

KROMOSOMSKI MICROARRAY U KLINIČKOJ DIJAGNOSTICI OSOBA S RAZVOJNIM POREMEĆAJIMA

IVONA SANSOVIĆ, ANA-MARIA IVANKOV, ADRIANA BOBINEC, INGEBORG BARIŠIĆ*

Kliničko genetičko testiranje je standardna praksa za bolesnike s nerazjašnjenim razvojnim zaostajanjem/intelektualnim poteškoćama, poremećajima iz autističnog spektra ili višestrukim kongenitalnim anomalijama. Većina ovih bolesnika nema dovoljno specifičnih obilježja iz osobne anamneze ili/i iz kliničkog pregleda koji bi upućivali na određeni genetički (ili ne-genetički) uzrok. Kromosomski microarray se već više od deset godina koristi širom svijeta u rutinskoj kliničkoj obradi ove populacije bolesnika kao prvi dijagnostički test. Stoga smo u Klinici za dječje bolesti Zagreb prvi u Hrvatskoj uveli kromosomskim microarray u genetičku dijagnostiku djece s razvojnim poremećajima. Ovdje sažeto prikazujemo klinička citogenetska testiranja koja se koriste u dijagnostici spomenute populacije bolesnika te na primjeru dva klinička slučaja uspoređujemo kromosomski microarray s klasičnom kariotipizacijom s obzirom na tehničke prednosti i ograničenja, dijagnostički prinos za različite vrste kromosomskih aberacija i probleme koji utječu na interpretaciju rezultata. Kromosomski microarray nudi znatno veći dijagnostički prinos (20%) u genetičkom testiranju osoba s razvojnim poremećajima nego klasična kariotipizacija (~3%), prvenstveno zbog visoke rezolucije u otkrivanju submikroskopskih delecija i duplikacija. Analiza višestrukog umnažanja vezanih sonda i fluorescentna in situ hibridizacija imaju znatno veću razinu rezolucije od klasične kariotipizacije, ali su ograničene samo na ciljane segmente genoma. U zaključku, kromosomski microarray će omogućiti postavljanje točne dijagnoze/specifičnog genetičkog sindroma u oko 20% djece s razvojnim zaostajanjem/intelektualnim poteškoćama, poremećajima iz autističnog spektra ili višestrukim kongenitalnim anomalijama, pa je zasad najučinkovitija dijagnostička metoda za ove skupine bolesnika.

Deskriptori: KROMOSOMSKI MICROARRAY, RAZVOJNO ZAOSTAJANJE, INTELEKTUALNE POTEŠKOĆE, KONGENITALNE ANOMALIJE, KARIOTIPIZACIJA, MLPA, FISH

Skraćenice:

DD/ID - razvojno zaostajanje/intelektualne poteškoće (engl. developmental delay/intellectual disability); ASD - poremećaji iz autističnog spektra (engl. autism spectrum disorders); MCA - višestruke kongenitalne anomalije (engl. multiple congenital anomalies); CNV - varijante u broju kopija (engl. Copy Number Variations); CMA - kromosomski microarray (engl. chromosomal microarray); aCGH - komparativna genomska hibridizacija na array-u (engl. array comparative genomic hybridization);

*Referentni centar Ministarstva zdravlja RH za praćenje kongenitalnih anomalija
Klinika za pedijatriju,
Klinika za dječje bolesti Zagreb
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Ivona Sansović, dipl. ing. med. biok.
Referentni centar Ministarstva zdravlja i socijalne skrbi RH za praćenje kongenitalnih anomalija
Klinika za pedijatriju,
Klinika za dječje bolesti Zagreb
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
10000 Zagreb, Klaićeva 16
E-mail: ivona.sansovic@kdb.hr

SNP - polimorfizmi jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism); FISH - fluorescentna in situ hibridizacija (engl. fluorescence in situ hybridization); MLPA - višestruko umnažanje vezanih sonda (engl. multiplex ligation-dependent probe amplification); BAC - umjetni kromosom iz bakterije (engl. bacterial artificial chromosome); PAC-PI-dobiveni umjetni kromosom (engl. PI-derived artificial chromosome); VOUS - varijante nepoznatog kliničkog značenja (engl. variants of uncertain clinical significance); DGV - baza podataka varijanti genoma (engl. Database of Genomic Variants); dbVAR - baza podataka strukturnih varijanti (engl. Database of Structural Variation); DECIPHER - baza podataka kromosomskih promjena i fenotipova u ljudi korištenjem izvora Ensembl (engl. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources); ECA-RUCA - registar nebalansiranih kromosomskih aberacija europskog citogenetskog društva (engl. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations); OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man; ISCA konzorcij - međunarodni konzorcij za standardizaciju array-a u citogenomici (engl. International Standard Cytogenomic Array Consortium); PMS - sindrom Phelan-McDermid

UVOD

Kliničko genetičko testiranje, uključujući analizu kromosoma, je standardna 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). Ove kategorije poremećaja čine najveći udio citogenetskog testiranja zbog njihove visoke prevalencije u populaciji. Incidencija DD/ID u općoj populaciji je oko 3%, a ASD pogađa ~1:150 osoba (1-3). Većini bolesnika nedostaje dovoljno specifičnih obilježja iz osobne anamneze i kliničkog pregleda da bi sugerirali određeni genetički (ili ne-genetički) uzrok.

