61.g. ista dojka) karcinom bubrega adenokarcinom kolona s metastazama na jetri			
11	264	39, M	-	otac - karcinom debelog crijeva (72.g.) očev brat - karcinom rektuma (74.g.) i multipli mijelom drugi očev brat - multipli mijelom i karcinom mokraćnog mjehura (60.g.) majka - karcinom dojke (60.g.) majčina sestra - karcinom dojke (55.g.) kćer - neuroblastom (1.g.)		
12	298	45, Ž	zloćudna novotvorina sigmoidnog kolona (42.g.) adenokarcinom maternice i jajnika (31.g.) - navodno 2 primarna sijela	otac - karcinom debelog crijeva (67.g.)	MLH1+, PMS2+, MSH2-, MSH6-	<i>MSH2</i> c.1408delG

13	409	62, Ž	zločudna novotvorina dojke (HR+HER2+) (59.g.) adenokarcinom endometrija (58.g.) karcinom debelog crijeva (52.g.)	majčina sestrična - rak dojke očeva sestra i njena kćer - rak dojke kćer majčine sestrične - glioblastom		
14	286	43, Ž	adenokarcinom debelog crijeva (40.g.)	otac, dva strica, sestrična s očeve strane - rak debelog crijeva (svi do 40.g.) obje bake - rak dojke (iza 70.g.)	MSH2+, MSH6+, MLH1-,PMS2-	
15	503	38, Ž	polip maternice (34.g.)	ujak - tumor bubrega ujakova kćer - karcinom grlića maternice (38.g., preminula) (utvrđen Lynch) ujakov sin - karcinom debelog crijeva (40.g.) ujakova supruga - karcinom maternice djed (po ocu) - karcinom debelog crijeva baka (po majci) - karcinom maternice		
16	901	45, M	zločudna novotvorina debelog crijeva (43.g.)	majka - karcinom debelog crijeva (39.g.) brat - karcinom debelog crijeva (27.g.) bratova kći - tumor na mozgu (21.g.) otac - karcinom želuca	MSI-H	<i>MLH1</i> c.306+1G>A

17	933	54, Ž	zloćudna novotvorina endometrija (51.g.) planocelularni rak kože (52.g.)	majka - rak debelog crijeva (59.g.) baka (po majci) - rak dojke otac - rak debelog crijeva (36.g.); ima sedmero braće i sestara - svi rak DC brat - rak testisa (29.g.), DC i mokraćnog mjehura		
18	361	59, Ž	zloćudna novotvorina uzlaznog debelog crijeva (45.g.)	sin - karcinom DC (30.g.) brat1 - karcinom DC (36.g.) brat2 - karcinom gušterače (69.g.) majka - karcinom DC (49.g.) majčina sestra i njene kćeri - karcinom DC majčin brat - karcinom DC (40.g.)		<i>MLH1</i> c.199G>A
19	473	55, Ž	zloćudna novotvorina vrata maternice (47.g.)	majka - rak grlića maternice (52.g.); karcinom uretera (65.g.); rak DC (67.g.) petorica majčine braće - rak DC bratić - rak DC (23.g.)		<i>MSH2</i> c.366+1G>A
20	815	56, M	zloćudna novotvorina rektosigmoidnog prijelaza (53.g.)	teta po ocu - ca dojke	MLH1-, PMS2-, MSH2-, MSH6-	

<b>21</b>	855	40, M	zloćudna novotvorina kolona (37.g.)	otac – rak prostate	MSI-H	
<b>22</b>	808	54, M	zloćudna novotvorina debelog crijeva (52.g.)	majka i tete s majčine strane – karcinom želuca; sestrična i ujak – ca kolona (u 50.-tima oboje)		<i>MSH2 c.518T&gt;C</i>

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Rezultati

Na uzorku od 22 pacijenta NGS metodom detektirano je 6 patogenih varijanti, a MLPA metodom na uzorku od preostalih 16 pacijenata pronađene su dvije velike genomske promjene. U jednom uzorku pronađena je velika genomska delecija eksona 1 i regije *upstream* gena *MSH2* (Primjer 1.), a u drugom uzorku velika genomska delecija eksona 9-15 gena *MLH1* (Primjer 2.). U nastavku su primjeri u kojima su pronađene spomenute velike genomske promjene te primjer negativnog rezultata (Primjer 3.) koji je korišten kao kontrolni uzorak. U Tablici 6. prikazane su sve promjene u MMR genima detektirane NGS ili MLPA metodom na uzorku od 22 pacijenta s postavljenom sumnjom na LS.

