

# Primjena MLPA analize u detekciji submikroskopskih kromosomskih duplikacija i delecija

---

**Anđelić, Mirna**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:415767>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Mirna Anđelić**

**PRIMJENA MLPA ANALIZE U  
DETEKCIJI SUBMIKROSKOPSKIH  
KROMOSOMSKIH DUPLIKACIJA I  
DELECIJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2016.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Mirna Anđelić**

**PRIMJENA MLPA ANALIZE U  
DETEKCIJI SUBMIKROSKOPSKIH  
KROMOSOMSKIH DUPLIKACIJA I  
DELECIJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2016.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, a analiza uzoraka primjenom MLPA tehnike na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku Sveučilišnog kliničkog centra Ljubljana.

Cjelokupno istraživanje provedeno je kao dio VIF2015-MEFOS-11 projekta „Etiologija mentalnog zaostajanja u pedijatrijskoj populaciji“, voditeljica projekta doc. dr. sc. Jasenka Wagner.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima 48 listova, 4 tablice i 21 sliku.

## **ZAHVALA**

Diplomski rad posvećujem svojoj obitelji, majci i sestri, bez čije ljubavi, podrške ne bih bila to što jesam. Najveće hvala, volim vas.

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli u izradi diplomskoga rada, prvenstveno svojoj mentorici doc.dr.sc. Jasenki Wagner na stručnom vodstvu, svakom savjetu i ukazanom povjerenju, zatim mag.mol.biol. Ivani Škrlec i bacc.med.lab.diag. Saneli Štibi na pomoći i podršci kad nije sve bilo kako sam planirala, prof. dr.sc. Borutu Peterlinu na stručnim savjetima za vrijeme boravka u Ljubljani, te posebno zahvaljujem dr.sc. Alenki Hodžić jer je bila zamjenska mentorica iz snova!

Hvala i svim mojim prijateljicama i prijateljima jer su tu.

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Analiza kromosoma čovjeka .....	1
1.2. Kromosomske anomalije .....	6
1.2.1. Kromosomske mikrolelecije i mikroduplikacije .....	6
1.3. Mentalna retardacija .....	7
1.3.1. Povezanost promjena u subtelomernim regijama kromosoma s nastankom mentalne retardacije .....	8
2. HIPOTEZA .....	10
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	11
4. ISPITANICI I METODE .....	12
4.1. Ustroj studije .....	12
4.2. Ispitanici .....	12
4.3. Metode .....	12
4.3.1. Izolacija genomske DNA Qiagen kompletom reagensa .....	12
4.3.2. Provjera kvalitete izolirane DNA .....	14
4.3.3. Analiza subtelomernih regija kromosoma metodom istovremenog umnažanja vezanih proba (MLPA) .....	14
4.3.3.1. Setovi MLPA proba korištenih u istraživanju .....	15
4.3.4. Detekcija MLPA proba kapilarnom elektroforezom .....	16
4.3.5. Analiza MLPA podataka .....	17
4.4. Statističke metode .....	19
5. REZULTATI .....	20
6. RASPRAVA .....	36
7. ZAKLJUČAK .....	40
8. SAŽETAK .....	41
9. SUMMARY .....	42
10. LITERATURA .....	43
11. ŽIVOTOPIS .....	45

# 1. UVOD

Zahvaljujući brzom napretku tehnologije i njezine primjene u znanosti, genetičke analize postaju djelom rutinskih pretraga u kliničkoj primjeni. Prva izvedena genetička analiza na području citogenetike, i genetike uopće – objavljen točan broj kromosoma (Tijo i Levan, 1956. godine) - otvorila je vrata novim spoznajama o genetičkim poremećajima i sindromima. Nedugo nakon toga, 1959. godine, otkriveno je da su upravo kromosomske aberacije uzrok kliničkih sindroma kao što je Down sindrom koji je posljedica trisomije 21. kromosoma. Iste je godine otkriven uzrok Turner i Klinefelter sindroma, vezan za nepravilnosti spolnih kromosoma. Desetak godina kasnije, točnije 1976., Yunis je razvio tehniku pruganja kromosoma, koja je u širokoj upotrebi i danas, a kojom je postalo moguće identificirati abnormalnosti na svakom ljudskom kromosomu iz kulture limfocita. Tehnika pruganja kromosoma te je godine omogućila i povezivanje kliničke slike i etiologije nastanka za još dva dobro poznata sindroma – Cri-du-Chat i Wolf-Hirschhorn sindrom (1).

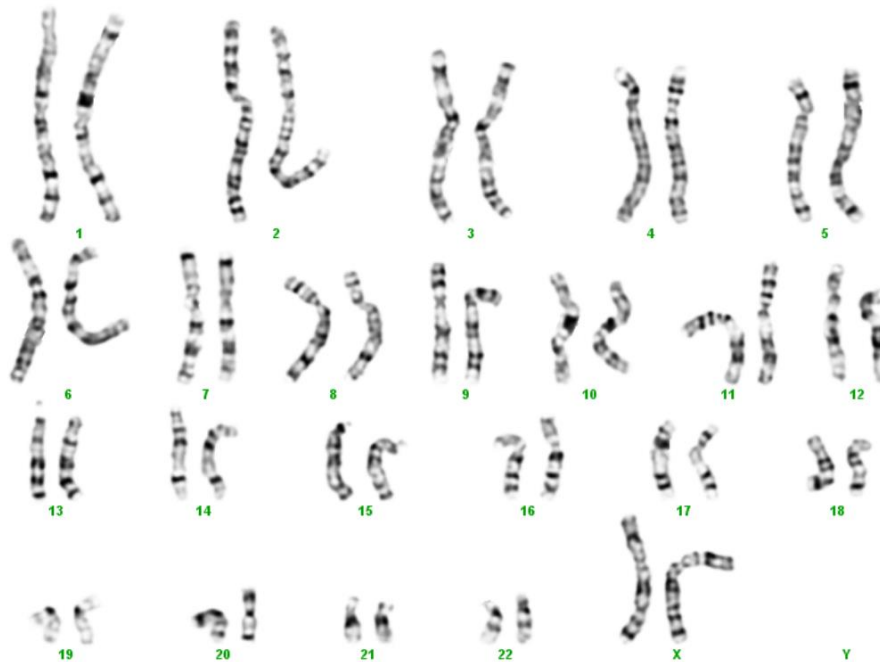
Danas, kada nam je dostupna sofisticirana tehnologija, moguće je otkriti najsitnije promjene na kromosomima nastale za vrijeme razvoja jedinke. U ovome će istraživanju biti opisana visoko specifična molekularno-citogenetička tehnika: metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (engl. *Multiplex Ligation – dependent Probe Amplification* - MLPA).

## 1.1. Analiza kromosoma čovjeka

### **G – pruganje kromosoma**

Kromosomi čovjeka uglavnom se analiziraju iz leukocita, a sve se rutinske kliničke citogenetičke analize rade na preparatima kromosoma koji su prethodno tretirani i obojeni kako bi postao vidljiv uzorak ispruganosti čija analiza omogućuje otkrivanje strukturnih kromosomskih promjena. Najčešće korišteno bojenje kromosoma je G-pruganje, odnosno metoda u kojoj se kromosomi tretiraju tripsinom, a nakon toga boje bojom Giemsa. Tretirani se preparati analiziraju svjetlosnim mikroskopom, a detaljna se analiza temelji na usporedbi pruga na jednom kromosomu s prugama homolognog kromosoma (2). Iako se ta metoda pokazala uspješnom i koristi se u rutinskom radu, za velik je broj poremećaja neučinkovita. Naime,

kromosomske preraspodjele koje su manje od 3 Mb nemoguće je pouzdano identificirati opisanom metodom. Strukturne kromosomske podjele manje od 5 Mb predstavljaju submikroskopske aberacije, tj. mikrodelecije kada je riječ o manjku DNA sekvenci i mikroduplikacije kada je riječ o višku DNA sekvenci (1, 3).



Slika 1. Uredan ženski kariogram dobiven G-pruganjem

### Fluorescentna in situ hibridizacija - FISH

Zahvaljujući tehnološkom odgovoru na uočene nedostatke pri citogenetičkoj analizi, 1983. godine razvijena je metoda fluorescentna in situ hibridizacija – FISH (engl. *Fluorescent in situ hybridization*), koja označava tzv. evoluciju u molekularnoj citogenetici, odnosno povećanje rezolucijske moći u istraživanjima kromosoma (1). Osnovni princip FISH tehnike temelji se na fluorescentnom obilježavanju ciljne sekvence DNA koja se zatim hibridizira na preparate na kojima se nalaze kromosomi ili interfazne jezgre uzorka pacijenta. Nakon hibridizacije preparati se boje s fluorescentnom kontrastnom bojom DAPI i vizualiziraju fluorescentnim mikroskopom. Opisana metoda omogućava detekciju submikroskopskih kromosomskih preraspodjela, promjene broja kromosoma, mapiranje gena, odnosno, čini vidljivim



mikroskopske strukturne poremećaje kromosoma koje standardnim pruganjem nisu mogle biti precizno detektirane (4).

Korištenje fluorescentne in situ hibridizacije u kliničke svrhe dovelo je do otkrića da su delecije i duplikacije subtelomerne regije povezane s kliničkom slikom intelektualnog zaostajanja. Naime, subtelomerne aberacije pronađene su kod oko 5 % pacijenata, što je ukazalo na to da uzrok kod pacijenata s intelektualnim zaostajanjem nepoznate etiologije (urednih nalaza uobičajenih citogenetičkih pretraga) treba potražiti u navedenoj kromosomskoj regiji (5, 6).

Iako se FISH tehnika pokazala tehnikom izbora kada je u pitanju detekcija aberacija, postoje ograničavajući faktori koji ju čine manje učinkovitom u kliničkoj primjeni – nemogućnost analize velikog broja uzoraka istovremeno te visoka cijena pojedine analize.

### **Metoda istovremenog umnažanja vezanih proba – MLPA**

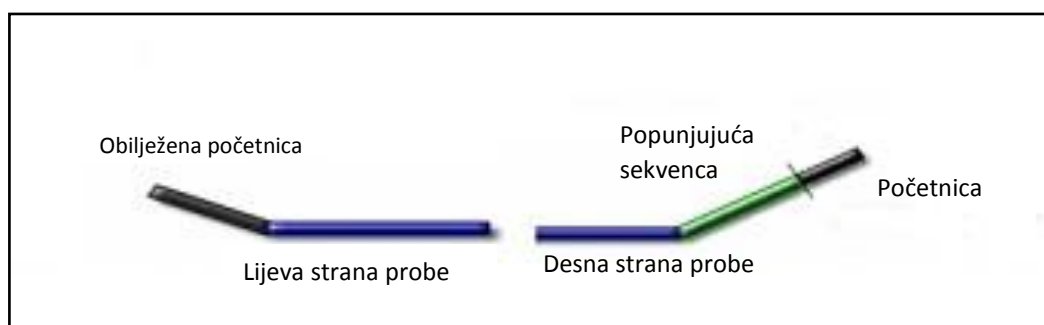
U usporedbi s FISH metodom, metoda istovremenog umnažanja vezanih proba, prvi puta opisana 2002. godine, pokazala se pouzdanom metodom koja bi mogla zamijeniti standardnu kariotipizaciju i FISH u svrhu brze dijagnostike aneuploidija, jer je korištenjem te metode moguće istovremeno analizirati do 50 različitih sekvenci DNA, koristeći malu količinu uzorka – 20 ng (4, 7, 8, 9).

Metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (engl. *Multiplex Ligation – dependent Probe Amplification* - MLPA) tehnika je koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR), a specifična je po tome što se zasniva na principu po kojem se umnaža proba dodana uzorku, a ne testirana DNA, što omogućava amplifikaciju i kvantifikaciju 50 različitih sekvenci koristeći samo jedan par proba. Umnažanje proba ovisi o prisutnosti komplementarne sekvence u DNA uzorku. Svaka se MLPA proba sastoji od dva dijela, a svaki od tih dijelova sastavljen je od sekvence od interesa (engl. *Target – specific sequence*) na 3' kraju, obilježene početnice koja je zajednička svim probama na 5' kraju, te produkta kloniranja u jedan od specifičnih vektora (M13 – *derived* SALSA vektor) koji sadrži restriksijska mjesta i jedinstvene popunjujuće (engl. *Stuffer*) sekvence.

Tablica 1. Opis MLPA proba

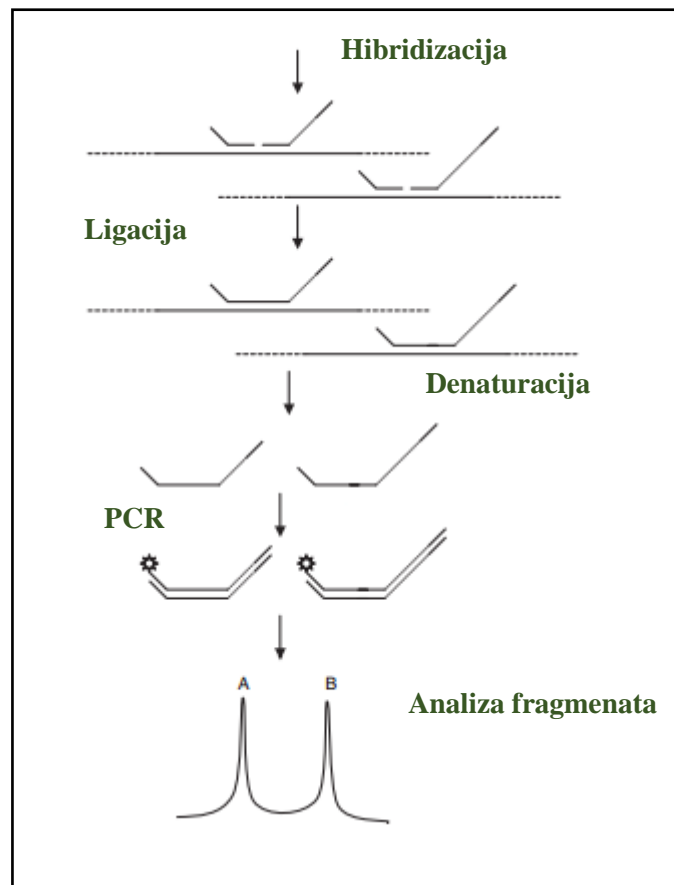
MLPA proba	3' kraj	5' kraj
<b>Kratki sintetizirani oligonukleotid</b>	Dio Sekvence od interesa (engl. <i>Target – specific sequence</i> ), dužine 21 – 30 nukleotida	Fluorescentno obilježena početnica, zajednička svim MLPA probama, dužine 19 nukleotida
<b>Duži dio probe</b>	Drugi dio sekvence od interesa, dužine 25 – 43 nukleotida	Komplementarna PCR početnica dužine 36 nukleotida, jedinstvena za sve probe

Svaka je MLPA proba naposljetku dugačka 100 – 500 nukleotida, sastavljena od kombinacije popunjujućih sekvenci i sekvenci od interesa različitih duljina. Takav im dizajn omogućava istovremenu hibridizaciju do 50 proba.



Slika 2. Shematski prikaz MLPA probe – hibridizacijska sekvenca

Samo u slučaju kada su oba dijela probe hibridizirala cijelom dužinom, na komplementarnu DNA u uzorku, moguća je ligacija lijeve i desne strane probe enzimom, nakon čega je moguća PCR reakcija – umnažanje i kvantifikacija MLPA proba.



Slika 3. Shematski prikaz MLPA analize

Fragmenti dobiveni PCR reakcijom identificiraju se i kvantificiraju kapilarnom elektroforezom na ABI 3500 genetičkom analizatoru (Applied Biosystems, Foster City, California, US). Dobiveni se podatci analiziraju Coffalyser programom ustupljenim od proizvođača (MRC – Holland). Upravo je interpretacija rezultata presudna u procjeni kvalitete korištenja MLPA analize u genetičkoj molekularnoj dijagnostici. Naime, homozigotne ili hemizigotne (prisutan samo jedan od dva parna kromosoma) delecije su jasno vidljive i mogu se interpretirati sa sigurnošću, dok interpretacija heterozigotnih duplikacija i delecija predstavlja izazov jer stvaraju različitu visinu pikova. Zbog olakšavanja interpretacije dobivenih rezultata, prema preporuci proizvođača, rade se po tri kontrole za svaku seriju od 5 uzoraka.

## 1.2. Kromosomske anomalije

Otkrićem već spomenutih znanstvenika (Tijo i Levan, 1956.) danas znamo da bi svaka somatska stanica čovjeka trebala imati 46 kromosoma, odnosno 22 homologna para autosoma i jedan par gonosoma (spolni kromosomi) koji se razlikuju s obzirom na spol osobe (žene: XX, muškarci: XY) (1).

Kromosomske anomalije predstavljaju veliku promjenu u genomu, a mogu nastati spontano ili mogu biti inducirane zračenjem ili kemikalijama. Uglavnom nastaju u gametogenezi, ali mogu nastati i postzigotno, tijekom embriogeneze. Dijelimo ih na strukturne promjene ili kromosomske aberacije (engl. *chromosomal aberration* – CA) i promjene broja kromosoma. Kromosomske aberacije dijelimo na kvalitativne i kvantitativne promjene s obzirom na to je li došlo do promjene u veličini genoma, a bolesti i anomalije koje uzrokuju nazivamo sindromima. Kvantitativne promjene su delecije i duplikacije (10, 11, 12).

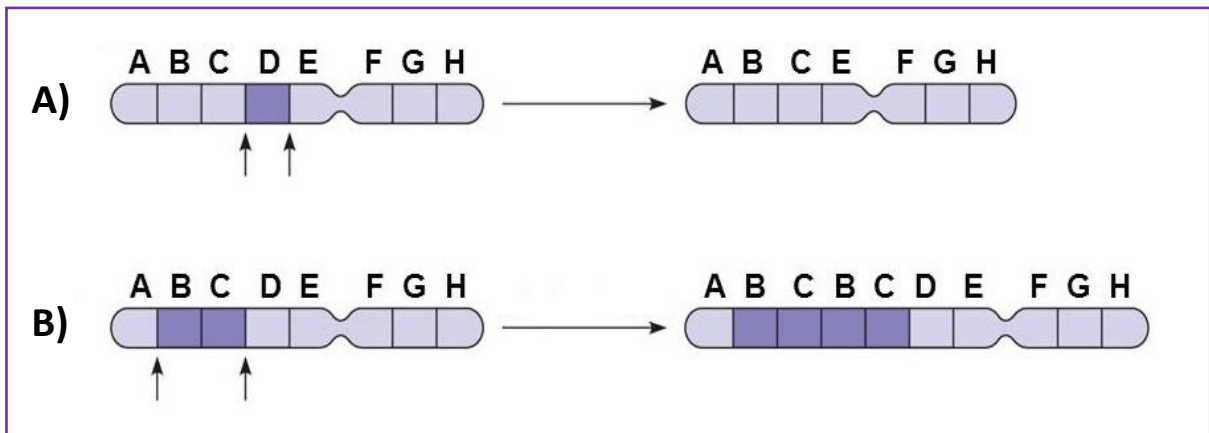
### 1.2.1. Kromosomske mikrodelecije i mikroduplikacije

Mehanizam nastanka kromosomskih aberacija temelji se na gubitku, dodavanju ili premještanju kromosomskih segmenata kao posljedica mehanizma popravka loma dvolančane DNA. Lom dvolančane DNA (engl. *double – strand break* – DSB) u stanici može uzrokovati staničnu smrt, kromosomska preuređenja, onkogenu transformaciju i niz drugih staničnih abnormalnosti koje mogu uzrokovati različite bolesti i poremećaje (11).

Kromosomske mikrodelecije i mikroduplikacije povezane su s nastankom različitih oblika sindroma intelektualnog zaostajanja još osamdesetih godina prošlog stoljeća. Najpoznatiji primjeri su Prader-Willi i Angelman sindrom, te Smith-Magenis i Williams-Beuren sindrom opisani su na nekoliko grupa pacijenata koji su dijelili prepoznatljivu kliničku sliku (13). To dovodi do spoznaje o važnosti detaljnog opisa kliničkih simptoma pojedinog pacijenta kako bi se dijagnostici pristupilo što specifičnijom metodom.

Navedene aberacije stvaraju brojčane varijante pojedinih dijelova kromosoma (engl. *Copy-number variants* – CNV), a detektiraju se usporedbom s referentnim ljudskim genomom. Ovisno o veličini (mjere se u kilobazama, megabazama, a ponekad su u pitanju i cijeli

kromosomi – monosomije, trisomije) i broju gena koje zahvaćaju, CNV mogu uzrokovati bolesti, a mogu biti u potpunosti benigni (14).



Slika 4. Shematski prikaz delecije (A) i duplikacije (B) kromosoma

### 1.3. Mentalna retardacija

Mentalna retardacija (MR) / razvojno zaostajanje (RZ) stanje je zaostalog 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 (15). Različiti se termini koriste u različitim razvojnim stadijima; RZ u dječjoj dobi kada nije moguće formalno testirati inteligenciju i postaviti sigurnu dijagnozu mentalne retardacije. Sukladno navedenom, MR nije bolest niti specifična nesposobnost, nego naziv za određena genetska, socijalna i medicinska stanja kojima je zajednička karakteristika psihološka, biološka i socijalna disfunkcija pojedinca.

Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema, razlikujemo 4 supkategorije mentalne retardacije: laka, umjerena, teška i duboka mentalna retardacija (15).

Etiologija nastanka MR ima nekoliko klasifikacija, prema nekim autorima, povezana je s biološkim, psihosocijalnim i kombiniranim čimbenicima, a prema vremenu nastanka

razlikujemo tri skupine: prenatalni – nastaju od trenutka začeća do poroda, perinatalni – nastaju tijekom poroda te postnatalni – nastaju od poroda do 18. godine (16, 17, 18).

Incidencija pojavnosti RZ-a i MR-a je 1 – 3 % (7). Uobičajeno testiranje koje se provodi za pacijente s uputnom dijagnozom mentalne retardacije ili razvojnog zaostajanja su citogenetičke analize za detekciju kromosomskih abnormalnosti – izrada standardne kariotipizacije i molekularno-genetičke analize za fragilni X sindrom, kojima je moguće detektirati uzrok nastanka poremećaja kod 3 – 15 % pacijenata, ovisno o kvaliteti selekcije pacijenata s obzirom na kliničku sliku i incidenciju pacijenata s Down sindromom uključenih u provedena istraživanja (6, 7).

Primjenom novih tehnologija za detekciju kromosomskih abnormalnosti (FISH, MLPA, CGH, NGS) moguće je odrediti razlog nastanka određenog poremećaja u 99 % slučajeva s genetičkom etiologijom. Na žalost, navedene su metode uglavnom preskupe za standardnu kliničku primjenu pa je svrha takvih istraživanja odrediti najpovoljniju metodu koja će istovremeno biti korisna kao metoda probira u evaluaciji klinički značajnih i novodefiniranih varijacija u broju kopija DNA povezanih s intelektualnim zaostajanjem. Sukladno tomu, metoda istovremenog umnažanja vezanih proba – MLPA čini se kao najbolja alternativa (4, 5).

S obzirom na to da je poznato da su subtelomerne regije kromosoma bogate genima, pretpostavka je da se većina nepravilnosti koje uzrokuju mentalne retardacije nalaze upravo na navedenim regijama (19). Stoga će u ovom istraživanju biti korištene MLPA probe za subtelomerne regije u svrhu određivanja mogućnosti detekcije kromosomskih abnormalnosti – mikrolelecija i mikroduplikacija.