Opisani poremećaji najčešće su uzrokovani varijantama u broju kopija (engl. *Copy Number Variations*, CNV) genoma. One se definiraju kao višak ili manjak određenog odsječka DNA u odnosu na referentni humani genom. Mogu biti veličine od 1 kilobaze do nekoliko megabaza, a mogu obuhvaćati više gena, jedan ili čak niti jedan gen. S obzirom na funkciju i klinički značaj gena koji obuhvaćaju, neke uzrokuju bolest, ali su mnoge benigne varijante u zdravoj populaciji. Patološki CNV-ovi mogu dovesti do suviška ili manjka gena ovisnih o dozi što može uzrokovati fenotipsku varijabilnost, sklonost određenim poremećajima ili specifične patološke fenotipove.

Analiza genoma na broj kopija korištenjem kromosomskog microarray-a (engl. *chromosomal microarray*, CMA) je često traženi klinički genetički test za ovu populaciju bolesnika. Termin CMA obuhvaća sve vrste na arrayu-temeljenih analiza broja kopija u genomu, uključujući na array-u temeljenu komparativnu genomsku hibridizaciju (engl. *array comparative genomic hybridization*, aCGH) i array-e s polimorfizmima jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP).

Klasična kariotipizacija omogućuje pregled i analizu svih kromosoma, te otkrivanje kako balansiranih (translokacija i inverzija) tako i nebalansiranih kromosomskih aberacija. To je uglavnom uniformna tehnika s relativno jednostavnom analizom i jasnom interpretacijom nalaza koja se koristi u velikom broju laboratorija već više od 40 godina. Njezina razina detekcije može biti najviše 3 Mb, ali često se mogu previdjeti promjene 5-10 Mb, ovisno o mjestu u genomu i/ili razini rezolucije opruganih kromosoma. Nedostatak joj je što se osniva na subjektivnoj procjeni osobe koja analizira, stoga postoje značajne varijacije u razinama otkrivanja aberacija među osobama i laboratorijima. Premda se smatra da ima mogućnost otkrivanja niske razine mozaicizma (kariotipizacija standardnih 20 stanica otkriva mozaik na razini 14%), mnogi mozaicizmi su propušteni, bilo zbog toga što ih nije bilo u odgovarajućim limfocitima ili zbog toga što stanice s kromosomskom aberacijom ne odgovaraju na mitogen (4).

Dijagnostika DD/ID je unaprijeđena primjenom subtelomerne fluorescentne in situ hibridizacije (engl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) te višestrukog umnažanja vezanih sonda (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) koji su prvenstveno otkrivali subtelomerne promjene, ali i poznate mikrodelecijske/duplikacijske sindrome (5). Ovi testovi i raniji razvoj CGH-a na metafaznim kromosomima su služili kao kamen temeljac u evoluciji aCGH. Daljnje povećanje razine otkrivanja submikroskopskih promjena postignuta su zamjenom metafaznih kromosoma s DNA odsječcima na array-u kao što su bili BAC-ovi (engl. *bacterial artificial chromosome*)/PAC-ovi (engl. *PI-derived artificial chromosome*), cDNA klonovi, PCR produkti, te na kraju sintetizirani oligonukleotidi učvršćeni na predmetno stakalce (6). Razina rezolucije CMA je u stvari bez ograničenja, ona ovisi samo o veličini i udaljenosti između ispitnih sonda na array-u.

Isprva se CMA tehnologija koristila za profiliranje genoma u zdravoj populaciji, a potom su slične studije napravljene da bi otkrili CNV-e u osoba s ID, s ASD-om, ili MCA (7-18). Usporedbom frekvencija dobivenih CNV-a za slučajeve i kontrole, brzo su se otkrivali za bolest vezani CNV-i.

U ovom radu smo iznijeli prednosti i ograničenja CMA u usporedbi s klasičnom kariotipizacijom u otkrivanju patoloških nebalansiranih promjena genoma u bolesnika s DD/ID, ASD, i/ili MCA. Također je prikazan preporučeni postupnik genetičke obrade ove kategorije bolesnika.

RAZVOJ ARRAY-a I POVEĆANA RAZINA OTKRIVANJA CNV-a

Povećani prinos kliničkih genetičkih dijagnoza primjenom CMA slijedi evoluciju dizajna arraya. Rani aCGH testiranja su uključivala BAC klonove i ciljane subtelomerne i pericentromerne regije, "poznate" učestale mikrodelecijske i mikroduplikacijske sindrome (19). Na kasnijim array-ima su one udružene sa sondama osovine (engl. *backbone*) koje su ravnomjerno raspoređene u ~1 Mb genomskim intervalima, ali s ni-

žom gustoćom, preko cijelog genoma da olakšaju otkrivanje sporadičnih velikih delecija i duplikacija (20). Kao posljedica toga, većina CNV-a koji su se otkrili ovim platformama su bili patogeni, budući su bili ili unutar klinički relevantnih regija ili veliki. Tada je dijagnostički prinos bio 7-11% za djecu s normalnim kariotipom (9, 21-27). S evolucijom tehnologije, većina CMA koji se danas koriste ima veliki broj sonda (često više od jednog milijuna) koji se prostiru duž cijelog humanog genoma, omogućujući otkrivanje jako malih CNV-a (veličine <10 kb). Pregled 33 objavljene studije koje su obuhvatile 21,698 bolesnika s DD, MCA ili ASD je odredio dijagnostički prinos CMA od 15-20% u usporedbi s ~3% za klasičnu kariotipizaciju (28).