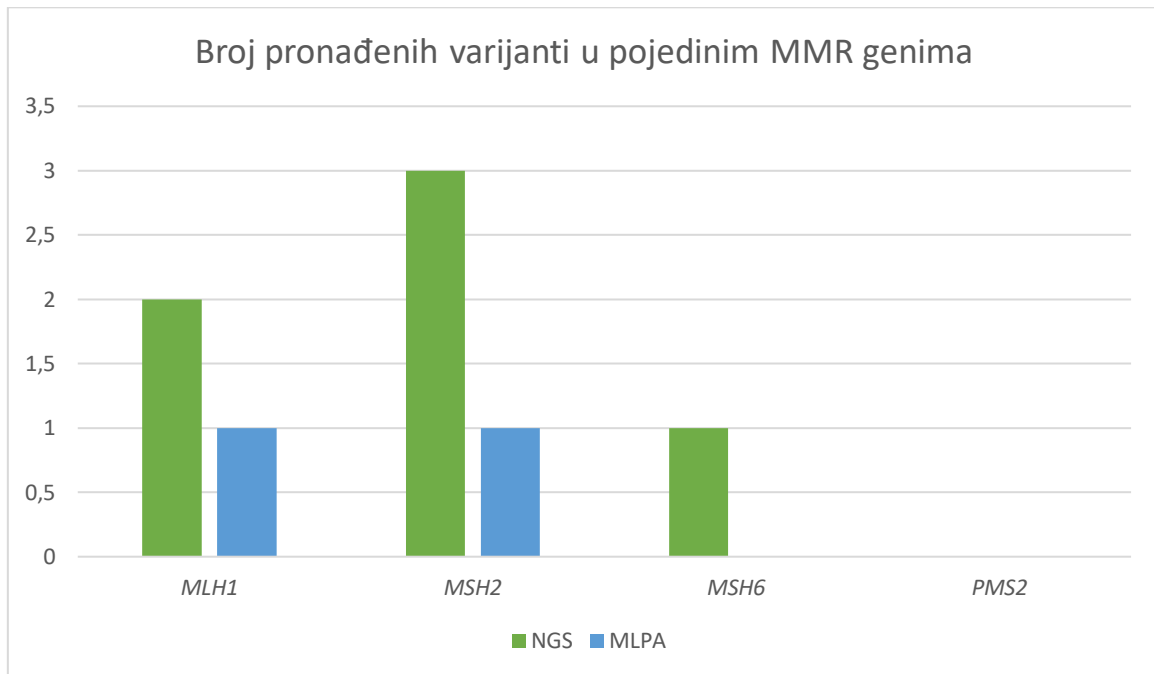
**Tablica 6.** Detektirane genomske promjene u istraživanju na uzorku od 22 pacijenta

Oznaka pacijenta	Spol	Detektirana promjena	Metoda
166	Ž	<i>MSH6</i> c.741dupA (patogena)	NGS
298	Ž	<i>MSH2</i> c.1408delG (patogena)	NGS
901	M	<i>MLH1</i> c.306+1G>A (patogena)	NGS
361	Ž	<i>MLH1</i> c.199G>A (patogena)	NGS
473	Ž	<i>MSH2</i> c.366+1G>A (patogena)	NGS
808	M	<i>MSH2</i> c.518T>C (patogena)	NGS
233	M	<i>MSH2</i> del ex 1 i upstream (patogena)	MLPA
286	Ž	<i>MLH1</i> del ex 9-15 (patogena)	MLPA

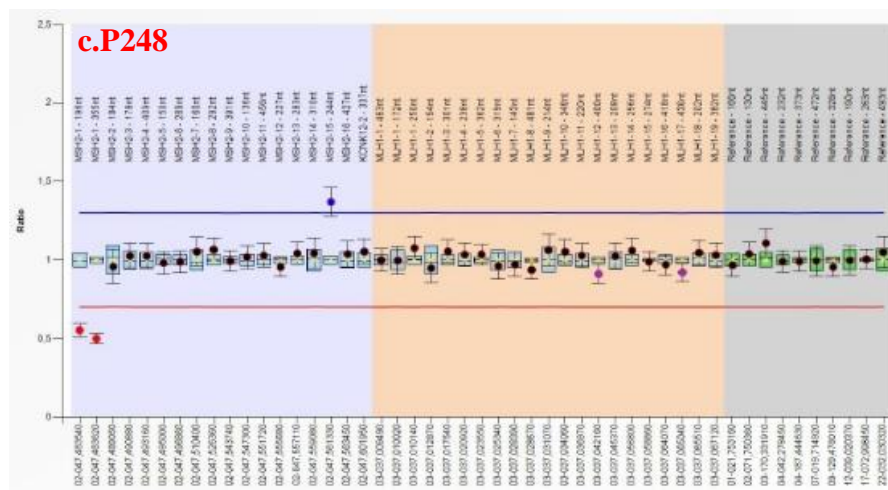
NGS metodom detektirano je ukupno 6 promjena u MMR genima što je 27,3% (6/22). Ispitanicima kojima je NGS metodom detektirana patogena varijanta u MMR genima nije bilo potrebno raditi MLPA analizu. Stoga je MLPA metodom analizirano 16 uzoraka, gdje su pronađene 2 velike promjene – delecije što iznosi 12,5% (2/16). Primjenom obiju metoda detektirano je ukupno 8 patogenih varijanti MMR gena, odnosno 36,4% (8/22). Na Slici 6. grafički je prikazan broj promjena detektiran u pojedinim genima. Najviše je promjena detektirano u *MSH2* genu (4/8; 50%), zatim u *MLH1* genu (3/8; 37,5%), a samo je jedna promjena pronađena u *MSH6* genu (1/8; 12,5%).



