

# Primjena komparativne hibridizacije genoma na mikropostroju (aCGH) u utvrđivanju genetičkih uzroka razvojnog zaostajanja

---

**Vučemilović-Jurić, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:231204>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Valentina Vučemilović-Jurić**

**PRIMJENA KOMPARATIVNE**  
**HIBRIDIZACIJE GENOMA NA**  
**MIKROPOSTROJU (aCGH) U**  
**UTVRĐIVANJU GENETIČKIH UZROKA**  
**RAZVOJNOG ZAOSTAJANJA**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Valentina Vučemilović-Jurić**

**PRIMJENA KOMPARATIVNE  
HIBRIDIZACIJE GENOMA NA  
MIKROPOSTROJU (aCGH) U  
UTVRĐIVANJU GENETIČKIH UZROKA  
RAZVOJNOG ZAOSTAJANJA**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima 34 lista, 9 tablica i 3 slike.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli u izradi završnog rada, a posebice svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović na vodstvu i savjetima.

Zahvaljujem Neni Arvaj, zdr. lab. tehn., na praktičnoj pomoći, stručnim savjetima i ugodnom druženju u laboratoriju.

Zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom izrade završnog rada.

## POPIS KRATICA

aCGH	komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju
ASD	poremećaji iz autističnog spektra
BAC	umjetni kromosom iz bakterije
CA	kromosomske aberacije
CMA	kromosomski mikropostroj
CNV	varijante u broju kopija
DD	razvojno zaostajanje
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
ID	intelektualno zaostajanje
IQ	kvocijent inteligencije
MCA	višestruke kongenitalne anomalije
MLPA	višestruko umnažanje vezanih sonda
MR	mentalna retardacija
PAC	P1-dobiveni umjetni kromosom
PCR	lančana reakcija polimeraze
SNP	polimorfizam jednog nukleotida
VOUS	varijante nepoznatog kliničkog značenja

## SADRŽAJ

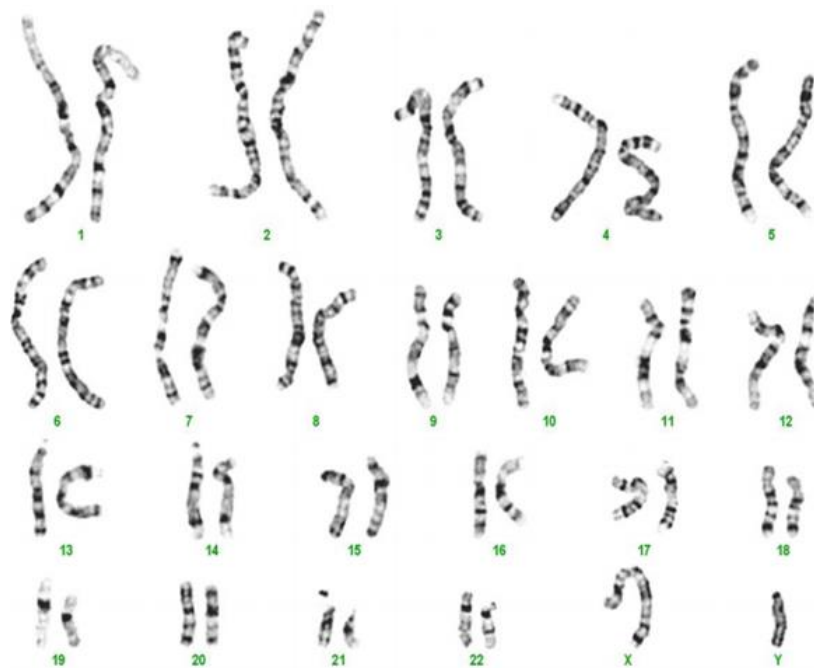
1. UVOD.....	1
1.1 Kromosomske abnormalnosti .....	1
1.1.1 Kromosomske mikrolelecije i mikroduplikacije .....	2
1.2 Razvojni poremećaji.....	2
1.3 Analiza genoma korištenjem kromosomskog mikropostroja .....	3
2. CILJEVI .....	6
3. ISPITANICI I METODE .....	7
3.1 Ustroj studije .....	7
3.2 Ispitanici .....	7
3.3 Metode.....	7
3.3.1 Izolacija genomske DNA.....	8
3.3.2 Provjera kvalitete izolirane DNA.....	8
3.3.3 Priprema uzoraka prije obilježavanja .....	9
3.3.4 Fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA .....	10
3.3.5 Pročišćavanje označene DNA.....	11
3.3.6 Hibridizacija uzoraka na mikropostroju .....	11
3.3.7 Pranje i skeniranje mikropostroja.....	11
3.3.8 Analiza podataka.....	12
4. REZULTATI.....	13
5. RASPRAVA .....	18
6. ZAKLJUČAK .....	22
7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY .....	24
9. LITERATURA .....	25
10. ŽIVOTOPIS.....	28

## 1. UVOD

### 1.1 Kromosomske abnormalnosti

Temelji humane citogenetike postavljeni su 1956. godine kada su Tijo i Levan objavili da normalan broj kromosoma čovjeka iznosi 46 (1). Ljudi normalnog broja kromosoma imaju 23 para kromosoma; 22 para autosoma (kromosomi 1-22) i par spolnih kromosoma koji se razlikuju u žena (XX) i muškaraca (XY).

Kromosomske anomalije predstavljaju promjene u genomu. Mogu nastati spontano ili kao posljedica izloženosti čovjeka ionizirajućem zračenju i ostalim genotoksičnim agensima, točnije gubitkom, dodavanjem ili premještanjem segmenata kromosoma u mehanizmu popravka loma dvolančane DNA (deoksiribonukleinska kiselina – DNA) (2, 3). Razlikujemo strukturne promjene, odnosno kromosomske aberacije (engl. *chromosomal aberration* – CA) i promjene u broju kromosoma. Strukturna promjena kromosoma može biti balansirana ili nebalansirana. U balansirane strukturne aberacije ubrajamo inverzije i recipročne translokacije koje, za razliku od nebalansiranih strukturnih aberacija, ne uzrokuju promjene u broju kopija DNA. Nebalansirane translokacije, delecije, duplikacije i marker kromosomi uvijek mijenjaju broj kopija DNA u genomu (4).



Slika 1. Prikaz standardnog muškog kariotipa (46, XY). Prilagođeno iz (4)



### 1.1.1 Kromosomske mikrodelecije i mikroduplikacije

Strukturne kromosomske promjene veličinom manje od 5 Mb predstavljaju submikroskopske aberacije; mikrodelecije u slučaju delecije (manjka) DNA sekvenci i mikroduplikacije u slučaju duplikacije (viška) DNA sekvenci (4). Kromosomske mikrodelecije i mikroduplikacije povezuju se sa sindromskim oblicima intelektualnog zaostajanja i razvojnog zaostajanja još od 1980.-ih godina (5).

Kliničke značajke mikrodelecijskih sindroma su složene i raznovrsne; postoji širok opseg fenotipskih manifestacija. Karakteristične srčane mane uočene su u svakom od sindroma, a često je prisutna i karakteristična morfologija lica, što pomaže usmjeriti obradu pacijenta i olakšati donošenje dijagnoze. Mikroduplikacijski sindromi znatno su rjeđe uočeni od mikrodelecijskih; detektirano je i opisano tek nekoliko mikroduplikacija (6).