Cjeloviti probir genoma na velikoj i sveobuhvatnijoj skupini bolesnika i normalnih kontrola je pomogao u kontinuiranom otkrivanju novih sindroma u ID/DD. To je pogotovo bitno za jako rijetke poremećaje i za one koji pokazuju nepotpunu penetrantnost i/ili promjenjivu izražajnost. Na osnovu analize 15,767 bolesnika s dijagnozom ID/DD i 8,329 normalnih osoba, Cooper i sur. (2011.) su otkrili 14 novih lokusa te su napravili sveobuhvatnu procjenu prevalencije i penetrantnosti za značajnu većinu poznatih mikrodelecijskih/duplikacijskih sindroma. Oko 14% bolesnika imalo je ID/DD uzrokovan patogenim CNV-ijima većim od 400 kb (29).

KLASIFIKACIJA CMA VARIJANTI

Glavni kriteriji koji se koriste kao pomoć u interpretaciji kliničke važnosti CNV-ja su: način nasljeđivanja, veličina, vrsta i sadržaj gena (28). Vjerojatnije je da su *de novo* CNV-i patogeniji od naslijeđenih, pogotovo kod teških poremećaja, premda ovdje postoje određene iznimke. Naslijeđeni CNV može se klinički očitovati poremećajem različite težine i može nedvojbeno biti patogen, pa i kad je prisutan u fenotipski normalnog roditelja (30, 31).

Vjerojatnije je da veći CNV uzrokuju bolest (32). Djelomično je to zato jer veliki CNV općenito obuhvaćaju više gena, a proporcionalno s time raste vje-

rojatnost da mijenjaju gene osjetljive na dozažu. Isto tako, delecije rezultiraju haploinsuficijencijom gena. Duplikacije je teže objasniti jer ponekad i velike duplikacije mogu biti benigne. Sadržaj gena također treba uzeti u obzir. CNV-i koji sadrže puno gena ili gene povezane s bolesti vjerojatnije je da su patogeni nego oni koji sadrže malo gena ili gene nepoznate uloge.

Kliničko tumačenje CMA rezultata

Određivanje kliničkog značaja varijanti otkrivenih CMA može biti zahtjevno. Poseban teret laboratorijima i kliničarima predstavlja interpretacija varijanti nepoznatog kliničkog značenja (engl. *variants of uncertain clinical significance*, VOUS). Općenito, CNV-i se mogu kategorizirati kao: 1. patogeni - dobro poznati sindromi, *de novo* varijante, i promjene >400 kb); 2. vjerojatno patogeni - nisu tako dobro opisani, *de novo* varijante, promjene >400 kb ili zahvaćaju klinički važne gene; 3. benigni - već opisani kod zdravih osoba i/ili naslijeđeni od zdravog roditelja; 4. vjerojatno benigni - oni koji nisu prethodno opisani, ali su naslijeđeni od zdravog roditelja; 5. VOUS.

Problemi vezani za određivanje VOUS-a se mogu riješiti: 1. izborom razine rezolucije platforme koja balansira osjetljivost i specifičnost; 2. povećanim dijeljenjem podataka preko baza podataka; 3. analizom roditelja da bi se odredilo da li je CNV nastao *de novo* ili je naslijeđen.

CMA se trenutno izvodi u mnogo različitih laboratorija na platformama različitih tehnologija i različitog dizajna i sadržaja array-a. Većina kliničkih laboratorija zadržava interne baze podataka patogenih i benignih CNV-ova, i ne moraju se slagati u interpretaciji. Ovi problemi se mogu riješiti preko uniformnijeg sadržaja array-a, racionalnim pristupom u interpretaciji varijanti i povećanim dijeljenjem podataka među laboratorijima i kliničarima. Prijavlivanje (novo) otkrivenih CNV-ja preko javno dostupnih baza podataka će donijeti najveću korist laboratorijima, kliničarima, a u konačnici i najvažnije bolesnicima.

Najsveobuhvatnija postojeća mrežna baza podataka vjerojatno benignih CNV-a prisutnih u zdravih ljudi je DGV (engl. *Database of Genomic Variants* <http://projects.tcag.ca/variation>). Baza podataka strukturnih varijanti iz normalne kontrolne populacije i bolesne populacije je dbVAR (engl. *Database of Structural Variation*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar>). Baze podataka DECIPHER (engl. *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*, <https://decipher.sanger.ac.uk/application>) i ECARUCA (engl. *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*) skupljaju CNV-je koji su nađeni u osoba s abnormalnim fenotipom. DECIPHER pojednostavljeno prikazuje korelaciju kliničkih fenotipova s određenim genomskim preraspodjelama (33). Ostale važne baze podataka koje su korisne u analizi CNV-a su preglednici genoma (eng. *Genome Browser*) UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) i ENSEMBL (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens), zatim baza podataka gena i patoloških stanja OMIM (eng. *Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>) i baza podataka medicinske literature PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>). Utvrđene su i radne skupine koje određuju standardne formate podataka i rječnike za opisivanje genotipa i fenotipa, a ujedno daju i preporuke i standardne smjernice za tumačenje CMA rezultata. ISCA konzorcij (engl. *International Standard Cytogenomic Array Consortium*) je 2010. godine dao preporuke glede odgovarajuće kliničke indikacije za citogenetsko array testiranje (28).