**Slika 6.** Grafički prikaz broja pronađenih genomskih promjena u pojedinim MMR genima (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*). U genu *MLH1* pronađeno je 37,5% promjena, u genu *MSH2* 50% svih promjena, a u genu *MSH6* 12,5% svih detektiranih varijanti. U genu *PMS2* nisu detektirane promjene ni NGS ni MLPA metodom.

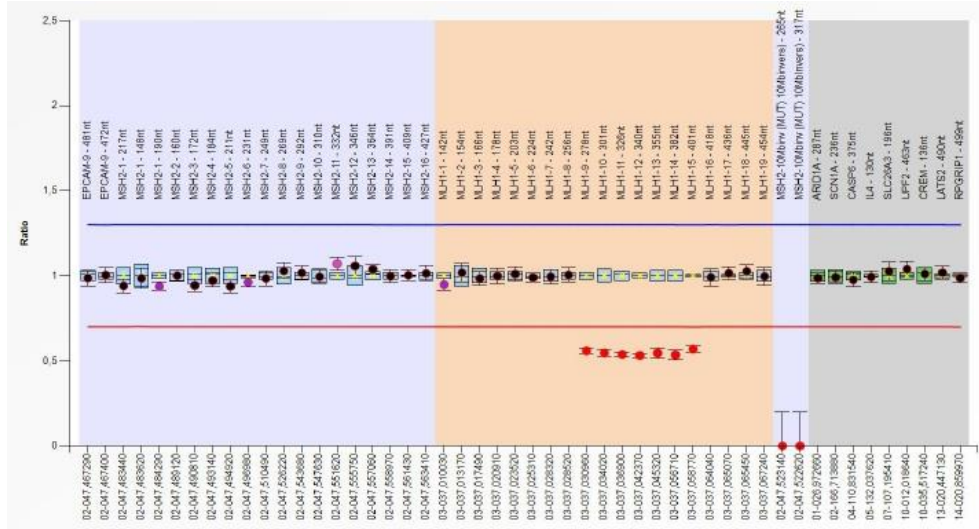


**Primjer 1.** Pacijentu 233 pronađena je delecija *MSH2* eksona 1 korištenjem seta sonda P003 (a.) i delecija regije *upstream* gena *MSH2* korištenjem seta sonda P072 (b.). Konfirmatornim setom P248 (c.) potvrđena je pronađena promjena; dodatno je zamiječena duplikacija *MSH2* eksona 15 koju treba potvrditi.

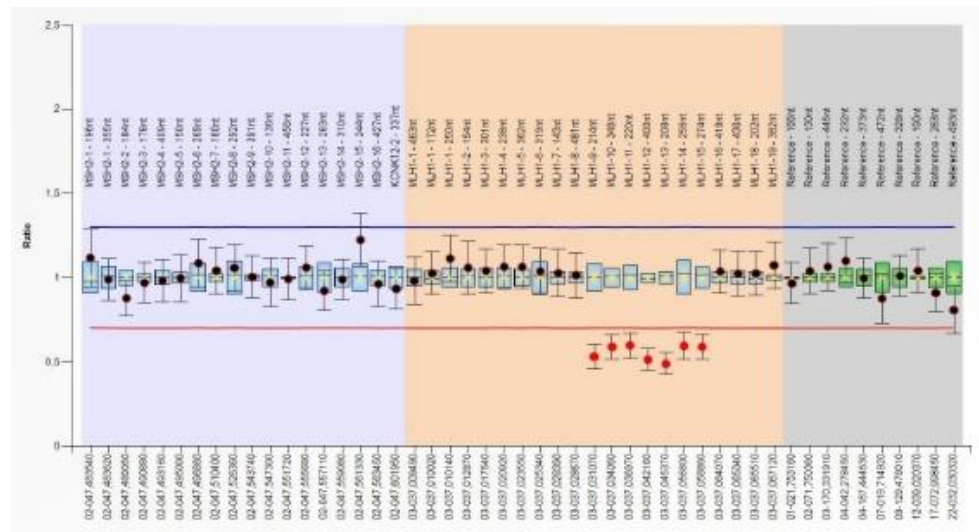


**Primjer 2.** Pacijentici 286 pronađena je delecija *MLH1* eksona 9-15 setom sondi P003 (a.) što je potvrđeno i konfirmatornim setom P248 (b.).