## 1.2 Razvojni poremećaji

Mentalna retardacija (MR)/razvojno zaostajanje (DD) stanje je zaostalost ili nepotpunog razvoja uma, posebno karakterizirano oštećenjem sposobnosti koje se očituju za vrijeme razvoja, odnosno, sposobnosti koje pridonose cjelokupnom stupnju razvoja inteligencije: mišljenje, govor, motorika i sposobnosti ostvarivanja društvenog kontakta (7). Analiza kromosoma u sklopu kliničkog genetičkog testiranja standardna je praksa za bolesnike s nerazjašnjenim razvojnim zaostajanjem/intelektualnim poteškoćama (engl. *developmental delay/intellectual disability* – DD/ID), poremećajima iz autističnog spektra (engl. *autism spectrum disorders* – ASD) i višestrukim kongenitalnim anomalijama (engl. *multiple congenital anomalies* – MCA). Zbog visoke prevalencije u populaciji, navedene kategorije poremećaja čine najveći udio citogenetičkog testiranja (8). Incidencija DD/ID iznosi oko 3% u općoj populaciji, dok ASD pogađa ~1:150 osoba (9-11).

Razvojno zaostajanje (DD) je podskupina razvojnog invaliditeta definirana kao značajno zaostajanje u dvije ili više od navedenih kategorija: motorika, govor, mišljenje i svakodnevne aktivnosti (9). Intelektualno zaostajanje (ID) karakterizira značajno ograničenje intelektualnih sposobnosti i adaptivnog ponašanja s početkom prije dobi od 18 godina. Uglavnom se dijagnosticira IQ (engl. *intelligence quotient* – IQ) testiranjem pri kojem je rezultat IQ niži od 70, što znači da se dijagnoza često postavlja tek u kasnijem djetinjstvu ili ranijoj odrasloj dobi. Ipak, sumnja na ID obično se javlja već u ranijoj životnoj dobi zbog zaostajanja u razvoju, uključujući motorno, kognitivno i zaostajanje u govoru (12, 13). Višestruke kongenitalne

anomalije (MCA) pojavljuju se u 2-3% novorođenačke populacije (14). Kad su DD i ID povezani s višestrukim kongenitalnim anomalijama, većinom su uzrok kromosomske abnormalnosti (15). Za poremećaje iz autističnog spektra (ASD) karakteristične su neodgovarajuće socijalne vještine i komunikacija, ponavljajuća ponašanja te uzak opseg interesa. Brojna djeca uz ASD imaju i ID, a otprilike 75% ima doživotne poteškoće zbog kojih zahtijevaju opsežnu socijalnu i edukacijsku potporu (12).

Opisani poremećaji najčešće su uzrokovani varijantama u broju kopija (engl. *copy number variants* – CNV) genoma. CNV-i se definiraju kao višak ili manjak određenog odsječka DNA u odnosu na referentni humani genom te se ujedno po tome principu i detektiraju. Mjere se u kilobazama, megabazama, a ponekad su zahvaćeni i cijeli kromosomi. S obzirom na funkciju, klinički značaj i broj gena koji obuhvaćaju, neke varijante uzrokuju bolest, no mnoge su benigne (16).

### 1.3 Analiza genoma korištenjem kromosomskog mikropostroja

Termin CMA (engl. *chromosomal microarray* – CMA) obuhvaća komparativnu genomsku hibridizaciju na mikropostroju (engl. *array comparative genomic hybridization* – aCGH) i mikropostroje s polimorfizmima jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism* – SNP). CMA tehnologija prvenstveno se koristila za profiliranje genoma zdrave populacije, a potom da bi se otkrili CNV-i u osoba s razvojnim poremećajima (17).

Analiza genoma na broj kopija korištenjem kromosomskog mikropostroja često je tražen klinički genetički test za ovu populaciju bolesnika. Štoviše, prema mišljenju brojnih znanstvenika, ovakva analiza trebala bi biti prvi korak u genetičkom testiranju bolesnika s DD/ID, ASD i MCA (8). Više od 80% kromosomskih aberacija nađenih kod osoba s razvojnim zaostajanjem su submikroskopske te su, kao takve, nevidljive klasičnim citogenetičkim metodama. Također, većina bolesnika nema dovoljno specifičnih obilježja iz osobne anamneze i/ili kliničkog pregleda da bi ukazali na određeni uzrok, bio on genetički ili ne (17). Smatra se da je uzrok ID/MR u 25-50% slučajeva genetički (18). Identifikacija etiologije poremećaja od iznimne je važnosti budući da omogućuje bolje razumijevanje stanja bolesnika, adekvatniju i usmjereniju medicinsku skrb, ali i genetičko savjetovanje obitelji te plan skrbi u sljedećim trudnoćama.

Povećanje razine otkrivanja submikroskopskih promjena postignuto je zamjenom metafaznih kromosoma s DNA odsječcima na mikropostroju. U početku su to bili BAC-ovi

(engl. *bacterial artificial chromosome*)/PAC-ovi (engl. *P1-derived artificial chromosome*), PCR produkti, a na kraju sintetizirani oligonukleotidi učvršćeni na predmetno stakalce (19). Na kasnijim su mikropostrojima ciljane subtelomerne i pericentromerne regije udružene sa sondama osovine (engl. *backbone*) koje su ravnomjerno raspoređene u ~1 Mb genomskim intervalima, ali s nižom gustoćom i preko cijelog genoma, kako bi otkrivanje velikih delecija i duplikacija bilo olakšano (20). Većina CMA koji se danas koriste omogućuju otkrivanje jako malih CNV-a (veličine <10 kb) jer često imaju više od jednog milijuna sonde te zbog prostiranja duž cijelog humanog genoma (17). Dijagnostički prinos CMA od 15-20% (u usporedbi s ~3% za klasičnu kariotipizaciju) odredio je pregled 33 studije koje su obuhvatile 21,698 bolesnika s DD/ID, ASD ili MCA (8).

Iako klasična kariotipizacija omogućuje pregled i analizu svih kromosoma te otkrivanje balansiranih i nebalansiranih kromosomskih aberacija, nedostatak joj je što se osniva na subjektivnoj procjeni osobe koja analizira, stoga postoje značajne varijacije u razinama otkrivanja aberacija među osobama i laboratorijima. Za razliku od klasične kariotipizacije, CMA je tehnički manje zahtjevan i podložan je automatizaciji. Može se izvoditi s malom količinom početnog materijala, a po potrebi se može koristiti i umnožavanje cijeloga genoma. Za razliku od analize kariotipa, CMA ne treba stanice koje se dijele, što mu daje prednost u izvođenju studija na post mortem ili mrtvim fetalnim uzorcima (17).