MATERIJALI I METODE

Ispitanici

Djevojčica u dobi od šest godina koja se prati od 16 mjeseci u Ambulanti za medicinsku genetiku Klinike za dječje bolesti Zagreb. Djevojčica ima dizmorfične crte (uski očni rasporci, lošije oblikovane uške, više nepce i retrognatija), operacijski je korigirana koarktacija aorte i ductus arteriosus Botali. Pored toga, ima ektopiju desnog bubrega i dis-

plaziju bubrega obostrano, usporen tjelesni i psihomotorni razvoj te intrauterini zastoj rasta.

Dječak rođen 2007. godine, prvi put dolazi na pregled 2009. Pri kliničkom pregledu uočava se dolihocfalija, makrocefalija (+ 2 sd), te dizmorfija (visoko čelo, izražene obrve, guste i dugačke trepavice, širok korijen nosa, hipoplazija srednjeg dijela lica, puniji obrazi, izražen filtrum, veće i slabije oblikovane uške, izbočena brada). Dječak ima krupne šake i hipoplastičan nokat na 5. prstu lijeve noge. Prisutni su hipotonija, teže psihomotorno zaostajanje, nerazvijen govor, poremećaj iz autističkog spektra i mioklona epilepsija. Magnetskom rezonancom mozga nađena je cista dimenzija oko 4 mm u području pinealne žlijezde, a rendgen kostiju pokazao je usporeno koštano sazrijevanje te smanjenu mineralizaciju kostiju.

Metode

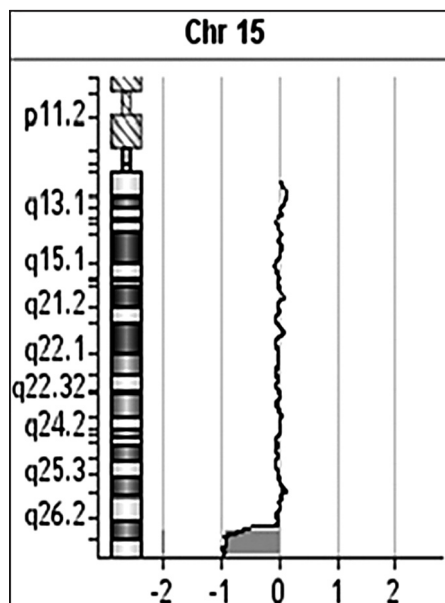
Klasična kariotipizacija provedena je analizom G, R i C-opruganih prometafaznih kromosoma rezolucije do 550 pruga, dobivenih iz kulture stanica periferne krvi.

Analiza cijelog genoma na višoj razini rezolucije napravljena je metodom CMA pomoću SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 8x60K kita i SureScan Dx Microarray skenera (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) prema uputama proizvođača. Rezultati su analizirani u programu Agilent Cytogenomics v3.0.6.6.

REZULTATI

Kod oba ispitanika analiza kariotipa je pokazala uredan nalaz; kod djevojčice 46, XX, u dječaka 46, XY. U djevojčice je CMA analizom otkrivena delecija veličine 5,514 kb u regiji 15q26.3q26.2 koja obuhvaća 30 gena (Slika 1). Nalaz CMA je arr 15q26.2q26.3(96.869.390-102.383.473)x1.

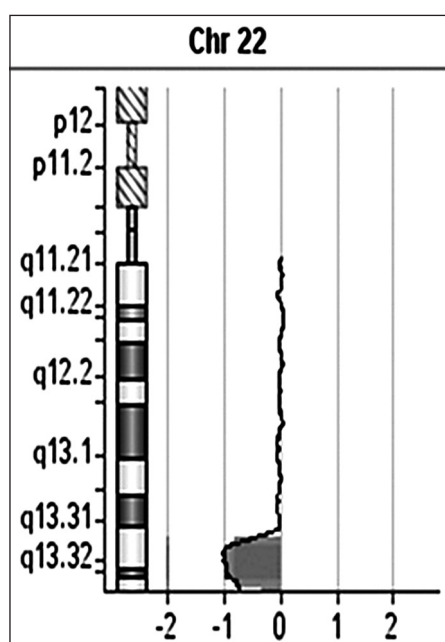
Geni u bazi podataka OMIM koji su dobro opisani i odgovorni za kliničku sliku u djevojčice su: NR2F2 (engl. nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2; MIM 107773), IGF1R (engl. *insulin-*



Slika 1.
Rezultati analize CMA u djevojčice: delecija regije 15q26.2q26.3 veličine 5,514 kb prikazana u logaritamskoj skali

like growth factor I receptor gene, MIM 147370) i MEF2A (engl. *mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide A*; MIM 600660).