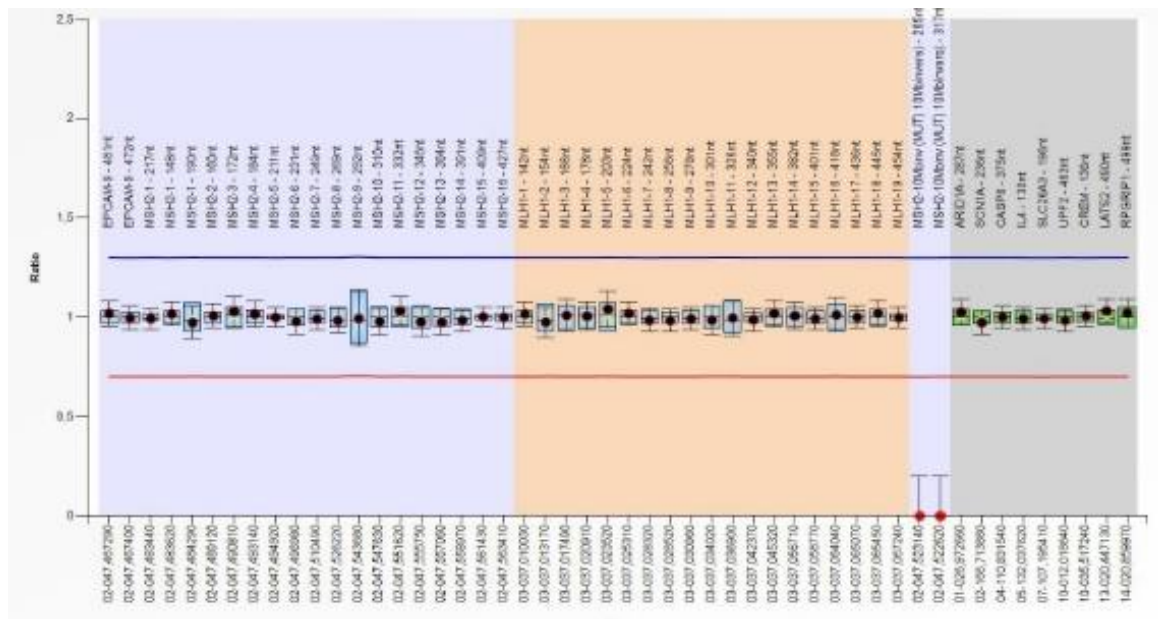
**a. P003**



**b. P248**



### Primjer 3. Prikaz urednog nalaza kontrolnog uzorka analiziranog setom sondi P003.



## 4.2 Rasprava

Lynch sindrom je sindrom nasljednog karcinoma debelog crijeva (Giardiello i sur., 2014). Prema definiciji Lynch sindrom uzrokovan je nasljednom mutacijom u nekom od tumor-supresorskih MMR gena – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* ili delecijom terminalnih eksona gena *EPCAM* (Sobocinska i sur., 2020). Uzorak izbora za ispitivanje na prisutnost mutacija je DNA izolirana iz periferne krvi. Sekvenciranje nove generacije korisna je metoda za pronalazak genskih promjena u MMR genima jer omogućuje istovremeno sekvenciranje velikog broja gena povezanih s predispozicijom za razvoj raka. Međutim, ovisno o dostupnom programskom paketu koji se koristi u analizi NGS podataka, postoje određena ograničenja u CNV analizi te se veće delecije i insercije/duplikacije neće detektirati. Tada se preporučuje koristiti drugu molekularnu metodu koja će detektirati veće genomske promjene. U mnogim je objavljenim istraživanjima upravo MLPA korištena za detekciju velikih genomskih promjena. Schneider i sur. (2017) su skupinu od 60 pacijenata podvrgli genetičkom testiranju. Patogene ili vjerojatne patogene varijante identificirali su u genima *MLH1* i *MSH2* kod 21 pacijenta (21/60, 35%), a otprilike trećina tih promjena bile su velike delecije. Iako na manjem uzorku, u ovom istraživanju detektirane su promjene kod 8 od 22 ispitanika što iznosi 36,4% (8/22) i što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja dostupnih u literaturi (Schneider i sur., 2017).

Prema dostupnim podacima, velike delecije čine 22% *MLH1* i *PMS2* mutacija, 26% *MSH2* i oko 7% *MSH6* mutacija (Cohen i sur., 2019). Najviše je promjena pronađeno u genu *MSH2* (4/8; 50%) od čega je jedna velika delecija detektirana MLPA metodom (1/8; 12,5%), a tri su promjene detektirane NGS metodom. U genu *MLH1* detektirane su ukupno tri varijante (3/8; 37,5%), pri čemu je jedna velika genomska delecija (1/8; 12,5%), a preostale dvije su točkaste promjene pronađene NGS metodom. Dodatno, u *MSH6* genu pronađena je jedna promjena NGS metodom (1/8; 12,5%), dok u *PMS2* genu nije detektirana ni jedna genomska promjena. Promjene koje prevladavaju u uzorku su točkaste promjene (točkaste delecije, duplikacije, supstitucije i *splice* varijante), a zabilježene su samo dvije veće genomske promjene – delecije jednog ili više eksona, što se također slaže s literaturnim podacima. Gylling i sur. (2009) ispitivali su promjene u MMR genima na 45 pacijenata kojima sekvenciranjem nije pronađena točkasta mutacija. Veliku genomsku promjenu pronašli su kod 12 od 45 pacijenata (27%). Od toga, delecije su bile prisutne u 3/25 (12%), 9/16 (56%) i 0/4 (0%) pacijenata kojima redom nedostaje ekspresija *MLH1*, *MSH2*, odnosno *PMS2* proteina.