Dijagnostika DD/ID unaprijeđena je primjenom subtelomerne fluorescentne in situ hibridizacije (engl. *fluorescence in situ hybridization* – FISH) te višestrukog umnažanja vezanih sonde (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification* – MLPA). Navedene metode otkrivale su subtelomerne promjene, ali i poznate mikrodelecijske/mikroduplikacijske sindrome (21). Iako MLPA i FISH imaju znatno veću rezoluciju od klasične kariotipizacije, navedene metode ograničene su na ciljane segmente genoma, dok je aCGH tehnikom moguće pregledati čitav genom. Također, rezultate dobivene MLPA metodom potrebno je potvrditi drugom, specifičnijom tehnikom kao što je FISH ili aCGH (22).

aCGH mikropostroji sadrže segmente DNA opisane u genomskim bazama podataka (23). Rezolucija im ovisi o dizajnu platforme; platforme mogu sadržavati od 40 tisuća do 1 milijuna probi. Rezolucija ovisi i o tome obuhvaćaju li probe lokuse poznatih mikrodelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma (engl. *targeted array*) ili pak u većim ili manjim razmacima pokrivaju cijeli genom (engl. *whole genomic array*) (4). Fluorescentno označena DNA pacijenta i normalne ljudske kontrolne DNA nanosi se na pločicu te se hibridizira na odgovarajuće DNA segmente. Fluorescentni signal se potom analizira te dobivene vrijednosti

omogućuju detekciju područja s različitom hibridizacijom pacijentove DNA u usporedbi s kontrolnom DNA. Prvi mikropostroji za analizu čitavog genoma sadržavali su uglavnom BAC-ove koji uspješno detektiraju submikroskopske CNV-e, ali zbog svoje veličine (100-200 kb) mogu propustiti promjene u kromosomu manje od veličine klona. Oligonukleotidi su mnogo manje probe (25-60 bp) te mikropostroji s oligonukleotidima mogu detektirati manje kromosomske promjene nego mikropostroji s BAC-ovima, ali će s većom vjerojatnošću detektirati i male promjene u kromosomu s nerazjašnjenim kliničkim značenjem (23).

Interpretacija varijanti nepoznatog kliničkog značenja (engl. *variants of uncertain clinical significance* – VOUS) poseban je problem genetičarima. Problemi vezani za određivanje VOUS-a mogu se riješiti izborom razine rezolucije platforme koja balansira osjetljivost i specifičnost, povećanim dijeljenjem podataka preko baza podataka te analizom genoma roditelja radi utvrđivanja je li CNV nastao *de novo* ili je naslijeđen. Općenito, CNV-i se mogu kategorizirati kao 1. patogeni – dobro poznati sindromi, *de novo* varijante i promjene >400 kb; 2. vjerojatno patogeni – manje opisani poremećaji, *de novo* varijante i promjene >400 kb ili zahvaćaju gene za koje znamo da su klinički važni; 3. benigni – opisani kod zdravih osoba i/ili naslijeđeni od zdravog roditelja; 4. vjerojatno benigni – nisu prethodno opisani, ali su naslijeđeni od zdravog roditelja; 5. VOUS (17). Patogene varijante detektirane su u 15-20% ID/MR pacijenata (24, 25). Ipak, nisu svi CNV-i potpune penetrantnosti i ne uzrokuju svi spektar fenotipova, uključujući intelektualno zaostajanje, autizam, shizofreniju i dismorfiju. Takvi CNV-i mogu predstavljati izazov u genetičkom savjetovanju. Više varijanti nepoznatog kliničkog značaja pronalazi se korištenjem mikropostroja veće gustoće (25).

## **2. CILJEVI**

Cilj ovog istraživanja je ispitati postojanje genetičkih uzroka razvojnog zaostajanja na uzorku od 8 ispitanika primjenom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1 Ustroj studije**

Retrospektivno istraživanje genetičke etiologije razvojnog zaostajanja (RZ)/mentalne retardacije (MR).

#### **3.2 Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 8 ispitanika (5 djevojčica i 3 dječaka) s uputnom dijagnozom razvojnog zaostajanja. Ispitanici su upućeni s Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Informirani pristanak roditelja/skrbnika pribavljen je za sve ispitanike te je pohranjen u arhiv Laboratorija za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku. Krv ispitanika uzorkovana je radi izrade standardne kariotipizacije i analize za fragilni X sindrom. Uredan nalaz navedenih analiza unatoč uputnoj dijagnozi mentalnog zaostajanja upućuje dijete s intelektualnim poteškoćama na daljnju obradu sofisticiranijim metodama. Pozitivan (patološki) nalaz inicijalnih genetičkih metoda također može biti povod za primjenu metoda veće rezolucije radi detaljnije obrade pacijenta i dobivanja što preciznije dijagnoze. Krv je uzorkovana minimalno invazivno; jednokratnom venepunkcijom periferne krvi u epruvete s antikoagulansom EDTA. Svaki je uzorak označen jedinstvenim laboratorijskim brojem. Uzorci su do analize pohranjeni na -20°C u Laboratoriju. Svim ispitanicima napravljena je analiza cijelog genoma metodom komparativne hibridizacije genoma na mikropostroju (aCGH) pomoću SurePrint G3 Human CGH Bundle, 8x60 kita prema uputama proizvođača (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku odobrilo je provođenje istraživanja.

#### **3.3 Metode**

Protokol komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju (aCGH) uključuje izolaciju i provjeru kvalitete izolirane DNA, fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA, hibridizaciju na mikropostroju, ispiranje mikropostroja, skeniranje te analizu podataka. U istraživanju je korišten SurePrint G3 Human CGH Bundle, 8×60K Agilent mikropostroj prema uputama proizvođača (Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood, Cells, or Tissues (with a High Throughput option) Protocol Version 7.5).

### 3.3.1 Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolira se iz 2 ml periferne venske krvi upotrebom komercijalnog kita prema protokolu proizvođača (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Uzorci krvi pohranjuju se na  $-20^{\circ}\text{C}$  te se neposredno prije izolacije odmrzavaju na sobnoj temperaturi. Prije početka rada potrebno je pripremiti reagense prema uputi proizvođača (Qiagen, Hilden, Germany), kao i potreban materijal. U tubice za centrifugiranje od 15 ml pipetira se 200  $\mu\text{l}$  proteinaze K, enzima koji služi za neselektivnu razgradnju proteina. Zatim se dodaje 2 ml uzorka pune krvi i 2,4 ml AL pufera koji služi za liziranje stanica te se smjesa promiješa. Smjesa se potom inkubira na  $70^{\circ}\text{C}$  kroz 10 minuta. Nakon inkubacije dodaje se 2 ml etanola (96 – 100%) kako bi došlo do precipitacije DNA. Nakon miješanja, pola se sadržaja otopine prebacuje u QIAamp Midi kolone smještene u tubice za centrifugiranje od 15 ml. Kolona se zatvori i centrifugira na  $1850 \times g$  kroz 3 minute. Supernatant se zatim odlijeva, kolona se premješta u novu tubicu za centrifugiranje od 15 ml te se dodaje druga polovica početne otopine i ponavlja se postupak s centrifugiranjem ( $1850 \times g/3 \text{ min}$ ). Supernatant se opet odbacuje, a kolona se stavlja u novu tubicu za centrifugiranje u koju se dodaje 2 ml pufera AW1 te slijedi centrifugiranje na  $4500 \times g$  kroz 1 minutu. Postupak se ponavlja s dodavanjem pufera AW2, ali centrifugiranje se provodi u trajanju od 15 minuta. Tijekom postupka se koriste različiti puferi kako bi se postigla promjena ionske jakosti; visoka ionska jakost omogućuje vezanje DNA za kolonu te se nečistoće potom mogu isprati. Na kraju se dodaje 200  $\mu\text{l}$  AE pufera niske ionske jakosti, koji potiče otpuštanje DNA, i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi prije centrifugiranja na  $4500 \times g$  kroz 2 minute. DNA se čuva u AE puferu na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize.