U dječaka je analiza CMA otkrila deleciju veličine 5,155 kb na lokusu 22q13.31q13.33 koja obuhvaća 62 gena



Slika 2.
Rezultati analize CMA u dječaka: delecija regije 22q13.31q13.33 veličine 5,155 kb prikazana u logaritamskoj skali

(Slika 2). Od njih u bazi OMIM opisano je 22 gena, a gen SHANK3 (engl. SH3 and multiple ANKyrin repeat domains 3, MIM 606230) je odgovoran za ASD fenotip bolesnika. Također smo microarray-em otkrili duplikaciju u regiji 9p24.3. Radi se o duplikaciji veličine 212 kb koja obuhvaća samo 2 gena, od kojih je DOCK8 opisan u bazi OMIM. Nalaz CMA je $\text{arr } 9\text{p}24.3(204.193\text{-}416.351)\times 3,2\text{q}13.31\text{q}13.33(46.023.134\text{-}51.178.264)\times 1$

RASPRAVA

Analizom rezultata CMA u programu Agilent Cytogenomics v3.0.6.6., te pretraživanjem baza podataka DGV, DECIPHER, UCSC Genome Browser, ENSEMBL, OMIM, ISCA *pathogenic* na slične varijante kao u naših bolesnika došli smo do slijedećih dijagnoza.

U djevojčice smo korelirali kliničku sliku s mikrodelecijskim sindromom 15q26 ili Drayerovim sindrom (MIM 612626) koji uključuje slijedeća obilježja: mikrocefaliju, dizmorfiju - trokutasto lice, blefarofimozu, strabizam, širok korijen nosa, mikrognatiju, nisko položene uške te oštećenje sluha. Od malformacija prisutni su u ovom sindromu srčana grješka (urođene srčane anomalije i septalni defekti), anomalije urogenitalnog trakta i koštane abnormalnosti - brahidaktilija, odsutnost ili hipoplazija srednjih falangi i *talipes equinovarus*. Također zabilježeni su prenatalno i postnatalno zaostajanje u rastu te usporen psihomotorni razvoj (34). Bolesnici su uglavnom niži rastom zbog haploinsuficijencije gena IGF1R, gen NR2F2 se povezuje s nastankom kongenitalnih srčanih grješaka (MIM 615779), a gen MEF2A je odgovoran za koronarnu arterijsku bolest (MIM 608320) (35). Od navedenih obilježja kod naše bolesnice bili su prisutni blefarofimoza, mikrognatija, nisko položene uške, srčana grška, anomalije urogenitalnog trakta, prenatalno i postnatalno zaostajanje u rastu te usporen psihomotorni razvoj.

U dječaka je korelacijom genotipa s fenotipom korištenjem baze DECIPHER zaključeno da se radi o mikrodelecijskom sindromu 22q13.3 (sindrom Phelan-McDermid, MIM 606232). Phelan-McDermid sindrom (PMS) je razvojni

poremećaj s varijabilnim obilježjima. Glavna obilježja opisana u ovom sindromu, a koja su bila prisutna i u dječaka su slijedeća: neonatalna hipotonija, globalno razvojno zaostajanje, nerazvijen govor, autistički spektar poremećaja, normalan ili viši rast, krupne šake, hipoplastični nožni prsti, dolichocefalija i dizmorfija (velike uške, naglašene obrve, dugačke/guste trepavice, puniji obrazi, dublje usađene oči, plosnat srednji dio lica i prominentna brada). Od ostalih obilježja mogu biti prisutna imunodeficijencija/sklonost infekcijama, povećana tolerancija na bol i poremećaj termoregulacije (36, 37). Haploinsuficijencija gena SHANK3 smatra se odgovornom za kognitivni deficit, koji uključuje poremećaj jezika i govora te ASD (38-40). Gen SHANK3 kodira strukturni protein koji omogućava pre- i post-sinaptičko vezanje neuroligin-neurexin kompleksa koji je neophodan za razvoj i funkciju sinapsi, pa se disrupcija ovog kompleksa smatra jednim od najvažnijih uzroka ASD-a. Vjerojatno i drugi geni unutar deletirane regije pridonose varijabilnim obilježjima PMS-a. Disciglio i sur. (2014.) su izvjestili o 9 bolesnika s fenotipom koji je odgovarao PMS koji su imali heterozigotnu deleciju u regiji 22q13, ali koja nije uključivala gen SHANK3 (41). Duplikaciji na lokusu 9p24.3 koja obuhvaća samo 2 gena je opisana kao benigna varijanta.

CMA tehnički nije zahtjevan i podložan je automatizaciji za razliku od klasične kariotipizacije. Može se izvoditi s malom količinom početnog materijala, uz korištenje umnožavanja cijelog genoma po potrebi. Za razliku od analize kariotipa, CMA ne treba stanice koje se dijele, a to ima prednost u izvođenju studija na post mortem ili mrtvim fetalnim uzorcima. Premda rezolucija CMA metoda uvelike ovisi o gustoći sonde, suvremeni array-i koji se sastoje od stotina tisuća ili milijuna sonde mogu otkriti CNV-ove koji su nekoliko redova veličine manji nego oni vidljivi standardnom analizom kariotipa.