Robinson i sur. (2007) su na skupini od 112 pacijenata ispitivali prisutnost nasljednih mutacija u MMR genima. Pacijente su odabrali na temelju Amsterdamskih kriterija, prisutnosti mikrosatelitne nestabilnosti u tumoru i temeljem rezultata imunohistokemijske analize. Nasljednu mutaciju pronašli su kod 69 od 112 pacijenata. Osim kod pacijenata s MSI-H tumorima, i kod pacijenata s MSI-negativnim tumorom pronašli su patogene nasljedne mutacije u MMR genima. Time su pokazali i zaključili da se nasljedne mutacije u MMR genima mogu pronaći i u pacijenata s MSI-negativnim tumorima, ali isto tako da se kod pacijenata s MSI-H CRC-om ili gubitkom ekspresije MMR proteina u tumoru ne moraju nužno pronaći nasljedne mutacije u MMR genima genetičkim testiranjem što onda isključuje dijagnozu Lynch sindroma. U ovom istraživanju rezultati IHC analize sakupljeni su za 8 pacijenata od čega je kod tri pacijenta dokazana i nasljedna mutacija u genu čija ekspresija izostaje. Međutim, kod 5 pacijenata s MSI-H tumorom ili izostankom ekspresije nekog od MMR proteina u tkivu nije detektirana patogena varijanta genetičkim testiranjem.

U ovom diplomskom radu analizirano je 14 ženskih i 8 muških pacijenata. Od 22 prikupljena uzorka, na 6 uzoraka pronađena je točkasta promjena metodom sekvenciranja nove generacije pa ti uzorci nisu dalje analizirani MLPA metodom. Dakle, MLPA metodom ispitalo se 16 uzoraka na prisutnost većih genomskih promjena. Svim su pacijentima analizirani MMR geni i *EPCAM* koristeći MLPA setove sonde (P003, P072 i P008) uključujući i konfirmatorni set

sondi P248 za potvrdu pronađenih promjena setom P003 koji je korišten na samo 2 uzorka. Od 16 uzoraka, u dva uzorka pronađena je promjena MLPA metodom, što je 12,5%. Jedna od tih promjena pronađena je kod Pacijenta 233. Pacijent 233 je muškarac od 52 godine koji je u svojoj 49. godini obolio od karcinoma debelog crijeva *in situ*. Uzevši u obzir ranu životnu dob pri dijagnozi CRC-a i često pojavljivanje karcinoma u obitelji – njegova majka je imala karcinom debelog crijeva te puno bliskih rođaka s majčine strane, svi između 45. i 50. godine života – kod pacijenta postoji jasna sumnja na Lynch sindrom. Sekvenciranjem nove generacije nije pronađena promjena u MMR genima. MLPA metodom korištenjem seta sonda P003 i P072 pronađena je delecija *MSH2* eksona 1 i regije *upstream*. Navedena promjena potvrđena je konfirmatornim setom sonda P248 i klasificira se kao patogena, no dodatno je uočena i duplikacija eksona 15 gena *MSH2*. Jedno od mogućih objašnjenja je da sonde iz seta P003 ne pokrivaju taj dio *MSH2* gena koji je pokriven sondama iz P248 seta obzirom da navedena duplikacija nije pronađena P003 setom. Zato nam i služi konfirmatorni set sonda P248 kako bi se kombiniranjem različitih setova sonda obuhvatio što veći dio gena. Upravo je to jedan od nedostataka MLPA metode i korištenih setova sonda – ako set ne pokriva određeni dio gena, promjena neće biti detektirana. Stoga negativan nalaz ne isključuje postojanje bolesti. Pronađena duplikacija zahtjeva daljnju potvrdu drugom molekularnom metodom, ali u ovom je slučaju dijagnoza LS-a postavljena zbog već prisutne delecije *MSH2*. Drugo objašnjenje za pronađenu duplikaciju je kontaminacija uzorka DNA PCR produktima individualnih eksona što onda rezultira porastom signala individualnih sonda (kao u ovom slučaju). Analiza ponovno izolirane DNA iz novog uzorka mogla bi otkloniti ovu sumnju. Druga promjena detektirana MLPA metodom pronađena je kod Pacijentice 286. Pacijentica 286 je žena od 43 godine koja je u svojoj 40. godini života oboljela od adenokarcinoma debelog crijeva. Po očevoj strani ima izrazito opterećenu obiteljsku anamnezu. Svi su rođaci oboljeli od karcinoma debelog crijeva do 40. godine života što upućuje na postojanje predispozicije za razvoj CRC-a. NGS metodom nije pronađena promjena u MMR genima pa je uzorak dalje analiziran MLPA metodom. Upotrebom seta sonda P003 pronađena je patogena delecija eksona 9-15 gena *MLH1*, a ista je promjena potvrđena i setom sonda P248.