### 1.3.1. Povezanost promjena u subtelomernim regijama kromosoma s nastankom mentalne retardacije

Kasnih 1930-ih godina američki je genetičar Hermann Muller prvi opisao jedinstvene kromosomske krajeve i njihove funkcije te ih nazvao telomerama. Proučavajući učinke radioaktivnog X-zračenja na eukariotske kromosome (istraživanje za koje je 1946. godine nagrađen Nobelovom nagradom za fiziologiju ili medicinu – otkrio je da mutacije mogu biti izazvane X-zračenjem) primijetio je kako su upravo spomenuti krajevi kromosoma otporni na učinke X-zraka. Nekoliko godina kasnije, istraživanje američke znanstvenice i citogenetičarke

Barbare McClintock, također dobitnice Nobelove nagrade za fiziologiju ili medicinu kojom je nagrađena 1983. godine za otkriće transpozona (engl. *transposable element – TE or transposon*) ili „skakajućih gena“ (engl. „*jumping genes*“) i postala prvom ženom koja je tu nagradu dobila samostalno, pomoglo mu je donijeti zaključak da je ključna uloga telomera zaštita krajeva kromosoma od degradacije te fuzije s ostalim telomerama. Danas znamo da telomere ne sadrže aktivne gene, nego ponavljajuću DNA sekvencu i specifično vezujuće proteine koji tvore jedinstvenu strukturu, različitu od ostatka kromatina (20, 21).

Prema istraživanjima, otprilike polovica svih strukturnih kromosomskih abnormalnosti upućuje na nepravilnosti vezane za telomere (5, 19). Odličan su primjer već spomenuti sindromi Wolf-Hirschhorn (4p-) i Cri-du-Chat (5p-) čije su mikroskopski vidljive delecije uglavnom smještene u subtelomernoj regiji, a uzrokuju mentalnu retardaciju povezanu sa specifičnim fenotipom (19). No, većina slučajeva s dokazanim subtelomernim nepravilnostima nema poveznicu sa specifičnim fenotipom pa se testovi probira (engl. *screening*) telomernih aberacije smatraju ključnim za postavljanje dijagnoze. Subtelomerne nepravilnosti (kromosomske aberacije) povezujemo s nastankom mentalne retardacije jer je činjenica da je gustoća gena u navedenoj regiji veća nego u ostatku genoma, a proporcionalno raste i mogućnost nastanka pogrešaka za vrijeme replikacije DNA.

## **2. HIPOTEZA**

Pretpostavka ovog istraživanja je da će se korištenjem MLPA metode povećati stopa detekcije suptilnih kromosomskih promjena uključenih u nastanak intelektualnog zaostajanja.



### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Otkrivanje novih genetičkih uzroka intelektualnog zaostajanja MLPA metodom
- Utvrditi prevalenciju kromosomskih aberacija detektiranih tehnikom molekularne citogenetike (MLPA)
- Procjena MLPA tehnike kao metode probira u evaluaciji klinički značajnih i novodefiniranih varijacija u broju kopija DNA (višak ili manjak broja kopija DNA) povezanih s intelektualnim zaostajanjem.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Retrospektivno istraživanje kromosomskih promjena u subtelomernim regijama kod pacijenata s intelektualnim zaostajanjem.

### 4.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 50 ispitanika (10 djevojčica i 40 dječaka) s uputnom dijagnozom mentalnog zaostajanja, upućenih s Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Za sve je ispitanike pribavljen informirani pristanak roditelja (skrbnika) te pohranjen u arhiv Laboratorija. Uzorci krvi uzeti su u svrhu izrade standardne kariotipizacije i molekularno-genetičke analize za fragilni X sindrom, koje je potrebno prve isključiti kod obrade djeteta s intelektualnim poteškoćama. Uzorci su uzorkovani na minimalno invazivan način, jednokratnom venepunkcijom periferne krvi u epruvete s antikoagulansom EDTA te pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku do analize. Po zaprimanju, uzorci su u laboratoriju označeni jedinstvenim laboratorijskim brojem. Svim je ispitanicima napravljena analiza subtelomernih regija svih kromosoma MLPA metodom na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani.

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku odobrilo je provođenje istraživanja.

### 4.3. Metode

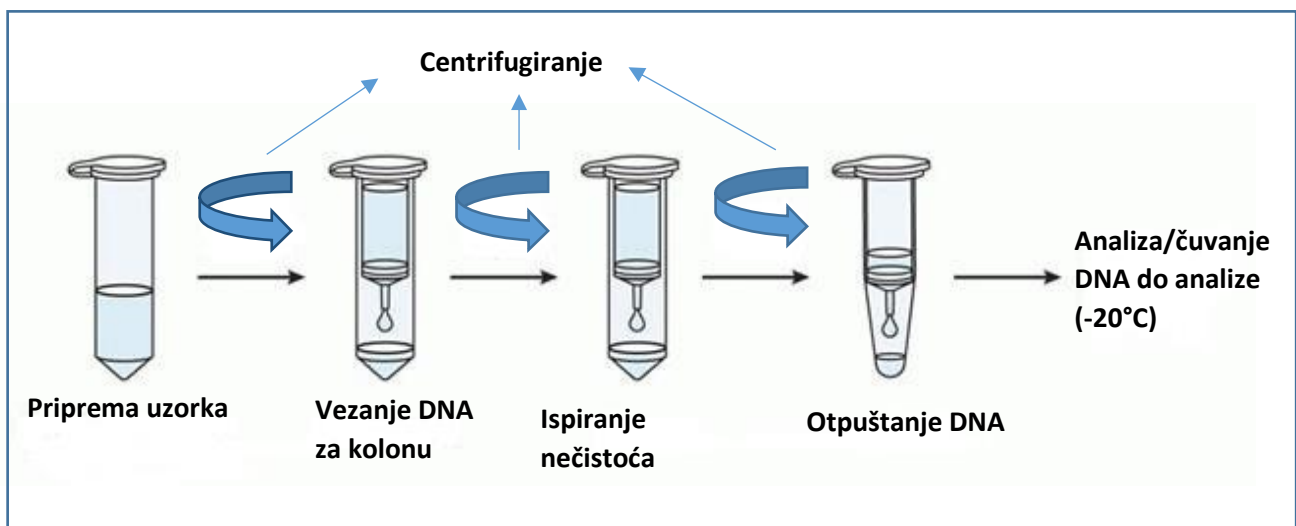
#### 4.3.1. Izolacija genomske DNA Qiagen kompletom reagensa

Kod svih je ispitanika za potrebe MLPA analize genomska DNA izolirana iz 2 ml periferne venske krvi upotrebom komercijalnog kita prema protokolu proizvođača (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Uzorci krvi bili su pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  u Laboratoriju te neposredno prije izolacije odmrznuti pri sobnoj temperaturi.

Prije početka rada važno je pripremiti reagense prema uputi proizvođača (Qiagen, Hilden, Germany) i potreban materijal.

#### POSTUPAK:

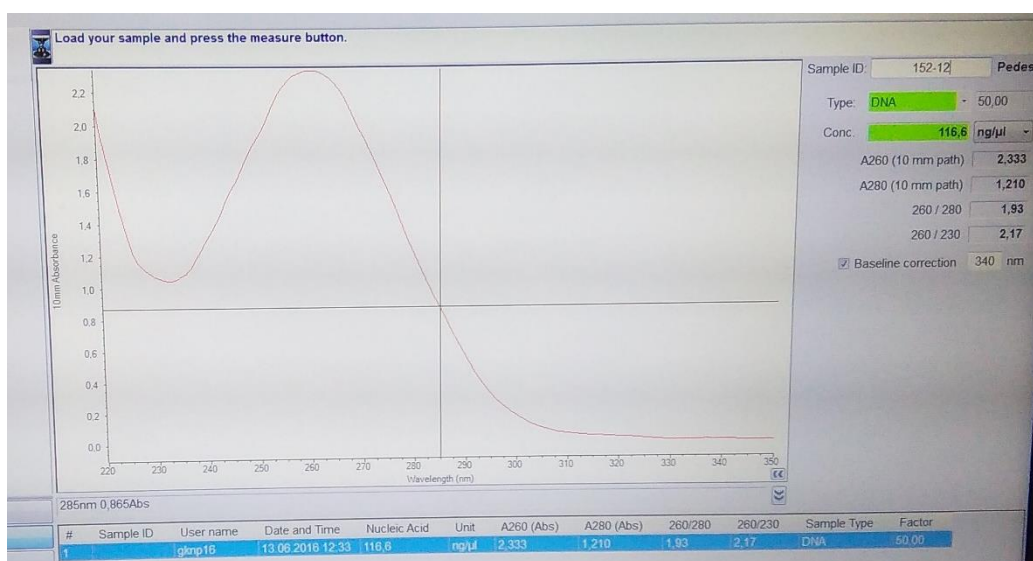
U tubice za centrifugiranje od 15 ml pipetira se 200  $\mu$ l enzima koji služi za neselektivnu razgradnju proteina – proteinaze K. Zatim se dodaje 2 ml uzorka pune krvi i 2,4 ml AL pufera koji služi za liziranje stanica te se smjesa promiješa. Slijedi inkubacija na 70°C kroz 10 minuta. Nakon inkubacije 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. Kolonu je potrebno zatvoriti, a zatim centrifugirati na 1850 x g kroz 3 minute. Supernatant se potom odlijeva, a kolona se premješta u novu tubicu za centrifugiranje od 15 ml, dodaje se druga polovica početne otopine i ponavlja se postupak s centrifugiranjem (1850 x g / 3 min). Ponovno se odbacuje supernatant, a kolona se stavlja u novu tubicu za centrifugiranje u koju se dodaje 2 ml pufera AW1 te centrifugira na 4500 x g kroz 1 minutu. Postupak se ponavlja s dodavanjem pufera AW2, ali centrifugiranje se provodi kroz 15 minuta. Korištenjem različitih pufera tijekom postupka postiže se mijenjanje ionske jakosti (uvjetima visoke ionske jakosti postiže se vezanje DNA za kolonu, a nečistoće se mogu isprati). Sljedeće se dodaje 200  $\mu$ l AE pufera niske jakosti, koji potiče otpuštanje DNA, i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi prije centrifugiranja na 4500 x g kroz 2 minute. DNA se čuva u AE puferu na -20°C do analize.



Slika 5. Shematski prikaz izolacije DNA koristeći kolone

#### 4.3.2. Provjera kvalitete izolirane DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA svih ispitanika određena je NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, US) spektrofotometrom iz 1  $\mu$ l DNA izolata. Koncentracija DNA određuje se na temelju apsorpcijske vrijednosti na 260 nm valne duljine, a izražava se ng/ $\mu$ l, dok se čistoća DNA određuje na temelju omjera valnih duljina DNA / proteini, odnosno 260 / 280 nm koji iznosi približno 1,8 te omjera DNA / soli (260 / 230 nm) koji iznosi 2,0 – 2,2.



Slika 6. Kvantifikacija DNA izolata koristeći NanoDrop 2000 spektrofotometar (fotografija snimljena na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani, svibanj, 2016.)

#### 4.3.3. Analiza subtelomernih regija kromosoma metodom istovremenog umnažanja vezanih proba (MLPA)

MLPA analiza provedena je kod svih ispitanika analizom subtelomera specifičnim setom MLPA proba kako bi se detektirale kromosomske aberacije (SALSA MLPA probemix P036 SUBTELOMERES MIX1 i SALSA MLPA probemix P070 SUBTELOMERES MIX 2B).