### 3.3.2 Provjera kvalitete izolirane DNA

#### Provjera čistoće i koncentracije izolirane DNA

Čistoća i koncentracija izolirane DNA određene su NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, US) spektrofotometrom iz 1  $\mu\text{l}$  DNA izolata. Koncentracija DNA određuje se na temelju apsorpcijske vrijednosti na 260 nm valne duljine, a izražava se u  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Čistoća DNA određuje se na temelju omjera valnih duljina DNA/proteini (260/280 nm) koji iznosi približno 1,8 te omjera DNA/soli (260/230 nm) koji iznosi 2,0 – 2,2. Koncentracija izolirane DNA također se određuje fluorimetrijski (Qubit dsDNA BR Assay Kit). Qubit uređaj kalibrira se pomoću 2 standarda te se potom redom očitaju koncentracije uzoraka. Ukoliko su

dobivene vrijednosti pri 260/230 nm niske, moguće je da se radi o kontaminaciji ostacima soli ili organskim otapalima. Niske vrijednosti dobivene pri 260/280 indiciraju na prisutnost ostataka proteina. Za nastavak rada, potrebno je ponovno pročititi DNA prema uputama proizvođača (Qiagen, Hilden, Germany) te kalibrirati spektrofotometar koristeći odgovarajući pufer. Budući da DNA i RNA imaju apsorbanciju pri istim valnim duljinama, ukoliko je prisutna kontaminacija s RNA doći će do lažno povećanih vrijednosti DNA pri mjerenju; uzorak je zapravo nekvalitetan i potrebno je ponovno pročititi DNA.

### **Provjera kvalitete DNA u agaroznom gelu**

Provjera kvalitete izolirane DNA određuje se elektroforezom u 2% agaroznom gelu. 2% agarozni gel u  $1\times$  TBE puferu (engl. Tris-borate-EDTA) zagrije se do vrenja uz dodatak *Sybr Safe* boje. Uzorci DNA pripremaju se za gel dodavanjem pufera za nanošenje uzoraka (Gel Pilot DNA Loading Dye,  $5\times$ , Qiagen) koji u konačnici čini  $1/5$  volumena uzorka koji se nanosi na gel. Na gel se nanosi i molekularni biljeg poznatih molekularnih masa (DNA Step Ladders, 50bp DNA Step Ladder, Promega). Elektroforeza se odvija pod stalnim naponom od 100 V kroz 30 minuta, nakon čega se DNA vizualizira pomoću UV-transiluminatora. DNA vrpce trebale bi se vidjeti jasno, bez razmazivanja. Degradirana DNA može biti rezultat greške pri označavanju; takvu je DNA potrebno ponovno pročititi.

### **3.3.3 Priprema uzoraka prije obilježavanja**

Obrada DNA prije obilježavanja odvija se direktnom metodom s restriksijskom nukleazom (SureTag Complete DNA Labeling Kit).  $10\times$  Restriction Enzyme Buffer i BSA (uključeni u SureTag Complete DNA Labeling Kit) se odmrznu te se kratko centrifugiraju na mikrocentrifugi. U svaku tubicu dodaje se od 0,2 do 0,5  $\mu\text{g}$  DNA i destilirana voda do ukupnog volumena od 10,1  $\mu\text{l}$ . Pripremi se Digestion Master Mix prema uputama proizvođača te se doda po 2,9  $\mu\text{l}$  svakom uzorku. Uzorci se potom inkubiraju na  $37^\circ\text{C}$  u trajanju od 2 sata, zatim na  $65^\circ\text{C}$  u trajanju od 20 minuta kako bi se inaktivirali enzimi. Na kraju se uzorci pohranjuju na led. Restriksijska digestija odvija se koristeći 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, US).





Slika 3. Uređaj za PCR 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems korišten u istraživanju (fotografija snimljena u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, kolovoz 2019.)

### 3.3.4 Fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA

Fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA (Promega) odvija se odvojeno. Spol testne i kontrolne DNA usklađen je za svaki eksperiment. Na 1  $\mu\text{g}$  testne, kao i kontrolne DNA, u 26  $\mu\text{l}$  1 $\times$  TE pufera (Tris-EDTA, pH 8.0, Molecular grade, Promega) dodaje se 2,5  $\mu\text{l}$  Random Primer-a. Uzorci se inkubiraju na 98 $^{\circ}\text{C}$  10 min te se brzo ohlade na ledu. U testne uzorke stavlja se 19  $\mu\text{l}$  Labeling Master Mix-a koji sadrži Cyanine 5-dUTP, a u kontrolne DNA 19  $\mu\text{l}$  Labeling Master Mix-a koji sadrži Cyanine 3-dUTP (Labeling Master Mix po uzorku: 10  $\mu\text{l}$  5 $\times$  Reaction Buffer + 5  $\mu\text{l}$  10 $\times$  dNTPs + 3  $\mu\text{l}$  Cyanine 3-dUTP ili Cyanine 5-dUTP + 1  $\mu\text{l}$  Exo (-) Klenow). Uzorci se inkubiraju 2 sata na 37 $^{\circ}\text{C}$ , nakon čega se inkubiraju na 65 $^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 10 minuta te zatim ohlade na ledu. Uzorke je moguće pohraniti u trajanju do mjesec dana na -20 $^{\circ}\text{C}$  na tamnom mjestu. Uvjeti za označavanje uzoraka narušeni su ukoliko je Cyanine dUTP previše puta zaleđen i rastopljen te ako je došlo do degradacije enzima zbog previsoke temperature. Cyanine dUTP potrebno je skladištiti na -20 $^{\circ}\text{C}$ , a enzime je potrebno držati na ledu te ih također pohraniti na -20 $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.5 Pročišćavanje označene DNA

Uzorci s označenom DNA centrifugiraju se 1 minutu na  $6\,000 \times g$  kako bi se sadržaj odvojio sa stijenki i čepa. U uzorke se zatim dodaje  $430 \mu\text{l}$   $1 \times \text{TE}$  te se cijeli volumen prebacuje u odgovarajuće obilježene kolone za pročišćavanje (Agilent Purification Column). Uzorci se centrifugiraju 10 minuta na  $14\,000 \times g$ . Nakon centrifugiranja, na uzorke se dodaje  $480 \mu\text{l}$   $1 \times \text{TE}$  te se ponovno centrifugiraju 10 minuta na  $14\,000 \times g$ . Kolone se tada okrenu u čiste tubice volumena 2 ml i centrifugiraju 1 minutu na  $1\,000 \times g$ . Nakon centrifugiranja,  $1,5 \mu\text{l}$  uzorka se analizira na NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, US) spektrofotometru radi kvantifikacije i procjene čistoće DNA.

### 3.3.6 Hibridizacija uzoraka na mikropostroju

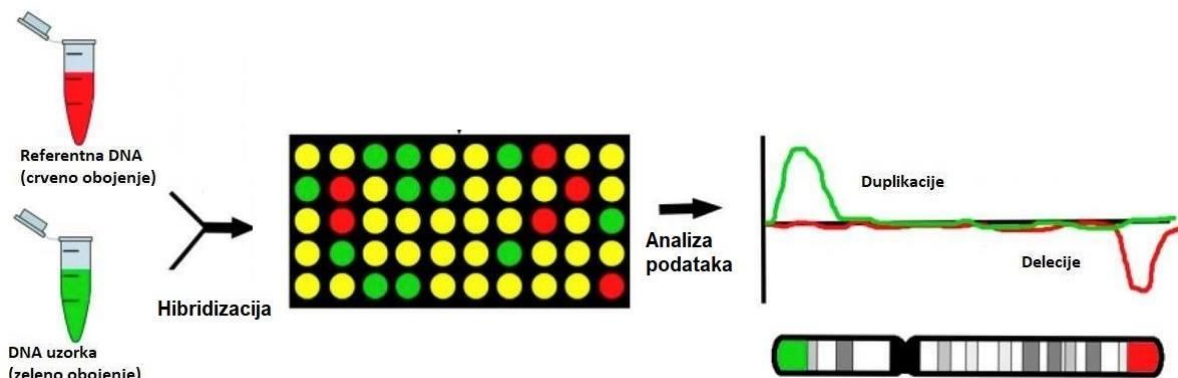
Uzorci za hibridizaciju sparuju se prema spolu i prinosu. Nakon spajanja testnih i kontrolnih DNA, u uzorke se dodaje  $5 \mu\text{l}$  Cot-1 DNA ( $1,0 \text{ mg/ml}$ ),  $11 \mu\text{l}$   $10 \times$  aCGH Blocking Agent te  $55 \mu\text{l}$   $2 \times$  HI-RPM Hybridization Buffer. Inkubacija se provodi 3 minute na  $98 \text{ }^\circ\text{C}$ , a potom 30 minuta na  $37^\circ\text{C}$ . Od svakog se uzorka nanosi po  $100 \mu\text{l}$  na posebno polje pločice (engl. gasket slide), čime se sprječava miješanje uzorka. Mikropostroj se zatim položi aktivnom stranom na uzorke i pričvrsti u nosač.