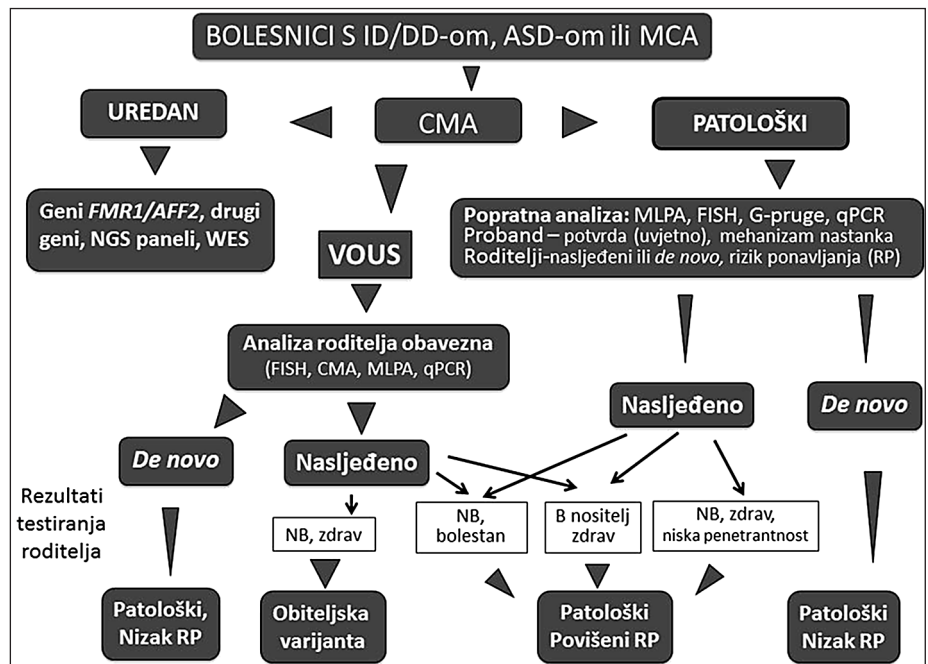
Glavna prednost klasične kariotipizacije u odnosu na CMA je mogućnost otkrivanja balansiranih preraspodjela u genomu. Međutim, mnoge navodno balansirane promjene otkrivene kariotipizacijom nisu balansirane na submi-

kroskopskoj razini. Navodi se da čak 29-41% balansiranih aberacija ima submikroskopske nebalansirane promjene, pogotovo česti nalaz u osoba s patološkim fenotipom (42, 43). Osim toga, balansirane preraspodjele predstavljaju samo manji udio klinički važnih genomskih događaja u ovoj populaciji bolesnika (1, 44). Druga prednost klasične kariotipizacije je otkrivanje niske razine mozaicizma. Budući da je incidencija niske razine mozaicizma u ovoj populaciji bolesnika relativno niska, kariotipizacija neće biti od veće koristi (45).

Korištenje pojedinih FISH testova ima višestruke nedostatke: 1. kliničar mora biti izrazito stručan za dismorfologiju i imati bolesnike s relativno tipičnom kliničkom slikom da bi mogao posumnjati na određeni genomski poremećaj te zahtijevati određeno genetičko testiranje; 2. FISH se često radi na metafaznim kromosomima, što onemogućava detektiranje tandemskih duplikacija; 3. vrednovanje FISH testa zna biti vrlo naporno. MLPA analiza ima prednost u otkrivanju širokog raspon nebalansiranih promjena, od 1 pb - 10 Mpb. Robustna je metoda i relativno ekonomična i omogućuje analizu većeg broja uzoraka u kratkom vremenu. Nedostatak je što zahtjeva, kao i FISH metoda, iskustvo i vještinu kliničkog genetičara koji upućuje na ciljanu analizu određene regije genoma.

ISCA konzorcij je predložio klinički algoritam kao vodič u postnatalnom testiranju osoba sa nerazjašnjenim DD/ID, ASD ili MCA (Slika 3) (28). Prema njemu CMA treba biti prvi genetički test. FISH ili kvantitativni PCR (qPCR)/MLPA mogu služiti za potvrdu npr. terminalnih delecija ili duplikacija.

Općenito, tradicionalne citogenetske metode su još uvijek potrebne za analizu pojedinačnih stanica, a indicirane su umjesto (ili prije) CMA u slučaju prepoznatljivih kromosomskih sindroma kao što su trisomija 21, 13, sindrom Turner ili Klinefelter. Konvencionalna analiza kromosoma je i dalje najprikladniji test za otkrivanje potencijalnih balansiranih translokacija za parove s povijesti ponavljajućih pobačaja i u obiteljima s nađenim balansiranim poremećajima. U slučaju otkrivene složene nebalansirane kromo-



Slika 3.