Metoda za detekciju duplikacija i delecija omogućava izvođenje analize standardnim protokolom proizvođača neovisno o korištenom setu proba (SALSA MLPA probemix), a provodi se u tri koraka:

## **1. Denaturacija i hibridizacija DNA**

Za svaku je pojedinu reakciju potrebno 5 µl DNA uzorka koncentracije 50 do 100 ng. Prema preporuci proizvođača (MRC – Holland), za sve se izolate koncentracije veće od 100 ng radi dilucija s TE-puferom. Analiza se izvodi u stripovima od 8 tubica volumena 0,2 mL s odgovarajućim poklopcima. Prvi je korak denaturacija koja se izvodi na 98°C u trajanju od 5 minuta, nakon čega se uzorci hlade na sobnoj temperaturi (25°C). Za to se vrijeme pripremi hibridizacijski master-mix u koji se dodaje po 1,5 µl SALSA Probe mixa i 1,5 µl MLPA pufera svaku pojedinu reakciju te se u svaki uzorak doda 3 µl navedenog mixa. Slijedi denaturacija pri 95°C jednu minutu, zatim hibridizacija uzoraka i proba na 60°C kroz 16 do 20 sati.

## **2. Reakcija ligacije**

Nakon hibridizacije, uzorke se ohladi na 54°C te se u svaku tubicu dodaje 32 µl ligacijskog master-mixa koji se, za svaku pojedinu reakciju, sastoji od 25 µl UltraPure H<sub>2</sub>O, 3 µl Ligase pufera A, 3 µl Ligase pufera B i 1 µl Ligase – 65 enzima. Reakcija se odvija na 54°C kroz 15 minuta, nakon čega slijedi reakcija inaktivacije enzima zagrijavanjem na 98°C kroz 5 minuta.

## **3. Višestruka PCR reakcija – amplifikacija proba**

Po završetku ligacijske reakcije, uspješno spojene MLPA probe umnažaju se lančanom reakcijom polimeraze uz jedan par početnica. Za višestruku PCR reakciju potrebno je pripremiti mix koji se sastoji od 7,5 µl UltraPure H<sub>2</sub>O, 2 µl SALSA PCR primer-mixa te 0,5 µl SALSA Polymerase, za svaku pojedinu reakciju. Na sobnoj se temperaturi u svaku tubicu dodaje 10 µl pripremljenog mixa i nježno promiješa pipetom. Reakcijska se smjesa u tubicama vraća u termo-blok u kojemu se nastavlja PCR program pri sljedećim uvjetima: 1. denaturacija pri 95°C / 30 sekundi, 2. sparivanje primera pri 60°C / 30 sekundi, 3. sinteza pri 72°C / 60 sekundi u 35 ponavljanja. Zatim slijedi završna sinteza pri 72°C / 20 minuta te hlađenje uzoraka na 15°C.

### **4.3.3.1. Setovi MLPA proba korištenih u istraživanju**

U istraživanju su korištena dva seta proba, prema preporuci proizvođača za analizu subtelomernih regija – P036 i P070. Svi su uzorci testirani na obje probe (ime proizvoda:

SALSA MLPA probemix P036 Subtelomeres MIX 1 i SALSA MLPA probemix P070 Subtelomeres Mix 2B).

SALSA MLPA proba P036 obuhvaća 47 MLPA proba s amplifikacijskih produktima: 2 probe za svaki kromosom i 1 probu za kromosom Y. Taj set ne obuhvaća probe za subtelomerne regije 5 akrocentričnih kromosoma (13, 14, 15, 21 i 22) pa je za te kromosome uključena dodatna proba za detekciju q kraka u blizini centromere. Jednako je i za probu P070.

#### 4.3.4. Detekcija MLPA proba kapilarnom elektroforezom

Sve MLPA probe razdvajaju se i detektiraju kapilarnom elektroforezom. U istraživanju je korišten ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, California, US) genetički analizator s 8 kapilara dužine 50 cm. Korišten je polimer POP-7.



Slika 7. Genetički analizator ABI 3500, Applied Biosystems korišten u istraživanju (Fotografija snimljena na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku, svibanj, 2016.)

Prije analize uzorke za kapilarnu elektroforezu potrebno je pripremiti prema sljedećem protokolu: u tubice za sekvencer dodaje se 14,75  $\mu$ l prethodno pripremljenog mixa (za svaku

reakciju: 0,75 µl H<sub>2</sub>O + 0,5 µl internog standarda GeneScan LIZ – 600 (GeneScan LIZ – 600 Size standard, Applied Biosystems) + 13,5 µl HiDi formamida (HiDi formamide Applied Biosystems)) i 0,75 µl produkta PCR reakcije. U slučaju da broj uzoraka ne doseže 8, u tubice bez uzorka dodaje se formamid do 20 µl, kako se kapilara analizatora ne bi osušila.

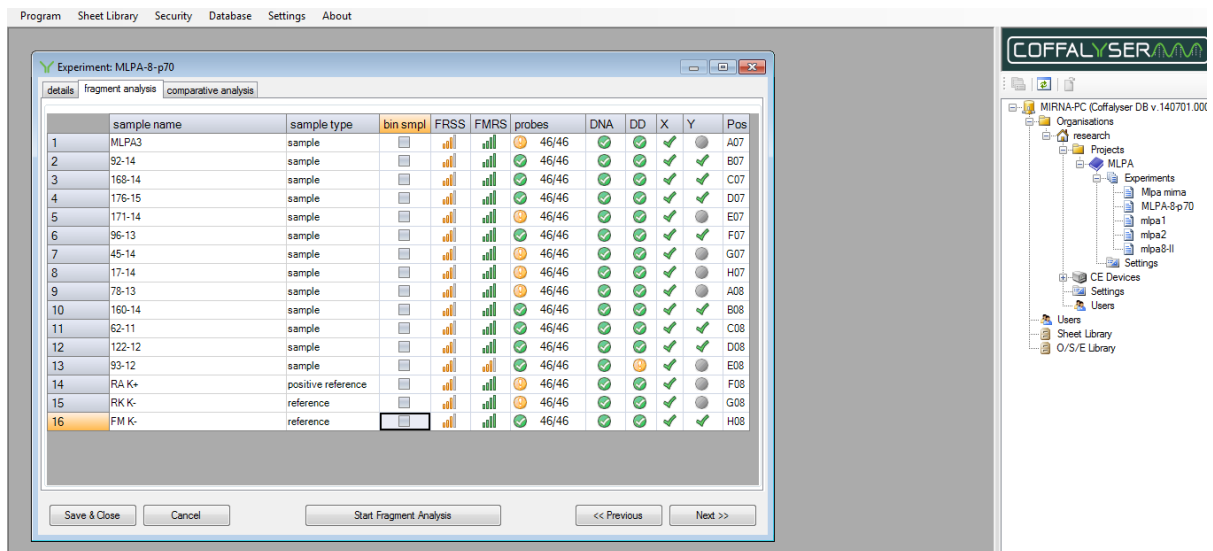
Uzorke pripremljene na opisani način potrebno je denaturirati pri 86°C kroz 3 minute. Nakon hlađenja do 4°C, uzorci su spremni za analizu na genetičkom analizatoru.

#### 4.3.5. Analiza MLPA podataka

Za analizu MLPA podataka koristi se softver Coffalyser omogućen od proizvođača i dostupan za slobodno korištenje na mrežnoj stranici (web stranica: [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)) proizvođača – MRC – Holland (Amsterdam, The Netherlands). Prema preporukama, svaki se uzorak analizira u usporedbi s tri kontrolna uzorka. U istraživanju su korištena dva negativna referentna uzorka i jedan pozitivni.

Analiza MLPA fragmenata dobivenih kapilarnom elektroforezom sastoji se od nekoliko koraka kako bi se identificirali i kvantificirali signali koji potječu od različitih proba.

Prvi je korak analiza fragmenata čijim je vizualnim pregledom moguće utvrditi kvalitetu MLPA reakcije. U ovom se koraku provjerava kvaliteta DNA uzorka, MLPA reakcije, odvajanje kapilarnom elektroforezom i normalizacija. Kvalitetu svakog od navedenih koraka analize možemo podijeliti u tri kategorije, označene bojama: 1) visoko kvalitetni – zeleno (engl. *high-quality or green*) – rezultati mogu biti prihvaćeni bez dodatnog pregleda, 2) nisko kvalitetni – crveno (engl. *low-quality or red*) – predstavlja uzorke koji su vjerojatno kontaminirani ili postoje drugi propusti tijekom izvođenja MLPA analize. Takvi se rezultati odbijaju bez dodatnog pregleda i preporučuje se ponoviti analizu, 3) srednje kvalitetni – žuto (engl. *intermediate – quality or yellow*) – rezultati se nalaze između visoko i nisko kvalitetnih, preporučeno je napraviti dodatan pregled koristeći navedeni softver i samostalno odlučiti o prihvaćanju rezultata.

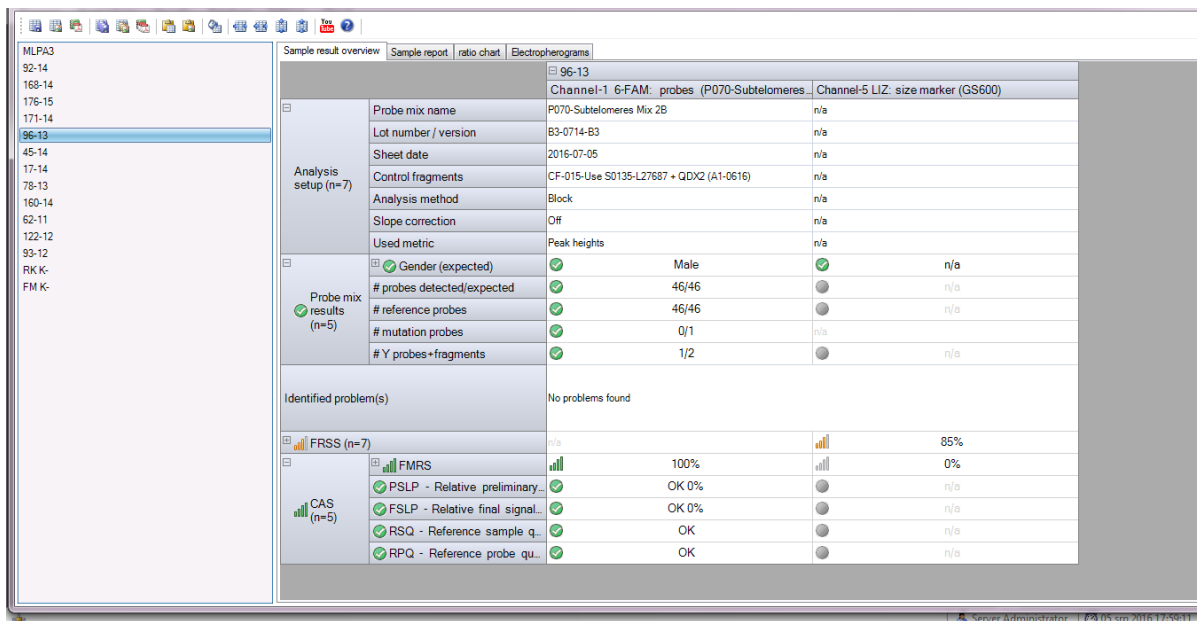


Slika 8. Inicijalna analiza produkata kapilarne elektroforeze softverom Coffalyzer korištenim u istraživanju. Stupci predstavljaju: a) FRSS (engl. *fragment run separation score*) – kvaliteta razdvajanja fragmenata i određivanja veličine pika u usporedbi s korištenim standardom, b) FMRS (engl. *fragment MLPA reaction score*) – kvaliteta izvedene MLPA reakcije, c) Probe (engl. *Probes*) – broj probi identificiran u uzorku u odnosu na očekivani broj proba.