### 3.3.7 Pranje i skeniranje mikropostroja

Nakon hibridizacije, mikropostroj se izvadi iz nosača te se odvaja od pločice dok je u potpunosti uronjen u Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1. Odvojeni mikropostroj stavlja se na nosač za stakalca te se uranja u novi Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 te se ispiru 5 minuta na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, nosač se stavlja u prethodno zagrijani ( $37^\circ\text{C}$ ) Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 gdje se mikropostroj ispiru 1 minutu na rotacijskoj miješalici. Mikropostroj se zatim stavlja u nosač za skeniranje, a na njega se stavlja Agilent Ozone-Barrier Slide Cover. Skeniranje mikropostroja potrebno je učiniti neposredno nakon pranja. Za skeniranje mikropostroja korišten je Agilent C Scanner uz standardne postavke: Dye channel: R+G (red and green), Scan region: Agilent HD ( $61 \times 21,6 \text{ mm}$ ), Scan resolution:  $3 \mu\text{m}$ , Tiff file dynamic range: 16 bit Red PMT gain: 100%, Green PMT gain: 100%, XDR: <No XDR>.

### 3.3.8 Analiza podataka

Provjera kvalitete aCGH eksperimenta temelji se na evaluaciji parametara dobivenim Feature Extraction softverskim paketom. Standardne postavke evaluacije kvalitete uključuju analizu parametara: BG Noise, Signal Intensity, Signal to Noise, Reproducibility i DLRSD za Cy3 i Cy5 fluorokrome. Podatci su obrađeni Agilent CytoGenomics softverom uz standardne postavke (Default Analysis Method - CGH v2).



Slika 2. Postupak komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju. Prilagođeno iz (26)

#### 4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 8 ispitanika (5 djevojčica i 3 dječaka) s uputnom dijagnozom različitih poremećaja koje povezujemo s razvojnim zaostajanjem. Prije obrade uzoraka pacijenata sofisticiranijom metodom, svima su napravljene standardna kariotipizacija i analiza za fragilni X sindrom, koje je potrebno prve isključiti kod obrade djeteta s intelektualnim poteškoćama. Iako su se prvotne analize pokazale urednima (ispitanici 4, 5, 6 i 8), klinička slika je uključivala niz pokazatelja koje povezujemo s razvojnim zaostajanjem (snižen IQ, dismorfčne crte lica, psihomotorno zaostajanje, stereotipije), stoga je odlučeno analizirati genom koristeći aCGH metodu; tehnologiju veće rezolucije i specifičnosti. U slučaju patološkog nalaza inicijalnog genetičkog testiranja (ispitanici 1, 2, 3 i 7), aCGH tehnika primijenjena je u svrhu dobivanja što preciznije dijagnoze. Od 8 ispitanika, kod 4 ispitanika, odnosno 50% pacijenata, dijagnosticirane su kromosomske anomalije. Anomalije su uočene kod 2 djevojčice i 2 dječaka.

Tablica 1. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 1.

<i>Ispitanik 1</i>	<i>djevojčica stara 6 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	psihomotorno zaostajanje, dismorfija; nisko položene uši, dugačak filtrum, gotsko nepce, široko postavljene mamile, klinodaktilija, epileptični napadaji
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XX,add(16)
<i>Ostali nalazi</i>	roditelji imaju uredne kariotipove
<i>aCGH nalaz</i>	46,XX,add(16)dn.arr[hg19]16p13.11p11.2(16,525,289-28,318,164)x4

Tablica 2. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 2.

<i>Ispitanik 2</i>	<i>dječak star 4 godine</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	psihomotorno zaostajanje, generalna hipotonija, rekurentne respiratorne infekcije, epileptični napadaji, teško intelektualno zaostajanje (IQ 36), stereotipije, asimetrija lubanje i intrakranijskih struktura uočena magnetskom rezonancijom, dismorfija; epikalni nabori, nepce visokog luka, strabizam, nisko položene uši
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XY
<i>Ostali nalazi</i>	MLPA analiza ukazala na duplikaciju u kromosomskoj regiji 21q22.3; roditelji imaju uredne kariotipove
<i>aCGH nalaz</i>	arr[GRCh37]21q22.13q22.2(38668355_41187454)x3dn

Tablica 3. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 3.

<i>Ispitanik 3</i>	<i>djevojčica stara 10 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	niski rast, kraći vrat, pterigij, snižen IQ, teškoće u učenju
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	mos 46,X,derXadd(X)(p22.2)del(X)(p22.3)(18)/45,X(3)
<i>aCGH nalaz</i>	arr[GRCh37] Xp22.33p11.23(219609_48818299)x3

Tablica 4. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 4.

<i>Ispitanik 4</i>	<i>dječak star 10 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	intelektualno zaostajanje, autizam, stereotipije, blaga hipotonija, nizak rast kose na vratu, hipertelorizam
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XY
<i>aCGH nalaz</i>	arr[GRCh38] 6q16.1q16.2(98,693,279-100,083,279)x1

Tablica 5. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 5.

<i>Ispitanik 5</i>	<i>djevojčica stara 11 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	intelektualno zaostajanje, laka mentalna retardacija, gruba motorička nespretnost, povremene stereotipije, fenotipski bez dismorfije
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XX
<i>aCGH nalaz</i>	arr(1-22,X)x2

Tablica 6. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 6.

<i>Ispitanik 6</i>	<i>djevojčica stara 7 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	odgođen upis u osnovnu školu zbog poremećaja hoda i usporenog razvoja govora, bez stereotipija, ispodprosječni psihomotorni razvoj, nekoliko minor stigmi
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XX
<i>Ostali nalazi</i>	uredan nalaz molekularno-genetičke analize za fragilni X sindrom
<i>aCGH nalaz</i>	arr(1-22,X)x2

Tablica 7. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 7.

<i>Ispitanik 7</i>	<i>dječak star 5 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	psihomotorno zaostajanje, nerazvijen govor, hiperaktivnost, klinodaktilija, svijetle kože i kose, prohodao u dobi od 21 mjeseca, kortikalna atrofija mozga uočena magnetskom rezonancom
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XY
<i>Ostali nalazi</i>	FISH analiza na Prader Willi sindrom (46,XY.ish 15q11.2(SNRPNx2)); analiza mikrosatelita na kromosomu 15 (UPD15) – utvrđeno biparentalno nasljeđivanje
<i>aCGH nalaz</i>	arr(1-22)x2,(X,Y)x1

Tablica 8. Uputna dijagnoza i rezultati genetičkih testiranja kod ispitanika 8.