Ukupno, od 22 uzorka, promjene u MMR genima zabilježene su u 8 pacijenata, što je 36,4%. Kako je NGS metodom promjena u MMR genima pronađena u 6 od 22 pacijenata što je 27,3%, a kombinacijom NGS i MLPA metode u 8 od 22 pacijenta, odnosno 36,4%, može se zaključiti da je uvođenje MLPA metode uz NGS metodu povećalo dijagnostičku osjetljivost genetičkog testiranja na LS.

Ipak, MLPA metoda ima određene nedostatke koji se trebaju osvijestiti prije njene implementacije u rutinsku dijagnostiku. Tako prisutnost polimorfizma jednog nukleotida ili točkaste mutacije na mjestu vezanja sonde, može dovesti do izostanka njenog vezanja i umnažanja što bi se onda tumačilo kao lažno pozitivna delecija. Iako zahtijeva malu količinu DNA, ona mora biti vrlo visoke čistoće bez prisutnosti visokih koncentracija soli. Stoga je ključno osigurati što kvalitetniju izolaciju DNA, s velikim prinosom i čistoćom. Isto tako, promjena neće biti zabilježena u dijelu genoma koji nije pokriven sondama, pa negativan nalaz ne isključuje prisutnost velike genomske promjene. Prednosti MLPA metode su dostupnost reagensa koji su jednaki za velik broj različitih aplikacija i mogućnost istovremenog testiranja većeg broja uzoraka što olakšava rutinsku primjenu. Također, proizvođač testova osigurava korisnicima odgovarajući program za obradu podataka dobivenih kapilarnom elektroforezom. S druge strane, metoda je vremenski zahtjevna te zahtjeva dobre manualne vještine u laboratorijskom radu. Od kliničara se očekuje što bolja selekcija pacijenata s kliničkom sumnjom na LS koji će se dalje podvrgnuti testiranju. Kada se nadogradnjom programske podrške u analizi NGS podataka omogući CNV analiza, MLPA metoda vjerojatno neće biti potrebna. Do tada, može poslužiti kao vjerodostojna nadopuna NGS metodi.

## 5. ZAKLJUČCI

Lynch sindrom je jedan od najčešćih nasljednih sindroma karcinoma debelog crijeva koji se nasljeđuje autosomno dominantno. Uzrokovan je nasljednom promjenom u nekom od tumor-supresorskih MMR gena (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*) ili *EPCAM* genu (Sobocinska i sur., 2020). Za potvrdu dijagnoze neophodno je definirati i potvrditi nasljednu promjenu u spomenutim genima. Najučestalije promjene u MMR genima su točkaste promjene, no ipak veliki udio, >20%, otpada na velike genomske promjene kao što su delecije i insercije/duplikacije (Gylling i sur., 2009). Iako su točkaste mutacije najčešći tip mutacije MMR gena i mogu se detektirati NGS metodom, detekcija velikih delecija i insercija/duplikacija zahtjeva dodatnu analizu metodama koje se koriste za detekciju velikih genomskih promjena. Ovim radom pokazala se korisnost MLPA metode u tu svrhu. Primjenom MLPA metode u kombinaciji sa sekvenciranjem nasljedna se promjena u MMR genima detektirala kod 36,4% (8/22) pacijenata uključenih u istraživanje, dok bi primjenom samo sekvenciranja nove generacije taj postotak iznosio 27,3% (6/22). Dvije promjene koje se nisu detektirale NGS metodom su dvije velike delecije klasificirane kao patogene, a koje su dodatno potvrdile dijagnozu Lynch sindroma kod dva pacijenta (delecija *MSH2* eksona 1 i regije *upstream* i delecija eksona 9-15 gena *MLH1*).

Ovaj diplomski rad pokazao je da bi uz NGS metodu trebalo uvesti MLPA metodu u rutinsku dijagnostiku Lynch sindroma kako zbog njene dijagnostičke značajnosti, tako i zbog njene prihvatljive cijene i dostupnosti reagensa. Ipak ono najvažnije, korištenjem MLPA metode za analizu MMR gena poboljšava se identifikacija pacijenata s Lynch sindromom. S ciljem da se pacijentima osigura vjerodostojan nalaz koji će isključiti ili potvrditi sumnju na Lynch sindrom, treba poznavati ograničenja korištenih metoda u molekularnoj analizi kako se ne bi potkrao lažno pozitivan ili lažno negativan rezultat genetičkog testiranja. Nalaz genetičkog testiranja ordinira daljnje postupanje s pacijentom – od uključivanja u probirne (eng. *screening*) programe do poduzimanja preventivnih farmakoloških i/ili kirurških mjera.



## **6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**

bp (ili pb) – eng. base pairs (parova baza); Mb – megabaza

ca - karcinom

CNV – eng. copy number variants

CRC – kolorektalni karcinom

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EC – karcinom endometrija

FAP – obiteljska adenomatozna polipoza

HNPCC – hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom

IHC – imunohistokemijsko testiranje

LS – Lynch sindrom

MLPA – metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi

MMR – sustav za popravak pogrešno ugrađenih baza

MSI – mikrosatelina nestabilnost

NGS – sekvenciranje nove generacije

PCR – lančana reakcija polimeraze

SNP – polimorfizam jednog nukleotida

## 7. LITERATURA

Cohen SA, Pritchard CC, Jarvik GP. Lynch Syndrome: From Screening to Diagnosis to Treatment in the Era of Modern Molecular Oncology. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2019, 20, 293-307.