Nakon inicijalne analize produkata kapilarne elektroforeze slijedi usporedna analiza produkata (engl. *comparative analysis*). Softver je prilagođen na način da uspoređuje kontrolne uzorke s testiranim uzorcima stavljajući u zajednički omjer dobivene signale testiranih proba. Kontrolni su uzorci međusobno također uspoređeni i što je manja razlika u visini pikova između kontrolnih uzoraka to će analiza biti pouzdanija.

Usporednom analizom produkata, ako je pravilno izveden svaki prethodni korak, završena je softverska analiza. Rezultati su dostupni za interpretaciju u nekoliko oblika – grafom (engl. *ratio chart*), elektroferogramom (engl. *electropherogram*) te tablicom s brojčanim rezultatima (engl. *sample report chart*).





Slika 9. Prikaz dostupnih rezultata za svaki od uzoraka analiziranih Coffalyser softverom

#### 4.4. Statističke metode

Za potrebe istraživanja korištena je deskriptivna statistička obrada. Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučajevima raspodjele koji slijede normalu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

## 5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 50 ispitanika (10 djevojčica i 40 dječaka) s uputnom dijagnozom različitih razvojnih poremećaja koje povezujemo s razvojnim zaostajanjem ili mentalnom retardacijom. Svim je pacijentima napravljena standardna kariotipizacija koja se pokazala urednom, no na osnovi kliničke slike, koja je uključivala niz kliničkih simptoma (dismorfične crte, kongenitalne malformacije, snižen kvocijent inteligencije (engl. *intelligence quotient* – IQ), poremećaji sluha) odlučeno je napraviti detaljniju analizu koristeći MLPA metodu.

Svim je pacijentima analizirana subtelomerna regija svih kromosoma koristeći MLPA probe P036 i P070. Iznimno, akrocentričnim je kromosomima analiziran q krak u blizini centromere.

Od 50 analiziranih pacijenata, omjer dječaka i djevojčica bio je 4 (40 : 10), kod 5 pacijenata dijagnosticirane su kromosomske aberacije korištenjem MLPA metode, i to kod 2 djevojčice i 3 dječaka, odnosno kod 10% pacijenata.

Tablica 2. Prikaz ispitanika s pozitivnim (patološkim) i negativnim (urednim) nalazima dobivenih MLPA metodom prema spolu

	DJEVOJČICE	DJEČACI
<b>PATOLOŠKI NALAZ</b>	2	3
<b>UREDAN NALAZ</b>	8	37
<b>UKUPNO</b>	10	40

Tablica 3. Podatci o pacijentima (godina rođenja i uputna dijagnoza). Pacijenti 47, 48, 49 i 50 nisu prethodno obrađeni u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku pa su podatci o njihovom datumu rođenja i uputnoj dijagnozi nepoznati.

<b>Ispitanik</b>	<b>Lab. oznaka pacijenta</b>	<b>Godina rođenja</b>	<b>Uputna dijagnoza</b>
<b>1</b>	93-12	2004.	Teško psihomotorno zaostajanje, dismorfija fenotipa odgovarajuća Sy. Turner
<b>2</b>	91-10	1999.	Epilepsija
<b>3</b>	109-12	2005.	Dismorfija fenotipa
<b>4</b>	24-14	2013.	Usporen razvoj
<b>5</b>	90-10	2006.	Laka MR (blaža dismorfija fenotipa), sumnja na miopatiju
<b>6</b>	101-11	2004.	Usporen razvoj govora
<b>7</b>	97-11	2006.	Psihomotorno zaostajanje
<b>8</b>	127-11	1999.	Dismorfija fenotipa, ADHD, granične mentalne funkcije
<b>9</b>	92-10	2007.	Usporen razvoj govora
<b>10</b>	122-12	2009.	Usporen razvoj govora
<b>11</b>	152-12	2008.	Usporen razvoj govora, blaža dismorfija fenotipa
<b>12</b>	111-12	2006.	Usporen razvoj govora
<b>13</b>	52-12	2000.	Pretilost, kognitivni deficit
<b>14</b>	89-12	2005.	Psihomotorno zaostajanje
<b>15</b>	144-12	2012.	Dismorfija fenotipa
<b>16</b>	82-13	2006.	Laka MR
<b>17</b>	167-13	2008.	Laka MR
<b>18</b>	96-13	2003.	Umjerena MR
<b>19</b>	78-13	1999.	Granične kognitivne funkcije
<b>20</b>	33-13	2013.	Malformacijski sindrom
<b>21</b>	148-13	2011.	Laka MR
<b>22</b>	156-13	2007.	MR
<b>23</b>	186-13	2009.	MR
<b>24</b>	136-14	2007.	MR
<b>25</b>	109-14	2007.	Laka MR
<b>26</b>	171-14	2008.	Usporen razvoj govora
<b>27</b>	17-14	2001.	Teška MR
<b>28</b>	168-14	2008.	MR
<b>29</b>	157-14	2011.	Dysfunctiones progressus specifici mitaxae
<b>30</b>	45-14	2006.	Laka MR
<b>31</b>	165-14	1998.	Sumnja na sindrom Di Gorge
<b>32</b>	160-14	2011.	Granično kognitivne funkcije

33	97-15	2010.	Pervazivni spektar poremećaja
34	176-15	2008.	Pervazivni poremećaj u razvoju
35	170-15	2009.	Umjeren MR
36	151-15	2006.	Laka MR
37	84-15	2007.	Hiperkinetički poremećaj ophođenja (ADHD)
38	22-10	2006.	Laka MR
39	7-10	2003.	Psihomotorno zaostajanje
40	30-10	2002.	Laka MR
41	44-15	2010.	Laka MR
42	62-11	1996.	Mentalni deficit
43	20-11	2001.	Laka mentalna retardacija
44	50-08	1999.	Prader Willy sindrom in obs.
45	92-14	2007.	Umjeren MR
46	117-15	2003.	Laka MR
47	MLPA1	-	-
48	MLPA3	-	-
49	MLPA6	-	-
50	MLPA7	-	-

Tablica 4. Rezultati pacijenata s dijagnosticiranim kromosomskim aberacijama upotrebom MLPA proba za analizu subtelnih regija. (Ž – ženski spol, M – muški spol, [+] – pozitivan nalaz dobiven korištenjem označene MLPA probe, [-] – uredan nalaz dobiven korištenjem označene MLPA probe).

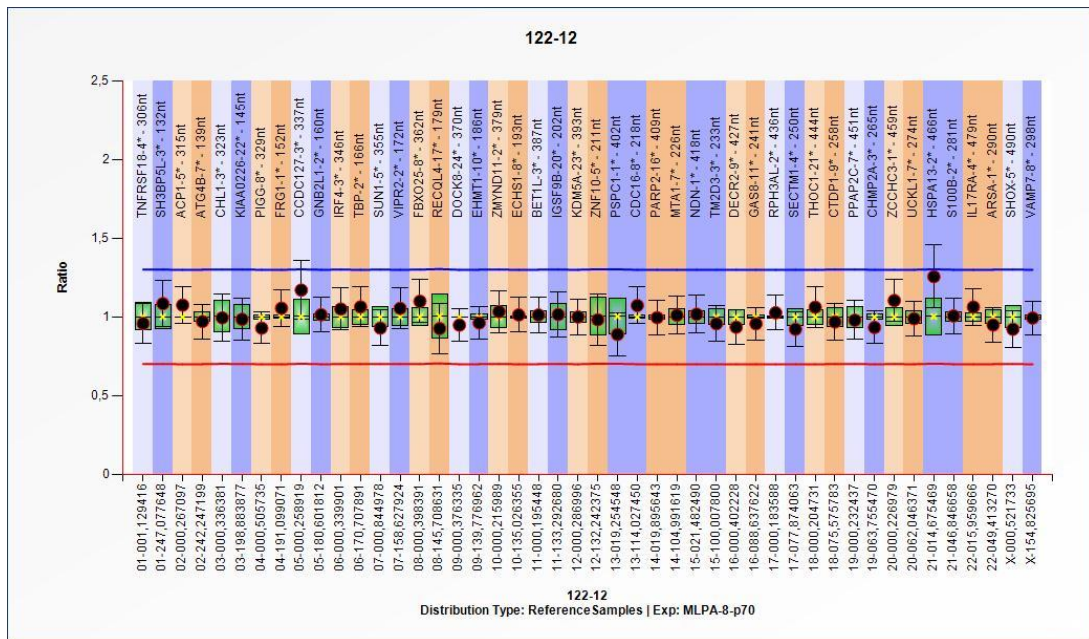
Ispitanik	Lab. oznaka pacijenta	Spol	MLPA proba P036	MLPA proba P070	Kromosom	Tip kromosomske aberacije
1	93-12	Ž	+	+	Xp22PAR Xq28	mikrodelecija
2	91-10	Ž	-	+	19q13.43	mikrodelecija
3	109-12	M	-	+	19q13.43	mikrodelecija
4	24-14	M	+	-	21q22.3	mikroduplicacija
5	90-10	M	+	+	15q11.2	mikroduplicacija

Istraživanje je pokazalo da je MLPA proba P070 u odnosu na MLPA probu P036 imala veću osjetljivost. Proba P036 pokazala je pozitivan rezultat kod 3/5 pacijenata, a proba P070 kod 4/5 pacijenata.

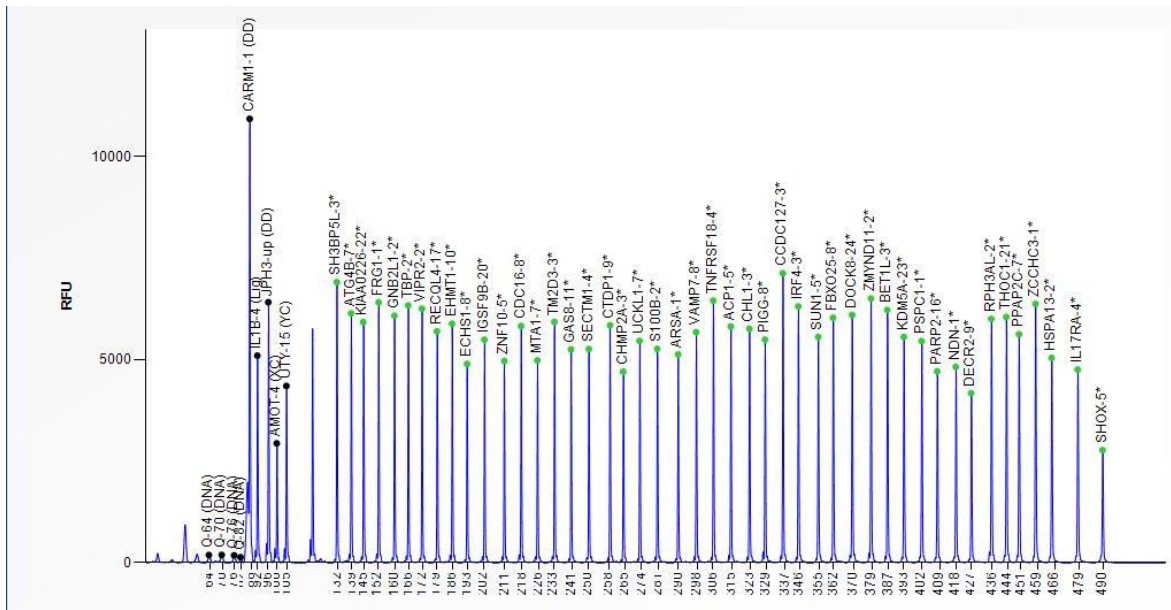
Kod svakog je pacijenta čiji je nalaz MLPA analize bio pozitivan uočena jedna vrsta kromosomske aberacije (ili mikrodelecija ili mikroduplikacija), dok je kod ispitanika 1 uočena mikrodelecija na oba kraka X kromosoma.

## Primjer 1. Ispitanik s urednim nalazom

Urednim nalazom smatramo rezultat koji, uspoređen s tri kontrolna uzorka (2 negativna i 1 pozitivan kontrolni uzorak), pripada u raspon od 0,70 do 1,30. Rezultate s nalazima manjim od 0,70 smatramo mikrodelecijama, a veće od 1,30 mikroduplikacijama.