<i>Ispitanik 8</i>	<i>djevojčica stara 6 godina</i>
<i>Uputna dijagnoza</i>	laka mentalna retardacija, bez dismorfija, sporiji razvoj govora
<i>Nalaz GTG pruganja</i>	46,XX
<i>aCGH nalaz</i>	arr(1-22,X)x2

Tablica 9. Prikaz ispitanika prema spolu te pozitivnim (patološkim) i negativnim (urednim) nalazima koristeći aCGH metodu.

	DJEVOJČICE	DJEČACI
PATOLOŠKI NALAZ	2	2
UREDAN NALAZ	3	1
UKUPNO	5	3

Kod svakog pacijenta čiji je nalaz aCGH analize bio pozitivan uočena je jedna vrsta kromosomske aberacije; ili delecija ili duplikacija.



## 5. RASPRAVA

U istraživanju je obrađeno 8 pacijenata s različitim poremećajima čija klinička slika odgovara mentalnoj retardaciji (MR) / razvojnom zaostajanju (RZ). Pacijenti su dobi od 4 do 11 godina. Analizom aCGH metodom pozitivan je rezultat ustanovljen kod 4 pacijenta (50%), odnosno kod 2 djevojčice i 2 dječaka.

Analizirani uzorci periferne krvi uzorkovani su minimalno invazivno; jednokratnom venepunkcijom. Inicijalnim testiranjem, standardnom kariotipizacijom i testiranjem na fragilni X sindrom, nekim su ispitanicima (1, 2, 3 i 7) uočene kromosomske abnormalnosti, dok ostalima (4, 5, 6 i 8) nisu. Sukladno tome, sljedeći je korak bila aCGH analiza pomoću koje je moguće pregledati čitav genom te utvrditi prisutnost delecija i duplikacija na submikroskopskoj razini. Rezultati su pokazali promjene na 6. (ispitanik 4), 16. (ispitanik 1), 21. (ispitanik 2) i X kromosomu (ispitanik 3).

Metoda se pokazala korisnom za analizu pacijenata s idiopatskom MR/DD. Pomoću aCGH tehnologije moguće je detektirati višak (engl. *gain*) ili manjak (engl. *loss*) određenog odsječka DNA u odnosu na referentni humani genom. CMA testiranje se sve više naručuje radi dobivanja dijagnoze za pacijente s nerazjašnjenim DD/ID, ASD i MCA. Specifična dijagnoza iz područja genetike olakšava sveobuhvatnu medicinsku njegu pacijenta, kao i precizno genetičko savjetovanje njegove obitelji (8).

Ispitaniku 4 ovim je istraživanjem dokazana intersticijska delecija u regiji 6q16.1q16.2 veličine 1.4 Mb. Riječ je o 6q16 mikroduplicacijskom sindromu. Smatra se da su geni SIM1, GRIK2, POPDC3 i MCHR2 povezani s kliničkom slikom koja uključuje pretilost, autizam, srčane mane i metaboličke bolesti. Većina pacijenata s intersticijskom delecijom u regiji 6q16 ima fenotip sličan onome kod Prader-Willi sindroma, uključujući pretilost, hipotoniju, kratke šake i stopala te razvojno zaostajanje (27). SIM1 (engl. *SIM bHLH transcription factor 1*) gen ima proteinski produkt bHLHe14 (engl. *Single-minded homolog 1*) koji sudjeluje u procesima neurogeneze, diferencijacije i transkripcije, a najveća razina njegovog eksprimiranja zabilježena je u kvadricepsima (28). Gen GRIK2 također je smješten unutar navedene regije. Smatra se da može biti odgovoran za razvojne poremećaje i mentalnu retardaciju. Produkt navedenog gena je protein Glur6 (engl. *Glutamate receptor ionotropic, kainate 2*) čija je biološka uloga transport iona te regulacija neuroloških procesa (29). POPDC3 je gen s proteinskim produktom Popeye protein 3 (engl. *Popeye domain-containing protein 3*) koji se

ekspirira uglavnom u skeletnom mišićju, a detektiran je i u mišićju srca. Sudjeluje u regulaciji membranskog potencijala i razvoju skeletnog mišićnog tkiva, a smatra se da bi mogao imati ulogu u održavanju rada srca (30). Gen MCHR2 također ima proteinski produkt; MCH-R2 (engl. *Melanin-concentrating hormone receptor 2*) koji je receptor za hormon koji koncentrira melanin te ima ulogu u signalnom putu neuropeptida (31). Delecija u regiji 6q16.1q16.2 otkrivena je i u istraživanju iz 2016. godine gdje je provedena evaluacija pacijenta s intelektualnim zaostajanjem i autizmom. U navedenom slučaju, mikrodelecija u regiji 6q16.1q16.2 bila je udružena s mikrodelecijom u regiji 6q16.3. Budući da otkrivene mikrodelecije obuhvaćaju nekoliko gena koji su uključeni u razvoj i funkciju neurona, autori su ih povezali s kliničkom slikom pacijenta (32). Ispitanik 4 također ima kliničku sliku koja uključuje intelektualno zaostajanje i autizam, uz stereotipije, blagu hipotoniju i hipertelorizam.

Ispitaniku 1 nalaz je ženski kariotip s 4 kopije regije 16p13.11p11.2, a veličina amplificirane regije iznosi  $11.8 \pm 0.1$  Mb. Riječ je o *de novo* slučaju parcijalne tetrasomije 16p. Slijedila je usporedba kliničkih značajki pacijentice s ostalim pacijentima koji su opisani u literaturi s duplikacijom proksimalnog dijela 16p. Čini se da četiri kopije gena na kromosomu 16p11.2-p13.11 dovode do većih poremećaja u razvoju nego što se opisuje u bolesnika s tri doze istih gena. U prilog tome ide i istraživanje na životinjskom modelu; istraživanje na miševima pokazalo je da tetrasomija kromosoma 16 ima mnogo štetnije učinke na embrionalni razvoj od trisomije istog kromosoma (33). Geni koji mogu izazvati patologiju u zahvaćenoj regiji su NDE1, MYH11, ABCC6 i PRRT2. Navedenim genima zajednička je povezanost s razvojnim zaostajanjem. Gen NDE1 s proteinskim produktom NudE (engl. *Nuclear distribution protein nudE homolog 1*) ima ulogu u staničnom ciklusu, diferencijaciji, mitozu i neurogenezi. Protein se nalazi u neuroepitelu mozga u razvoju (34). MYH11 ima proteinski produkt Myosin-11 koji se ekspirira u glatkom mišićju i sudjeluje u mišićnoj kontrakciji (35). Gen ABCC6 ima proteinski produkt MOAT-E (engl. *Multidrug resistance-associated protein 6*) koji sudjeluje u odgovoru na narkotike, vizualnoj percepciji i transmembranskom transportu. Ekspirira se u jetrima i bubrezima te ima vrlo nisku razinu ekspresije u ostalim tkivima (36). Gen PRRT2 s proteinskim produktom DSPB3 (engl. *Proline-rich transmembrane protein 2*) ima ulogu u otpuštanju neurotransmitera i povezuje se s epileptičnim napadajima (37). Ispitanik 1 ima kliničku sliku koja obuhvaća epileptične napadaje, psihomotorno zaostajanje i dismorfiju.