Duraturro F, Liccardo R, De Rosa M, Izzo P. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncol Lett*, 2019, 17(3), 3048-3054.

Fishel R. Mismatch Repair. *J Biol Chem*, 2015, 290(44), 26395–26403.

Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*, 2016, 51, 19–26.

Giardiello FM, Allen JJ, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, Church JM, Dominitz JA, Johnson DA, Kaltenbach T, Levin TR, Lieberman DA, Robertson DJ, Syngal S, Rex DK. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 2014, 147, 502–526.

Gylling A, Ridanpää M, Vierimaa O, Aittomäki K, Avela K, Kääriäinen H, Laivuori H, Pöyhönen M, Sallinen SL, Wallgren-Pettersson C, Järvinen HJ, Mecklin JP, Peltomäki P. Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome. *Int J Cancer*, 2009, 124(10), 2333–2340.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020., Bilten 45, Zagreb, 2022.

Idos G, Valle L. Lynch Syndrome. U: Gene Reviews. Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, urednici, Seattle (WA), University of Washington, Seattle, 2004 (update: 2021).

InSiGHT variants databases, <https://www.insight-group.org/variants/databases/>, pristupljeno 15.4.2023.

Kapitanović S. Molecular stratification of sporadic and hereditary colorectal cancer – mini review. *Med Sci*, 2017, 44, 73-79.

Li GM. Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair. *Cell Res*, 2008, 18, 85–98.

Liccardo R, De Rosa M, Izzo P, Duraturo F. Novel Implications in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome. *Gastroenterology Research and Practice*, 2017, 1–12.

Martín-López JV, Fishel R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 2013, 12(2), 159–168.

MLPA® General Protocol - Instructions For Use, MDP version-008, 2002.

<https://www.mrcholland.com>, pristupljeno 15.4.2023.

Nacionalni strateški okvir protiv raka do 2030., 2020, Zagreb, Narodne novine, broj 141 (NN/141/2020).

Principle of MLPA, <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique>, pristupljeno 15.4.2023.

Robinson Lagerstedt K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nilbert M, Lindblom A. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(4), 291–299.

Schneider NB, Pastor T, Paula AE, Achatz MI, Santos ÂRD, Vianna FSL, Rosset C, Pinheiro M, Ashton-Prolla P, Moreira MÂM, Palmero, EI. Germline MLH1, MSH2 and MSH6 variants in Brazilian patients with colorectal cancer and clinical features suggestive of Lynch Syndrome. *Cancer Med*, 2018, 7(5), 2078–2088.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12), e57.

Sehgal R, Sheahan K, O’Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC. Lynch Syndrome: An Updated Review. *Genes*, 2014, 5, 497–507.

Sertić J i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb, Medicinska naklada 2. izdanje, 2014, str.572-573.

Sobocińska J, Kolenda T, Teresiak A, Badziąg-Leśniak N, Kopczyńska M, Guglas K, Przybyła A, Filas V, Bogajewska-Ryłko E, Lamperska K, Mackiewicz A. Diagnostics of mutations in MMR/EPCAM genes and their role in the treatment and care of patients with Lynch syndrome. *Diagnostics*, 2020, 10, 786.

Turnpenny PD, Ellard S. Emeryjeve Osnove medicinske genetike. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, 14. izdanje, str.63-67

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih tumora. Sa stajališta nasljeđivanja razlikujemo sporadični, obiteljski i nasljedni oblik raka pri čemu je svega 5% nasljedno. Lynch sindrom (LS) nasljedni je CRC sindrom uzrokovan nasljednom promjenom u jednom od gena zaduženih za popravak krivo sparenih baza (MMR) - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* ili *EPCAM* genu. Iako su točkaste mutacije najčešći tip mutacije, >20% otpada i na velike genomske promjene (delecije i duplikacije). Upravo zbog prisutnosti različitih genskih promjena u LS, u dijagnostici je neophodna upotreba komplementarnih metoda koje će detektirati sve moguće promjene u genima. Hipoteza ovog istraživanja je da korištenje MLPA metode, kao komplementarne metode NGS metodi, može povećati dijagnostičku osjetljivost genetičkog testiranja pacijenata sa kliničkom sumnjom na LS. U istraživanje je uključeno 22 ispitanika koji su prošli genetičko savjetovanje i kod kojih je postavljena klinička sumnja na Lynch sindrom. Kod 6 pacijenata pronađena je točkasta promjena NGS metodom pa ti uzorci nisu analizirani MLPA metodom. U istraživanju su detektirane dvije velike delecije karakterizirane kao patogene - delecija *MSH2* eksona 1 i regije *upstream* te delecija eksona 9-15 gena *MLH1*. Primjenom MLPA u kombinaciji sa NGS metodom nasljedna promjena u MMR genima detektirala se kod 36,4% pacijenata uključenih u istraživanje, dok bi primjenom samo sekvenciranja taj postotak iznosio 27,3%. Dakle, MLPA se pokazala korisnom nadopunom NGS metodi i njeno uvođenje u rutinsku dijagnostiku bilo bi opravdano.