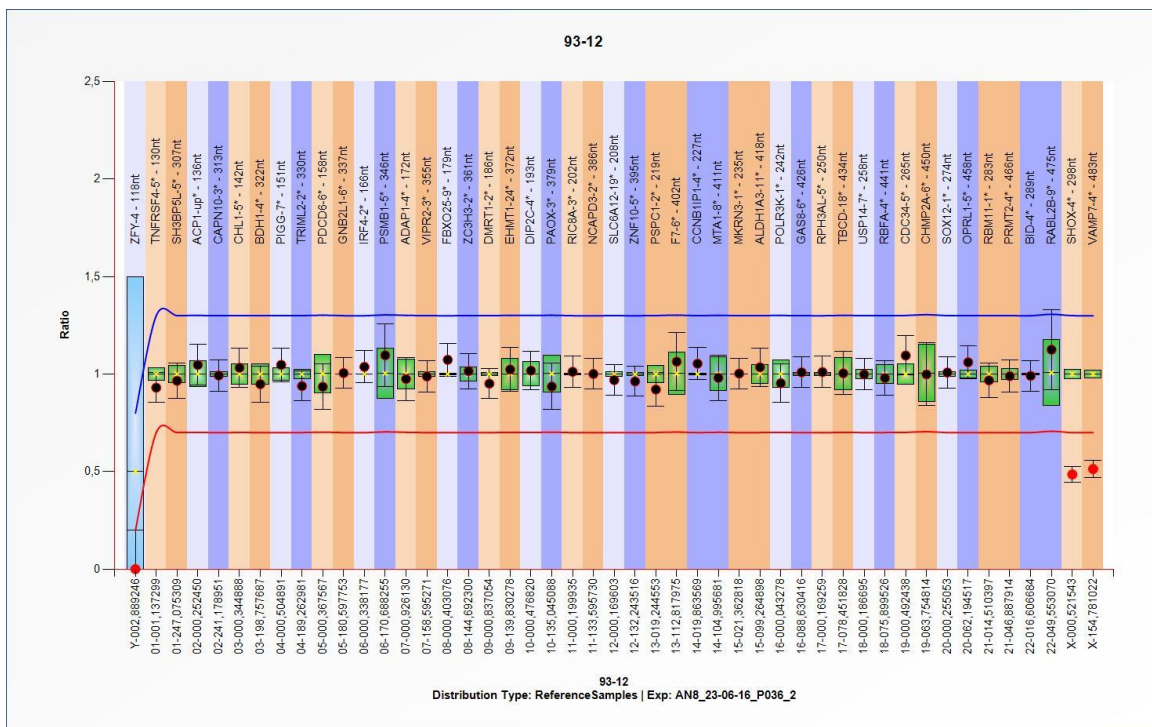
Slika 10. Grafički prikaz (engl. *ratio chart*) analize subtelomernih regija svih kromosoma dobiven MLPA metodom primjenom MLPA probe P070



Slika 11. Elektroferogram (engl. *electropherogram*) pacijenta s urednim nalazom dobiven primjenom MLPA probe P070

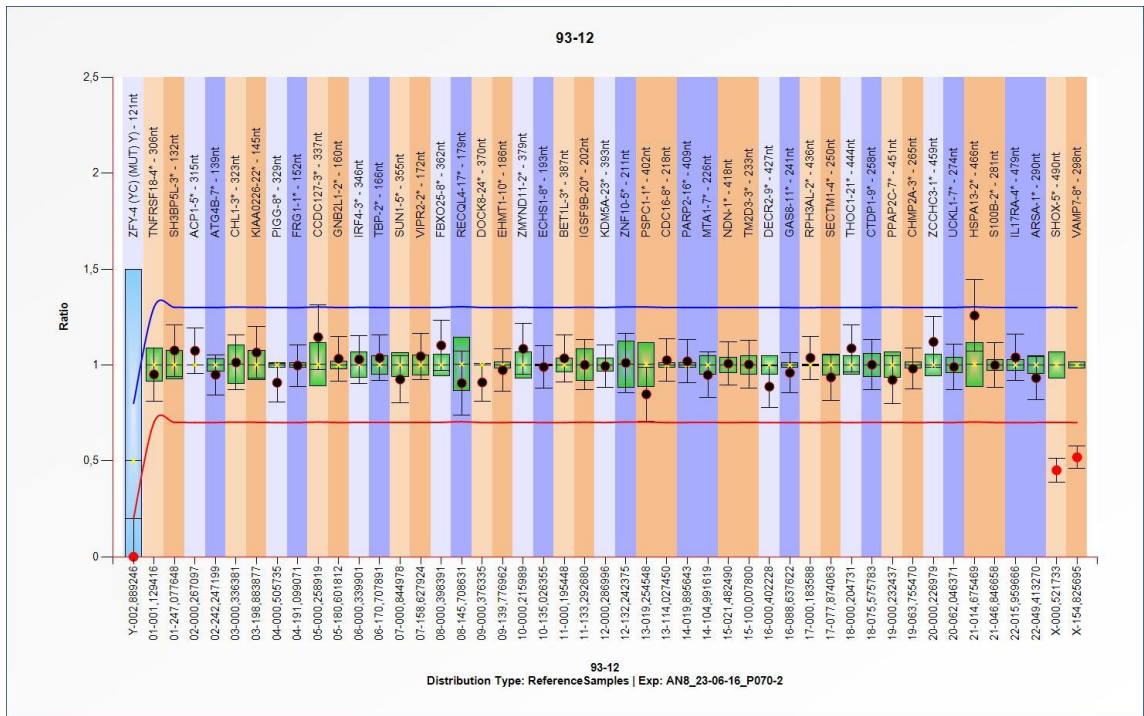
## Primjer 2. Ispitanik 1 (93-12) – mikrodelecija na oba kraka X kromosoma

Ispitanik 1 je djevojčica (2004.) čija je uputna dijagnoza teško psihomotorno zaostajanje i dismorfija fenotipa koja odgovara Turnerovom sindromu. Kariogram napravljen 2012. godine u Laboratoriju za citogenetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, bio je uredan. MLPA analiza je kod te pacijentice pokazala mikrodeleciju na oba kraka (p i q) X kromosoma, korištenjem obje MLPA probe (P036 i P070).



Slika 12. Grafički prikaz uzorka 1 (93-12) u kojem je utvrđena mikrodelecija primjenom MLPA probe P036

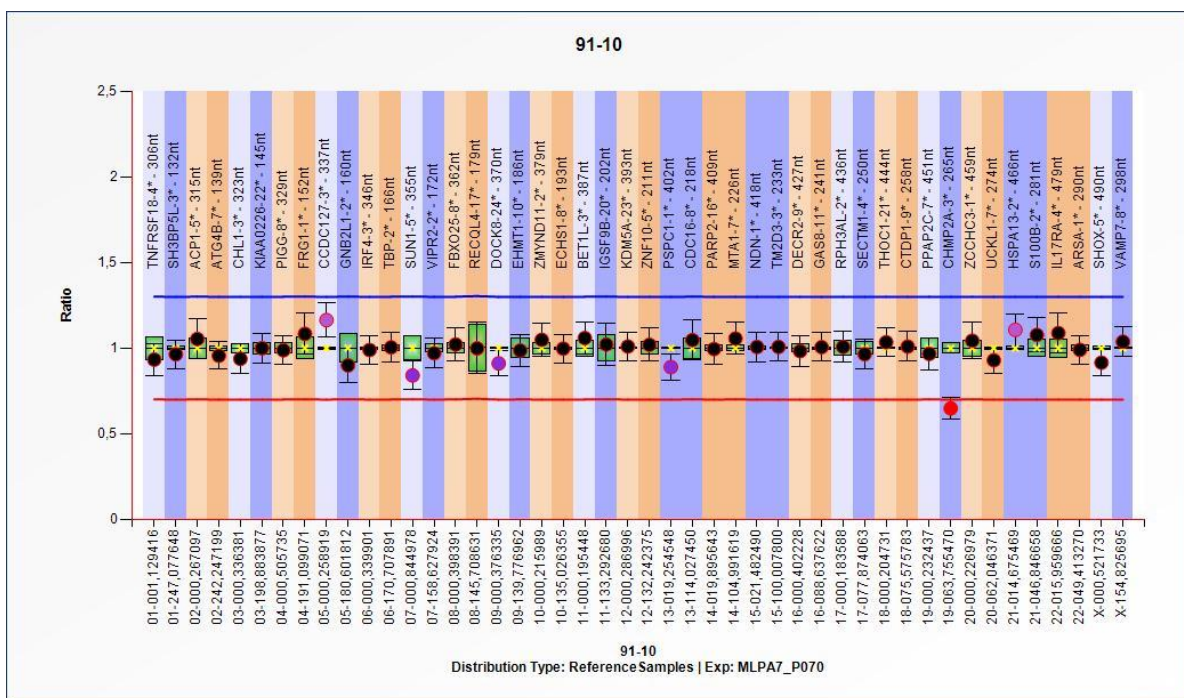




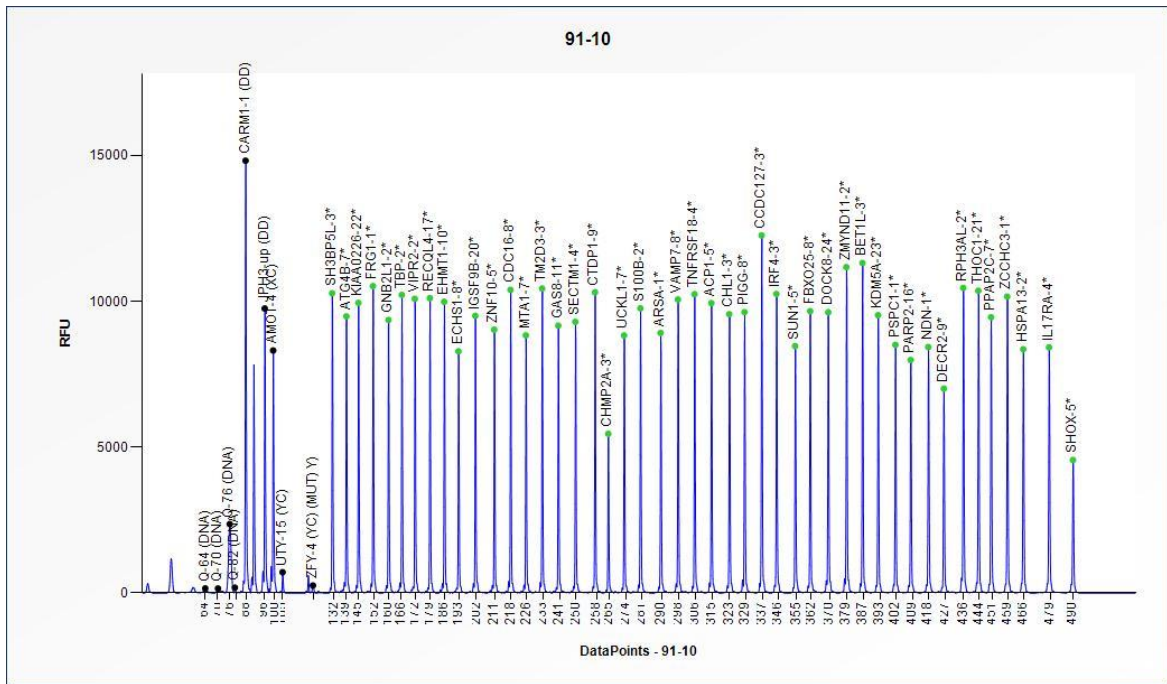
Slika 13. Grafički prikaz uzorka 1 (93-12) u kojemu je utvrđena mikrodelecija primjenom MLPA probe P070

### Primjer 3. Ispitanik 2 (91-10) – mikrodelecija (19q13.43)

Ispitanik 2 je djevojčica s uputnom dijagnozom epilepsije čiji je kariogram napravljen u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, 2010. godine bio uredan. MLPA analiza pokazala je mikrodeleciju na q kraku 19 kromosoma (19q13.43) korištenjem MLPA probe P070.