Postupnik CMA testiranja u bolesnika s DD/ID, ASD i MCA. U ovom postupniku pretpostavka je da su iz ispitivanja isključeni bolesnici s obilježjima prepoznatljivih sindroma (npr. Down, Klinefelter, Turner i sl.) i metaboličkih poremećaja, parovi s povijesti višestrukih pobačaja i obitelji s balansiranim kromosomskim poremećajima. Ukoliko se s CMA ne otkriju klinički važne promjene u broju kopija odnosno ako se otkriju poznati benigni CNV, tada se rezultat označava urednim. Slijedi dodatna klinička obrada da bi se odredila eventualna daljnja genetička testiranja na osnovu kliničke prezentacije. Ukoliko se otkrije CNV unutar poznate, klinički važne regije/gena, ili ako je CNV u genomskoj osovini i zadovoljava preporučene smjernice za veličinu i sadržaj gena, tada se rezultat smatra patološkim. U ovom slučaju, nastavna analiza uključuje potvrđne metode (nisu obavezne), određivanje mehanizma nastanka aberacije te analizu roditelja da bi se odredio rizik ponavljanja. Svi ostali rezultati se smatraju VOUS dok se ne napravi analiza roditelja koja pomaže u konačnoj kliničkoj interpretaciji. Nakon analize roditelja kod patoloških i VOUS rezultata, konačni rezultati se mogu klasificirati u tri glavne kategorije: obiteljska varijanta, patološki s niskim rizikom ponavljanja (RP) i patološki s povećanim RP. U nekim slučajevima VOUS ostaje nerazjašnjen i nakon testiranja roditelja.

NGS - sekvenciranje slijedeće generacije (engl. next generation sequencing); WES - sekvenciranje cijelog genoma (engl. whole genome sequencing); NB - nebalansirana kromosomska aberacija; B nositelj - nositelj balansirane kromosomske aberacije

Postupnik napravljen i preuređen prema radu Miller i sur. (2010.) (28)

somske aberacije u djeteta, klasična kariotipizacija ili FISH se koriste za analizu balansiranih poremećaja roditelja.

Zasada najveći izazov u CMA analizi predstavlja interpretacija VOUS-eva. Poteškoće u interpretaciji VOUS-eva se mogu riješiti suradnjom istraživača, kliničara, laboratorijskih genetičara i bioinformatičara. Naše razumijevanje kromosomskih varijanti i interpretacija CMA rezultata s vremenom se unapređuju prikupljanjem informacija o različitim CNV-ima i njihovoj patogenosti. Mrežne baze podataka DECIPHER, DGV, UCSC Genome Browser, ENSEMBL i dbVAR bi trebale značajno smanjiti sadašnju učestalost VOUS rezultata. Međutim,

CNV-i s nepotpunom penetrantnošću i/ili promjenjivom ekspresijom će i dalje predstavljati značajan izazov u tumačenju nalaza.

Tijekom zadnjih 12 godina dogodio se znatan napredak u tehnologijama brze i sveobuhvatne analize genoma. Sada je moguće brzo pretražiti CNV u cijelom genomu, uz bitno poboljšane metode otkrivanja mikrodelecija i mikroduplikacija u usporedbi s tehnologijama prije desetak godina. Više od 80% kromosomskih aberacija nađenih kod osoba s ID/DD ili ASD su submikroskopski i neće se vidjeti klasičnim citogenetičkim metodama. Primjer za to su i prikazana dva ispitanika u ovom radu. Tehnologije profiliranja

genoma kao što su CMA, su dramatično promijenili prirodu analize humanog genoma kombinacijom ciljanog pristupa visoke rezolucije koju koriste FISH ili MLPA tehnologije te cijelogenomskog pristupa koju koristi tehnologija kariotipizacije. Jedan CMA test ima mogućnost izvođenja jednaku stotinama ili tisućama FISH analiza odnosno MLPA testova. Stoga, uz to što daje mogućnost bržeg postavljanja dijagnoze, njegova je primjena i ekonomski opravdana.

Široka primjena microarray tehnologija je dovela do renesanse u razumijevanju kromosomske osnove bolesti u bolesnika s ID/DD. Od 2006., otkriveno je više od 20 rekurentnih mikrodelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma vezanih za ID/DD. Pri tome, skupina bolesnika se radije početno klasificira na osnovu obilježja zajedničke preklapajuće genetičke lezije nego na osnovu konstelacije kliničkih obilježja. Prepoznavanje grupe bolesnika sa zajedničkim genomskim preraspodjelama omogućuje precizniju karakterizaciju kliničkih simptoma i vodi do poboljšane dijagnoze i praćenja bolesnika.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Shevell M, Ashwal S, Donley D et al. 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.
- 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.
- Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J et al. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health*. 2007; 28: 235-58.
- Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90, 95 and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet*. 1977; 29: 94-7.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*. 2004;41:892e9.
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D et al.: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998; 20: 207-11.
- Koolen DA, Sharp AJ, Hurst JA et al. Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet*. 2008; 45: 710-20.
- Sagoo G, Butterworth A, Sanderson S et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med*. 2009; 11: 139-46.
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr*. 2006; 149: 98-102.
- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet*. 2006; 38: 1038-42.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 2008; 82: 477-88.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007; 316: 445-9.
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*. 2007; 39: 319-28.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008; 358: 667-75.
- Erdogan F, Larsen LA, Zhang L et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet*. 2008; 45: 704-9.
- Kloppocki E, Graul-Neumann LM, Grieben U et al. A further case of the recurrent 15q24 microdeletion syndrome, detected by array CGH. *Eur J Pediatr*. 2008; 167: 903-8.
- Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ et al. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2007; 81: 1057-69.
- Richards AA, Santos LJ, Nichols HA et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res*. 2008; 64: 358-63.
- Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakehoff RH, Meijer GA. BAC to the future! Or oligonucleotides: A perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: 445-50.
- Aradhya S, Cherry AM. Array-based comparative genomic hybridization: Clinical contexts for targeted and whole-genome designs. *Genet Med*. 2007; 9: 553-9.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2003; 73: 1261-70.
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*. 2004; 41: 241-8.
- Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet*. 2005; 42: 699-705.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: Clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet*. 2006; 43: 180-6.
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more? *Am J Med Genet*. A. 2005; 134: 259-67.
- Cheung SW, Shaw CA, Yu W et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med*. 2005; 7: 422-32.