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies. From a genetic point of view, it comes in sporadic, familial or hereditary forms. Hereditary forms of cancer are found in only 5% of all cancer cases. Lynch syndrome (LS) is a cancer-susceptibility syndrome caused by a germline mutation in one of the mismatch repair genes - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* or *EPCAM* gene. Genetic testing focuses on determining germline alteration in MMR genes. Although point mutations are the most common change in MMR genes, >20% are large genomic rearrangements (deletions and duplications). It is therefore essential to use different complementary molecular methods to detect all potential changes in MMR genes. Hypothesis of this research is that combined usage of MLPA and NGS can increase diagnostic sensitivity of genetic testing. The research included 22 LS-suspected cases. Point mutations were detected by sequencing in 6 cases and pathogenic large genomic rearrangements were detected in two cases – *MSH2* del ex1 and *upstream* and *MLH1* del ex9-15. Combined usage of sequencing and

MLPA method resulted in detecting alterations in 36,4% of patients, whereas using sequencing by itself, alterations would be detected in 27,3% of patients. In conclusion, MLPA has shown to be very useful in diagnostics of LS and its implementation in routine testing would benefit both patients and health care providers.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb  
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### PRIMJENA MLPA METODE U MOLEKULARNOJ DIJAGNOSTICI LYNCH SINDROMA

EMA VODOLŠAK

#### SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih tumora. Sa stajališta nasljeđivanja razlikujemo sporadični, obiteljski i nasljedni oblik raka pri čemu je svega 5% nasljedno. Lynch sindrom (LS) nasljedni je CRC sindrom uzrokovan nasljednom promjenom u jednom od gena zaduženih za popravak krivo sparenih baza (MMR) - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* ili *EPCAM* genu. Iako su točkaste mutacije najčešći tip mutacije, >20% otpada i na velike genomske promjene (delecije i duplikacije). Upravo zbog prisutnosti različitih genskih promjena u LS, u dijagnostici je neophodna upotreba komplementarnih metoda koje će detektirati sve moguće promjene u genima. Hipoteza ovog istraživanja je da korištenje MLPA metode, kao komplementarne metode NGS metodi, može povećati dijagnostičku osjetljivost genetičkog testiranja pacijenata sa kliničkom sumnjom na LS. U istraživanje je uključeno 22 ispitanika koji su prošli genetičko savjetovanje i kod kojih je postavljena klinička sumnja na Lynch sindrom. Kod 6 pacijenata pronađena je točkasta promjena NGS metodom pa ti uzorci nisu analizirani MLPA metodom. U istraživanju su detektirane dvije velike delecije karakterizirane kao patogene - delecija *MSH2* eksona 1 i regije *upstream* te delecija eksona 9-15 gena *MLH1*. Primjenom MLPA u kombinaciji sa NGS metodom nasljedna promjena u MMR genima detektirala se kod 36,4% pacijenata uključenih u istraživanje, dok bi primjenom samo sekvenciranja taj postotak iznosio 27,3%. Dakle, MLPA se pokazala korisnom nadopunom NGS metodi i njeno uvođenje u rutinsku dijagnostiku bilo bi opravdano.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 9 grafičkih prikaza, 6 tablica i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Lynch sindrom, MLPA, MMR, NGS, nasljedne mutacije, nasljedni rak

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ivana Rako**, Klinički bolnički centar Zagreb

**Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of laboratory diagnostics  
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### APPLICATION OF THE MLPA METHOD IN MOLECULAR DIAGNOSTICS OF LYNCH SYNDROME

**Ema Vodoljšak**

#### SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies. From a genetic point of view, it comes in sporadic, familial or hereditary forms. Hereditary forms of cancer are found in only 5% of all cancer cases. Lynch syndrome (LS) is a cancer-susceptibility syndrome caused by a germline mutation in one of the mismatch repair genes - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* or *EPCAM* gene. Genetic testing focuses on determining germline alteration in MMR genes. Although point mutations are the most common change in MMR genes, >20% are large genomic rearrangements (deletions and duplications). It is therefore essential to use different complementary molecular methods to detect all potential changes in MMR genes. Hypothesis of this research is that combined usage of MLPA and NGS can increase diagnostic sensitivity of genetic testing. The research included 22 LS-suspected cases. Point mutations were detected by sequencing in 6 cases and pathogenic large genomic rearrangements were detected in two cases – *MSH2* del ex1 and upstream and *MLH1* del ex9-15. Combined usage of sequencing and MLPA method resulted in detecting alterations in 36,4% of patients, whereas using sequencing by itself, alterations would be detected in 27,3% of patients. In conclusion, MLPA has shown to be very useful in diagnostics of LS and its implementation in routine testing would benefit both patients and health care providers.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 9 figures, 6 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Lynch syndrome, MLPA, MMR, hereditary cancer, germline mutations

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Rako, Ph.D.** University Hospital Center Zagreb

**Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.