Slika 14. Grafički prikaz uzorka 2 (91-10) u kojemu je utvrđena mikrodelecija primjenom MLPA probe P070

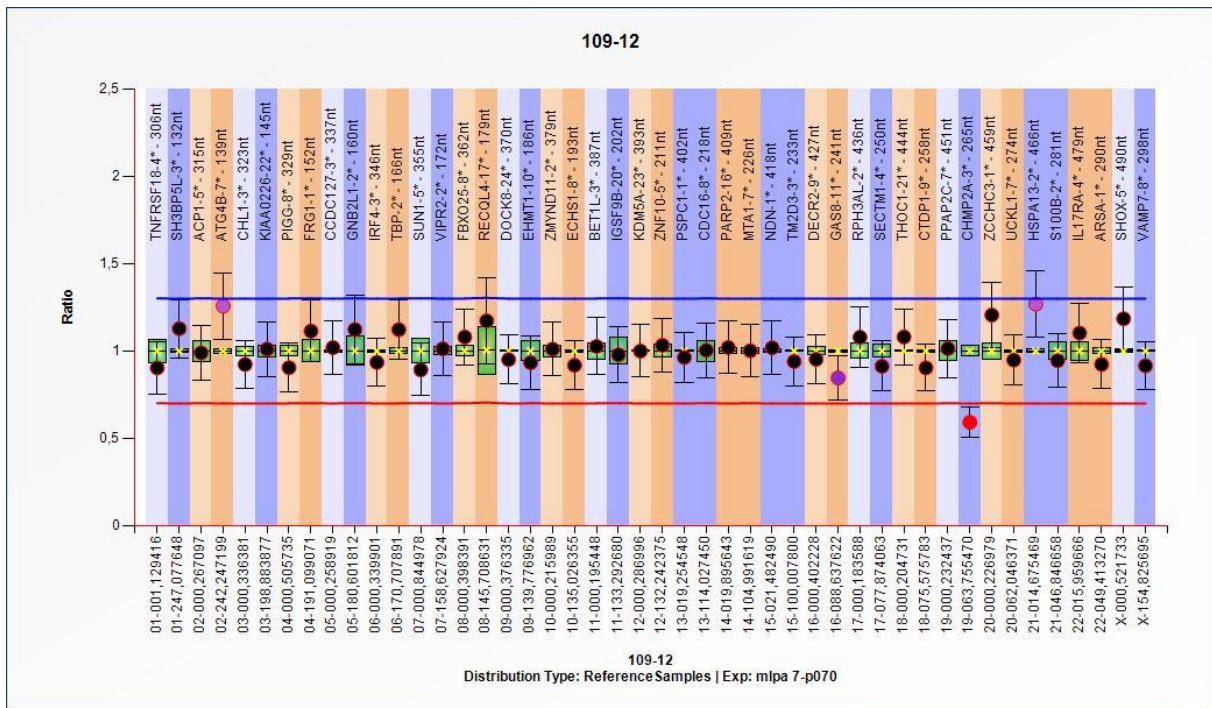


Slika 15. Elektroferogram uzorka 2 (91-10) u kojemu je utvrđena mikrodelecija primjenom MLPA probe P070

### Primjer 4. Ispitanik 3 (109-12) – mikrodelecija (19q13.43)

Ispitanik 3 je dječak (2005.) koji je s Klinike za pedijatriju KBC-a Osijek poslan na genetičku obradu s uputnom dijagnozom dismorfija fenotipa s EEG nalazom koji pokazuje paroksizmalnu promjenu. Kariogram koji je napravljen 2012. godine pokazao se urednim. Uključen je u istraživanje i napravljena je MLPA analiza subtelomernih regija probama P036 i P070 te dokazana delecija 19. kromosoma (19q13.43).

Positivan rezultat dobiven je probom P070.

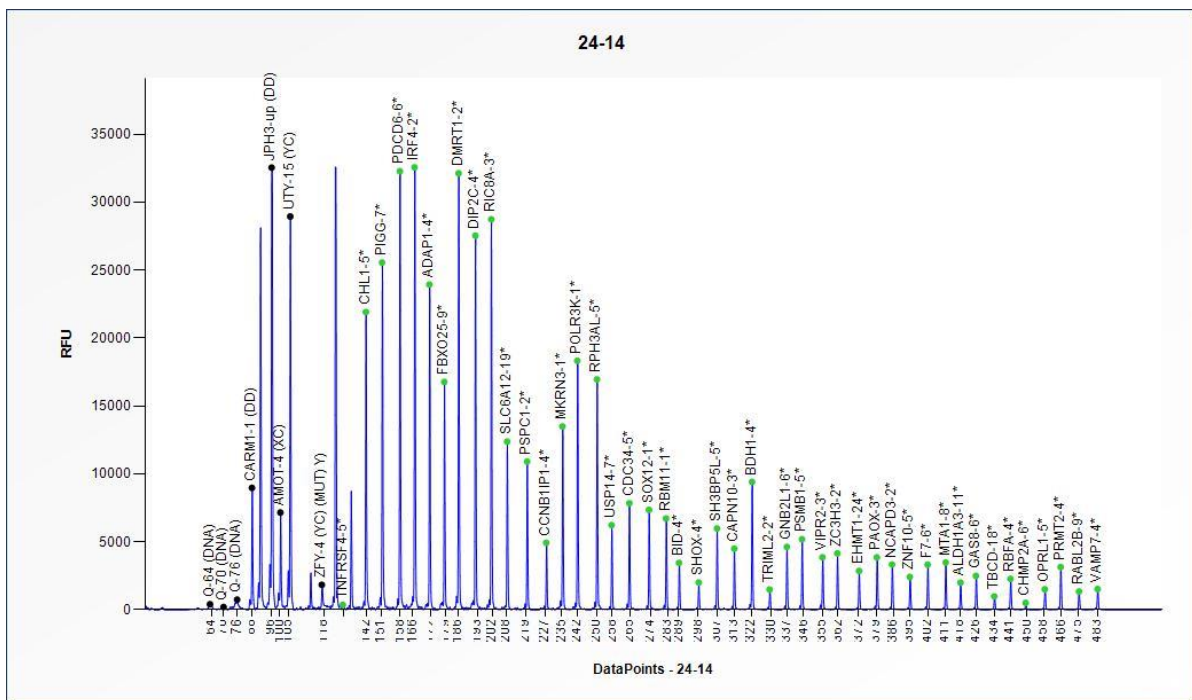


Slika 15. Grafički prikaz uzorka 3 (109-12) u kojemu je utvrđena mikrodelecija primjenom MLPA probe P070

### Primjer 5. Ispitanik 4 (24-14) – mikroduplikacija (21q22.3)

Ispitanik 4 je dječak rođen 2013. godine koji je s uputnom dijagnozom usporenog razvoja 2014. godine poslan na genetičku obradu u Laboratorij za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek. Inicijalnom analizom dobiven je uredan nalaz te je dječak uključen u istraživanje kako bi se na uzorku njegove venske krvi napravila MLPA analiza subtelnih regija probama P036 i P070.

MLPA analizom dokazana je mikroduplikacija 21. kromosoma (21q22.3) korištenjem probe P036.



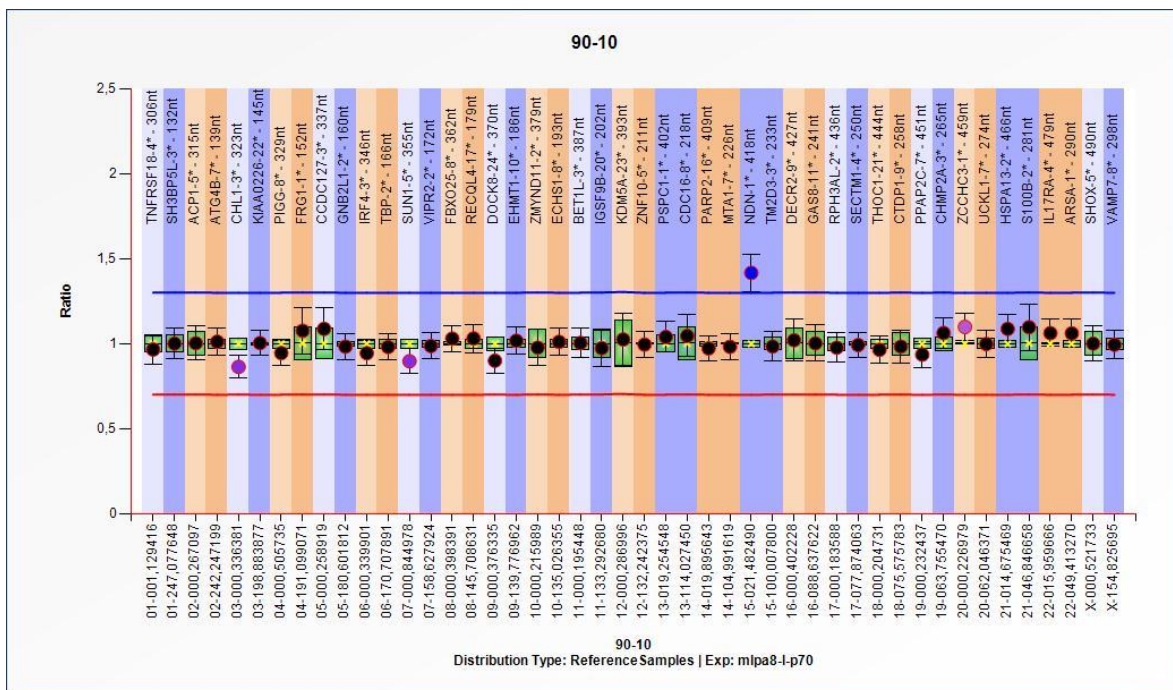
Slika 16. Elektroferogram uzorka 4 (24-14) u kojemu je utvrđena mikroduplikacija primjenom MLPA probe P036



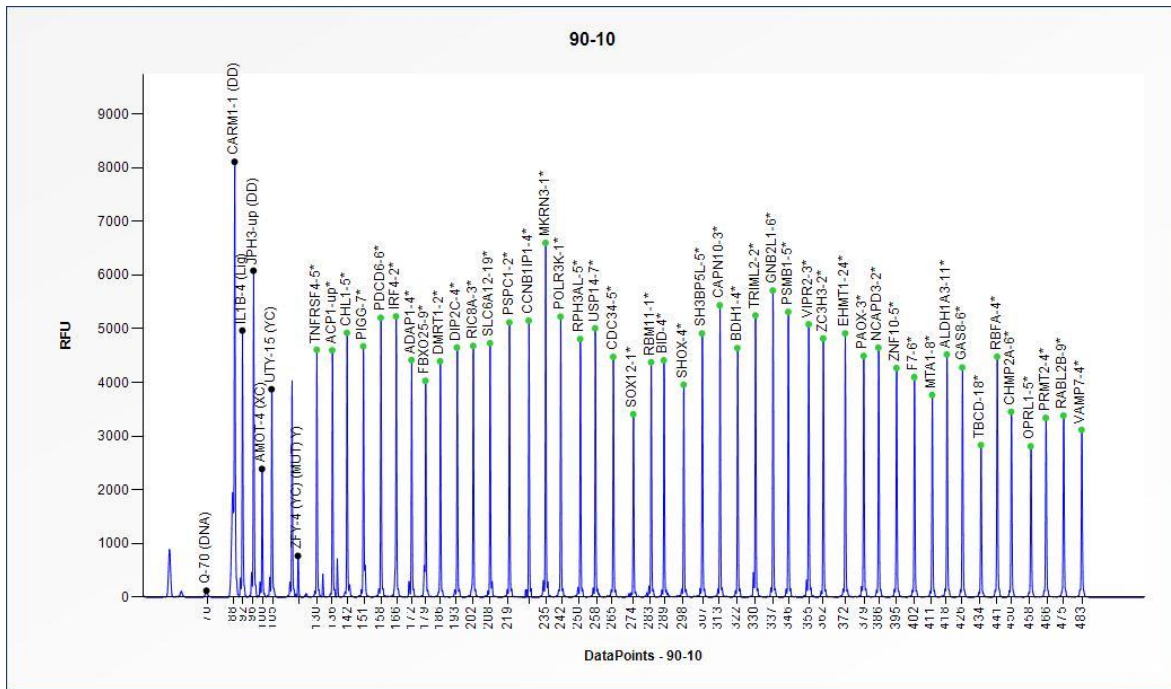
## Primjer 6: Ispitanik 5 (90-10) – mikroduplikacija (15q11.2)

Ispitanik 5 je dječak kojemu je na osnovi uputne dijagnoze lake mentalne retardacije i sumnje na miopatiju, napravljena standardna kariotipizacija. Rezultati standardne citogenetičke analize pokazali su uredan nalaz pa je pacijentu, s obzirom na kliničku sliku karakterističnu za MR, napravljena MLPA analiza subtelnornih regija. Pozitivan rezultat dobiven je korištenjem obje MLPA probe (P036 i P070).