27. Shevell MI, Bejjani BA, Srour M, Rorem EA, Hall N, Shaffer LG. Array comparative genomic hybridization in global developmental delay. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147: 1101-8.
28. Miller DT, Adam MP, Aradhya S et al. 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.
29. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43: 838-46.
30. Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F et al. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet.* 2008; 40: 1466-71.
31. Mefford HC, Cooper GM, Zerr T et al. A method for rapid, targeted CNV genotyping identifies rare variants associated with neurocognitive disease. *Genome Res.* 2009; 19: 1579-85.
32. de Vries BB, P Fundt R, Leisink M et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 606-16.
33. Firth HV, Richards SM, Bevan AP et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009; 84: 524-33.
34. Rump P, Dijkhuizen T, Sikkema-Raddatz B et al. Drayer's syndrome of mental retardation, microcephaly, short stature and absent phalanges is caused by a recurrent deletion of chromosome 15(q26.2-qter). *Clin Genet.* 2008; 74: 455-62.
35. Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG. An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1-qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet.* 1991; 38: 74-9.
36. Phelan MC, Rogers RC, Saul RA et al. 22q13 deletion syndrome. *Am J Med Genet.* 2001; 101: 91-9.
37. Soorya L, Kolevzon A, Zweifach J et al. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Molec Autism.* 2013; 4: 18.
38. Wilson HL, Wong ACC, Shaw SR et al. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet.* 2003; 40: 575-84.
39. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genet.* 2007; 39: 25-7.
40. Boccutto L, Lauri M, Sarasua SM et al. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *Europ J Hum Genet.* 2013; 21: 310-6.
41. Disciglio V, Lo Rizzo C, Mencarelli MA et al. Interstitial 22q13 deletions not involving SHANK3 gene: a new contiguous gene syndrome. *Am J Med Genet.* 2014; 164: 1666-76.
42. De Gregori M, Ciccone R, Magini P et al. Cryptic deletions are a common finding in balanced reciprocal and complex chromosome rearrangements: A study of 59 patients. *J Med Genet.* 2007; 44: 750-62.
43. Baptista J, Mercer C, Prigmore E et al. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: Comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 927-36.
44. Funderburk SJ, Spence MA, Sparkes RS. Mental retardation associated with balanced chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet.* 1977; 29: 136-41.
45. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 1263-75.

Summary

CHROMOSOMAL MICROARRAY IN CLINICAL DIAGNOSTIC TESTING OF INDIVIDUALS WITH DEVELOPMENTAL DISORDERS

I. Sansović, A.M. Ivankov, A. Bobinec, I. Barišić

Clinical genetic testing is standard practice for patients with unexplained developmental delay/intellectual disability, autism spectrum disorders, or multiple congenital anomalies. Most patients lack sufficient specific history or features from physical examination to suggest a specific genetic (or non-genetic) cause. Chromosomal microarray has been used for more than ten years all over the world in routine clinical evaluation of this population of patient as the first-tier cytogenetic test. Therefore, chromosomal microarray analysis has been implemented in the Children's Hospital Zagreb for the first time in Croatia in genetic diagnostic setting of children with developmental disorders. Here we reviewed clinical cytogenetic testing that have been used in diagnostic of this population of patients and on the example of two cases we compared chromosomal microarray with traditional karyotyping with respect to technical advantages and limitations, diagnostic yield for various types of chromosomal aberrations, and issues that affect test interpretation. Chromosomal microarray offers a much higher diagnostic yield (20%) for genetic testing of patients with developmental disorders than traditional karyotyping (~3%), primarily because of its higher resolution in detection submicroscopic deletions and duplications. Fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification methods, although have a significantly higher level of resolution than classical karyotyping, are limited only to the target segments of the genome. In conclusion, chromosomal microarray will enable to establish accurate diagnosis/specific genetic syndromes in about 20% children with developmental delay/intellectual disability, autism spectrum disorders, or multiple congenital anomalies and is currently the most effective diagnostic method for this group of patients.

Descriptors: CHROMOSOMAL MICROARRAY, DEVELOPMENTAL DELAY/INTELLECTUAL DISABILITY, AUTISM SPECTRUM DISORDERS, MULTIPLE CONGENITAL ANOMALIES, KARYOTYPING, MLPA, FISH

Primljeno/Received: 1. 3. 2016.

Prihvaćeno/Accepted: 25. 3. 2016.