Ispitaniku 2 je korištenjem aCGH tehnike detektirana duplikacija u regiji 21q22.13q22.2 veličine 2.56 Mb, dok mu je prethodno MLPA analizom dokazana duplikacija u regiji 21q22. U zahvaćenoj regiji nalazi se PIGP, gen koji je odgovoran za razvojno i intelektualno

zaostajanje, hipotoniju i epileptične napadaje, što odgovara kliničkoj slici Ispitanika 2 (psihomotorno zaostajanje, hipotonija, epileptični napadaji, IQ 36) (38). U navedenoj kromosomskoj regiji nalazi se i *DYRK1A*, gen koji se povezuje s mentalnom retardacijom (39). U istraživanju provedenom 2018. godine uporabom aCGH metode detektirana je ista duplikacija u pacijenta s fenotipom koji odgovara Downovom sindromu. Navedeni je pacijent, kao i Ispitanik 2, imao uredan nalaz standardne kariotipizacije. S obzirom da veličina duplikacije iznosi svega 2.56 Mb, riječ je o jednoj od najmanjih duplikacija unutar DSCR (engl. *Down Syndrome critical region* – DSCR) koja može dovesti do fenotipa Downovog sindroma (40). Ispitanik 2 i pacijent iz navedenog istraživanja nemaju isti fenotip iako imaju duplikaciju u istoj kromosomskoj regiji. Jedina obilježja koja su zajednička Ispitaniku 2 i pacijentu iz navedenog istraživanja su dismorfija i hipotonija. Ispitanik 2 pokazuje psihomotorno zaostajanje i teško intelektualno zaostajanje (IQ 36), dok pacijent iz navedenog istraživanja pokazuje normalan motorni razvoj i ima IQ 80.

Ispitaniku 3 dokazana je duplikacija regije Xp22.33p11.23 veličine 48.589 Mb. U zahvaćenoj regiji nalaze se geni *SLC9A7* (odgovoran za intelektualno i razvojno zaostajanje), *SYN1* (odgovoran za poteškoće u učenju), *EBP* (odgovoran za intelektualno zaostajanje i nizak rast) te *SHOX* (također odgovoran za nizak rast) (41). Klinička slika Ispitanika 3 uključuje snižen IQ, teškoće u učenju i nizak rast. Ista je duplikacija opisana 2002. godine kao *de novo* parcijalna duplikacija Xp u pacijentice s dismorfijom, uključujući razvojno zaostajanje i mentalnu retardaciju, što djelomično odgovara kliničkoj slici Ispitanika 3 (42).

Ovo istraživanje utvrdilo je pouzdanost aCGH metode u detekciji submikroskopskih promjena. Prednosti aCGH tehnike su mogućnost analize čitavog genoma, tehnička nezahtevnost, podložnost automatizaciji, brzo donošenje dijagnoze te veća rezolucija od standardne kariotipizacije. aCGH testiranje ima visoku cijenu, ali i dalje košta manje od G-pruganja udruženog s FISH testiranjem, a uz to ima veći dijagnostički prinos (8). Ipak, aCGH tehnika ima i ograničenja; zahtjevno određivanje kliničkog značaja varijanti otkrivenih uporabom mikropostroja, odnosno otežana interpretacija varijanti nepoznatog kliničkog značenja (VOUS). Također, izazov u tumačenju nalaza predstavljaju CNV-i s nepotpunom penetrantnošću i/ili promjenjivom ekspresijom. Uz to, problem je i neslaganje u interpretaciji patogenih i benignih CNV-ova između različitih laboratorija. Povećano dijeljenje informacija preko mrežnih baza podataka (pr. DECIPHER, DGV, dbVAR) trebalo bi voditi rješenju većine navedenih problema.

ISCA (engl. *International Standard Cytogenomic Array* – ISCA) konzorcij predložio je klinički algoritam za postnatalno testiranje osoba s nerazjašnjenim DD/ID, ASD ili MCA. Prema njemu, CMA bi trebao biti prvi genetički test za spomenutu skupinu poremećaja, dok FISH, MLPA ili kvantitativni PCR (qPCR) slijede kao popratna, odnosno potvrдна analiza.

Tradicionalne citogenetske metode i dalje su indicirane umjesto (ili prije) CMA u slučaju prepoznatljivih sindroma kao što su Downov sindrom (trisomija 21), Patauov sindrom (trisomija 13) i Klinefelterov sindrom (47, XXY). Također, konvencionalna analiza kromosoma je i dalje najprikladniji test za otkrivanje potencijalnih uravnoteženih translokacija u slučajevima parova s povijesti ponavljajućih pobačaja i obitelji kojima je već utvrđeno postojanje balansiranih poremećaja (8). Međutim, u slučaju osoba s ID/DD, ASD ili MCA, više od 80% detektiranih kromosomskih aberacija je submikroskopske prirode, stoga ih nije moguće detektirati klasičnim citogenetičkim metodama (17).

## 6. ZAKLJUČAK

1) Pomoću aCGH metode je kod 50% pacijenata utvrđena promjena u genomu koja odgovara kliničkoj slici pacijenta, a prethodno nije dokazana koristeći konvencionalne citogenetičke metode ili dijagnoza dobivena takvim metodama nije bila dovoljno precizna.

2) aCGH metoda pokazala se učinkovitim metodom probira za utvrđivanje genetičkih uzroka razvojnog zaostajanja zbog većeg dijagnostičkog prinosa u usporedbi sa standardnom kariotipizacijom (dijagnostički prinos za CMA iznosi 15-20%, a za standardnu kariotipizaciju 3%), veće rezolucije (razina razlučivanja je kod aCGH 50 do 1000 puta veća nego u rutinskoj analizi kromosoma), ekonomske isplativosti (ukoliko se koristi kao metoda probira genoma osoba s nerazjašnjenim ID/DD, ASD ili MCA), komercijalne dostupnosti i automatizacije.

## 7. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je otkrivanje genetičkih uzroka razvojnog zaostajanja aCGH metodom.

**Ustroj studije:** Retrospektivno istraživanje genetičke etiologije razvojnog zaostajanja (RZ)/mentalne retardacije (MR).

**Ispitanici i metode:** Ispitanici u ovom istraživanju su djeca, njih 8 (5 djevojčica i 3 dječaka), upućena s Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek zbog kliničke slike koja upućuje na razvojno zaostajanje. Svim je pacijentima prvo napravljeno genetičko testiranje koje se sastoji od kariotipizacije i molekularno-genetičke analize za fragilni X sindrom. Inicijalno testiranje pokazalo je uredan nalaz u slučaju ispitanika 4, 5, 6 i 8 te patološki nalaz kod ispitanika 1, 2, 3 i 7. Idući korak u testiranju bila je analiza genoma aCGH metodom na platformi SurePrint G3 Human CGH Bundle, 8×60K (Agilent Technologies, Santa Clara, US), sofisticiranijom metodom od onih korištenih u prvotnom genetičkom testiranju.

**Rezultati:** Analizom su dokazane kromosomske promjene kod 4 ispitanika (2 djevojčica i 2 dječaka), odnosno kod 50% ispitanika. Promjene su uočene na kromosomima 6, 16, 21 i X.

**Zaključak:** aCGH metoda pokazala se izvrsnom metodom probira za pacijente s nerazjašnjenim ID/DD, ASD i MCA budući da otkriva submikroskopske promjene koje su najčešći uzrok navedenih poremećaja, a koje je nemoguće detektirati standardnom kariotipizacijom.

**KLJUČNE RIJEČI:** aCGH; razvojno zaostajanje; mentalna retardacija; submikroskopske aberacije

## 8. SUMMARY

### APPLICATION OF COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION ON MICROARRAYS IN DETERMINING GENETIC CAUSES OF MENTAL RETARDATION

**Objectives:** The objective of this study was to discover genetic causes of developmental delay using aCGH method.

**Study design:** Retrospective study of genetic causes of developmental delay (DD)/mental retardation (MR).

**Participants and methods:** 8 children (5 girls and 3 boys), evaluated at the Clinic of Paediatrics, University Hospital Center Osijek and referred for developmental delay, participated in the study. Genetic testing that included karyotyping and molecular-genetic analysis for fragile X syndrome was performed on all patients. Some of the patients (4, 5, 6 and 8) had normal results of the initial testing, and others (1, 2, 3 and 7) had not. More sophisticated testing using the aCGH method was additionally performed. The platform that was used is called SurePrint G3 Human CGH Bundle, 8×60K (Agilent Technologies, Santa Clara, US).

**Results:** The analysis showed chromosomal changes in 4 patients (2 girls and 2 boys) or in 50% of patients. The changes were observed on chromosomes 6, 16, 21 and X.

**Conclusion:** The study has shown that aCGH method is an optimal screening method for patients with unexplained ID/DD, ASD and MCA since it detects submicroscopic aberrations that are the most common cause of these disorders and which can not be detected by using standard karyotyping.

**Keywords:** aCGH; developmental delay; mental retardation; submicroscopic aberrations

**9. LITERATURA**

1. Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, Toruner G, Schoumans J, Cogulu O. Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *Biomed Res Int.* 2015;2015:461-524.
2. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, i sur. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res.* 2002;504:17-36.
3. Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene.* 2001;20:5572-9.
4. Rinčić M. Molekularna citogenetika nekih neurorazvojnih poremećaja [dissertation]. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2014. 171 p.
5. Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update. *Annu. Rev. Genom. Human. Genet.* 2014;15:215-44.
6. Devriendt K, Vermeesch JR. Chromosomal phenotypes and submicroscopic abnormalities. *Hum Genomics.* 2004;1:126-33.
7. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, 10. revizija (MKB – 10). 2.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
8. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, i sur. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86:749-64.
9. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, i sur. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2003;60:367-80.
10. Autism and Developmental Monitoring Network Surveillance Year 2000 Principal Investigators. Prevalence of autism spectrum disorders-autism and developmental disabilities monitoring network, six sites, United States, 2000. *MMWR Surveill Summ.* 2007;56:1-11.
11. Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK, Levy SE, i sur. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health.* 2007;28:235-58.
12. Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med.* 2012;366:733-43.
13. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, i sur. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012;367:1921-29.



14. Szczałuba K, Nowakowska B, Sobecka K, Smyk M, Castaneda J, Kłapecki J, i sur. Application of Array Comparative Genomic Hybridization in Newborns with Multiple Congenital Anomalies. *Adv Exp Med Biol.* 2016;912:1-9.
15. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, i sur. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet.* 2006;43:625–633.
16. Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, i sur. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem.* 2012;60:346-58.
17. Sansović I, Ivankov AM, Bobinec A, Barišić I. Kromosomski microarray u kliničkoj dijagnostici osoba s razvojnim poremećajima. *Paediatr Croat.* 2016;60:58-64.
18. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord.* 2010;2:182–209.
19. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, i sur. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998;20:207-11.
20. Aradhya S, Cherry AM. Array-based comparative genomic hybridization: Clinical contexts for targeted and whole-genome designs. *Genet Med.* 2007;9:553-9.
21. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA, Merkx GFM, Knoers NVAM, Kets M, i sur. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* 2004;41:892-9.
22. Ghasemi Firouzabadi S, Vameghi R, Kariminejad R, Darvish H, Banihashemi S, Firouzkouhi Moghaddam M, i sur. Analysis of Copy Number Variations in Patients with Autism Using Cytogenetic and MLPA Techniques: Report of 16p13.1p13.3 and 10q26.3 Duplications. *Int J Mol Cell Med.* 2016;5:236–45.
23. De Paz JF, Benito R, Bajo J, Rodríguez AE, Abáigar M. aCGH-MAS: Analysis of aCGH by means of Multiagent System. *Biomed Res Int.* 2015;2015:194624.
24. Giorgio E, Ciolfi A, Biamino E, Caputo V, Di Gregorio E, Belligni EF, i sur. Whole exome sequencing is necessary to clarify ID/DD cases with de novo copy number variants of uncertain significance: Two proof-of-concept examples. *Am J Med Genet A.* 2016;170:1772–9.
25. Rosenfeld JA, Patel A. Chromosomal Microarrays: Understanding Genetics of Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies. *J Pediatr Genet.* 2017;6:42–50.
26. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215:B2-9.
27. Orphanet: The portal for rare diseases and orphan drugs. 6q16 microdeletion syndrome. [Online] [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=GB&Expert=171829](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=171829). Pristup: 28.8.2019.

28. UniProt. UniProtKB-P81133 (SIM1\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P81133>. Pristup: 28.8.2019.
29. UniProt. UniProtKB-Q13002 (GRIK2\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13002>. Pristup: 28.8.2019.
30. UniProt. UniProtKB-Q9HBV1 (POPD3\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9HBV1>. Pristup: 28.8.2019.
31. UniProt. UniProtKB-Q969V1 (MCHR2\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q969V1>. Pristup: 28.8.2019.
32. Strunk D, Weber P, Röthlisberger B, Filges I. Autism and intellectual disability in a patient with two microdeletions in 6q16: a contiguous gene deletion syndrome? *Mol Cytogenet.* 2016;9:88.
33. Škrlec I, Pušeljić S, Lovrečić L, Peterlin B, Wagner J. De novo case of a partial tetrasomy 16p. 10th European Cytogenetic Conference, Strasbourg, Francuska, 2015. 1.P54, 1.
34. UniProt. UniProtKB-Q9NXR1 (NDE1\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NXR1>. Pristup: 28.8.2019.
35. UniProt. UniProtKB-P35749 (MYH11\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P35749>. Pristup: 28.8.2019.
36. UniProt. UniProtKB-O95255 (MRP6\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/O95255>. Pristup: 28.8.2019.
37. UniProt. UniProtKB-Q7Z6LO (PRRT2\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z6LO>. Pristup: 28.8.2019.
38. UniProt. UniProtKB-P57054 (PIGP\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/P57054>. Pristup: 28.8.2019.
39. UniProt. UniProtKB-Q13627 (DYR1A\_HUMAN). [Online]  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13627>. Pristup: 28.8.2019.
40. Schnabel F, Smogavec M, Funke R, Pauli S, Burfeind P, Bartels I. Down syndrome phenotype in a boy with a mosaic microduplication of chromosome 21q22. *Mol Cytogenet.* 2018;11:62.
41. DECIPHER GRCh37. Genome Browser Xp22.33. [Online]  
<https://decipher.sanger.ac.uk/browser#q/Xp22.33/location/X:46400001-49800000>. Pristup: 28.8.2019.
42. Kokalj Vokac N, Seme Ciglencecki P, Erjavec A, Zagradisnik B, Zagorac A. Partial Xp duplication in a girl with dysmorphic features: the change in replication pattern of late-replicating dupX chromosome. *Clin Genet.* 2002;61:54-61.

## 10. ŽIVOTOPIS

Valentina Vučemilović-Jurić

Datum i mjesto rođenja:

- 11.11.1997., Našice

Obrazovanje:

- 2016.-2019.: Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2012.-2016.: Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavoga Našice

Dodatna edukacija:

- 2012.-2016.: DSD program naprednog učenja njemačkog jezika, Srednja škola Isidora Kršnjavoga Našice