Probama je dijagnosticirana mikroduplikacija na 15. kromosomu.



Slika 17. Grafički prikaz uzorka 5 (90-10) u kojemu je utvrđena mikroduplikacija primjenom MLPA probe P070



Slika 18. Elektroferogram uzorka 5 (90-10) u kojemu je utvrđena mikroduplikacija primjenom MLPA probe P070

## 6. RASPRAVA

U ovome je istraživanju obrađeno 50 uzoraka pacijenata s različitim poremećajima čiji simptomi odgovaraju mentalnoj retardaciji (MR) / razvojnom zaostajanju (RZ). Pacijenti su dobi od 3 do 18 godina, a upućeni su s Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Analizom subtelomernih regija svih kromosoma (akrocentričnim kromosomima analizirane su centromerne regije q kraka) MLPA metodom pozitivan je rezultat ustanovljen kod 5 pacijenata (10 %), odnosno kod 2 djevojčice i 3 dječaka.

Analizirani uzorci periferne krvi uzorkovani su na minimalno invazivan način te obrađeni prema protokolu za obradu pacijenata sa sumnjom na MR. Inicijalnim testiranjem, standardnom kariotipizacijom i molekularno-genetičkim testiranjem na fragilni X sindrom, nisu dokazane promjene u skladu s fenotipskim karakteristikama pacijenata. Sljedeći je korak bila MLPA analiza subtelomernih regija svih kromosoma, prema pretpostavci da su subtelomerne regije bogate genima podložnim promjenama pri replikaciji. Rezultati su pokazali promjene nastale na 15. (ispitanik 5), 19. (ispitanici 2 i 3), 21. (ispitanik 4) te X kromosomu (ispitanik 1).

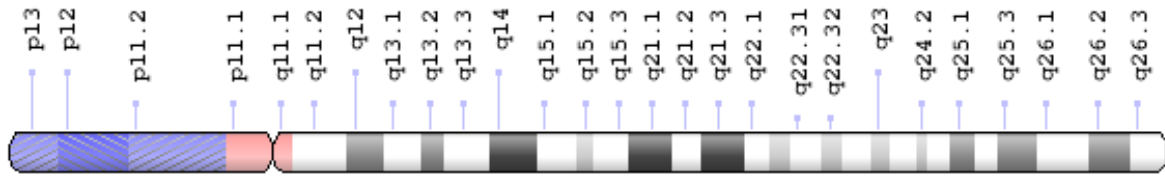
Metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (MLPA) tehnika je koja se temelji na ligaciji i PCR amplifikaciji odgovarajućih proba, a omogućava višestruku kvantifikaciju do 50 različitih sekvenci upotrebom jednog para proba. Koristi se za detekciju heterozigotnih delecija ili duplikacija usporedbom jačine signala amplificiranih proba uzoraka pacijenata s referentnim uzorcima DNA (7).

Metoda se pokazala korisnom za analizu pacijenata s idiopatskom MR / RZ. Ovim su istraživanjem dokazane klinički značajne promjene kod 10 % pacijenata, što premašuje očekivani postotak. Većina je istraživanja prikazala 3 – 5 % klinički značajnih rezultata dokazanih navedenom metodom (7, 8).

Ispitaniku 5 učinjenim je testiranjem dokazana promjena (mikroduplikacija) na 15. kromosomu regije q11.2, a uputna dijagnoza pacijenta bila je laka mentalna retardacija te sumnja na miopatiju. Navedenu aberaciju možemo povezati s 15q mikroduplikacijskim sindromom koji zahvaća regije 15q11.2-13.1, a čija je klinička slika visoko varijabilna jer obuhvaća niz poremećaja (razvojni poremećaji, karakteristične crte lica, različiti zdravstveni problemi). Osim što utvrđena aberacija lokacijski odgovara simptomu, odgovarajuća je i navedena klinička slika pacijenta (22). Sindrom je majčinskog podrijetla, a može se uočiti u vrlo ranom djetinjstvu kao razvojno zaostajanje, posebice jer se očituje poremećajima u govoru,

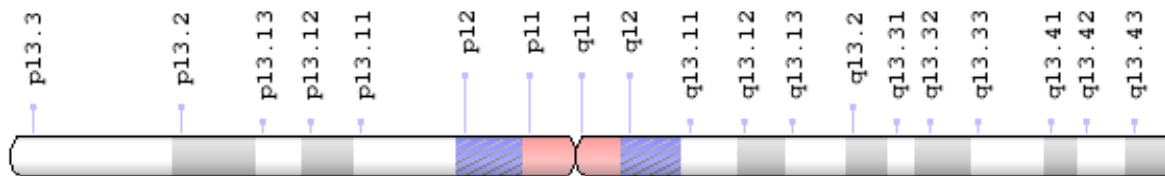


hipotoniji, poremećajima ponašanja koje nerijetko možemo poistovjetiti s autizmom te dismorfičnim karakteristikama (23).



Slika 19. Idiogram 15. kromosoma. Prema proizvođaču (MRC – Holland) za akrocentrične kromosome testirane su regije uz centromeru na q kraku kromosoma

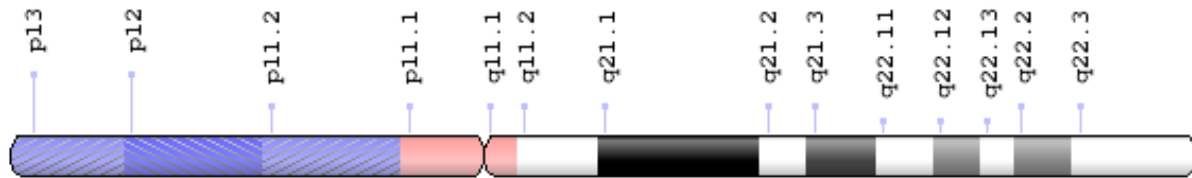
Ispitanicima 2 i 3 MLPA analizom dokazana je promjena na 19. kromosomu iste regije (q13.43), koja se nalazi u subtelomernom području. Dokazana je pretpostavka o subtelomernoj regiji kao regiji podložnoj genetičkim promjenama. Simptomi pacijenata (pacijent 2 – epilepsija, pacijent 3 – paroksizmalno promijenjen EEG) upućuju na povezanost navedene kromosomske regije s kroničnim neurološkim poremećajima. Znanstvenici iz Laboratorija za neurogenetiku, Odjela za neuroznanost u Italiji (Genova) jednaku su mikroduplikaciju utvrdili kod pacijenta s epilepsijom u svom istraživanju (24).



Slika 20. Idiogram 19. kromosoma

Ispitaniku 4 analizom je utvrđena promjena (mikroduplikacija) na 21. kromosomu na položaju q22.3, odnosno regiji u blizini Down-sindrom regije na kojoj promjene uzrokuju većinu fenotipskih karakteristika Down-sindroma. MLPA nalaz je u skladu s kliničkom slikom

pacijenta – usporen razvoj. Jednaka je duplikacija opisana i pri istraživanju pacijenata s Down-sindromom provedenog u Pekingu (25).



Slika 21. Idiogram 21. kromosoma.

Jednoj je ispitanici (ispitanik 1) analizom utvrđena delecija na oba kraka X kromosoma (p22PAR i q28). Obje su delecije smještene uz telomere, a simptomi pacijentice (teško psihomotorno zaostajanje, dismorfija fenotipa koja odgovara Turnerovom sindromu) odgovaraju pronađenim promjenama.

Ovo istraživanje pokazalo je pouzdanost MLPA metode u detekciji subtelomernih promjena. Prednosti MLPA tehnike su komercijalna dostupnost reagensa, mogućnost paralelnog testiranja velikog broja uzoraka na više od 40 genskih lokusa u kratkom vremenu, jednostavnost softvera za obradu podataka dobivenih kapilarnom elektroforezom te brzina izvođenja testa, što sve ide u prilog primjeni MLPA kao brzog metodi probira kod pacijenata s dijagnozom razvojnog zaostajanja. MLPA tehnika ima i ograničenja. Prema opisu proizvođača reagensa (MRC – Holland) za analizu je potrebno 20 ng uzorka DNA, no istraživanje je pokazalo da rezultati s navedenom količinom uzorka nisu bili u potpunosti reproducibilni. Kada je analiza ponovljena za iste pacijente s izolatima DNA količine 100 – 200 ng, pokazali su veću reproducibilnost.

Također, istraživanje je pokazalo da je MLPA metoda osjetljivija na kontaminaciju i kvalitetu DNA od konvencionalne PCR reakcije.

Iz navedenoga se može zaključiti da je korištenje MLPA metode tehnički zahtjevnije od očekivanoga, no opisana ograničenja ne predstavljaju poteškoće nego ukazuju na činjenicu da se sofisticiranoj metodi, kao što je navedena, treba pristupiti na jednako sofisticiran način – prethodne je korake, kao što je izolacija DNA, također važno dobro izvesti i pristupiti im s jednakom, čak i većom pažnjom. Ukratko, istraživanje je potvrdilo davno poznato pravilo o

poštivanju dobre laboratorijske prakse i pravilnom pristupu uzorcima u genetičkom laboratoriju.

Treba naglasiti da je suradnja između laboratorijskog i kliničkog genetičara iznimno važna i bez nje nije moguća točna genetička dijagnoza pacijenta.

S obzirom na to da je MLPA u ovome istraživanju testirana kao metoda probira, dobivene je rezultate potrebno potvrditi nekom od specifičnijih molekularno-genetičkih tehnika kao što su FISH ili aCGH (kromosomska analiza na mikropostroju).

## 7. ZAKLJUČAK

Istraživanjem su utvrđeni sljedeći zaključci:

- MLPA metodom je kod 10 % pacijenata utvrđena kromosomska aberacija koja odgovara kliničkim simptomima pacijenata, a nije uspješno dokazana konvencionalnim metodama korištenim u citogenetici
- Prevalencija detektiranih kromosomskih aberacija smatra se značajnom kada je uspoređena s ostalim parametrima koje mora zadovoljiti metoda probira (cijena, brzina izvođenja testa, točnost i preciznost)
- MLPA metoda pokazala se učinkovitom metodom probira kod pacijenata s MR / RZ-om zbog svoje učinkovitosti (istovremena kvantifikacija do 50 sekvenci u jednom uzorku), prihvatljive cijene, dostupnosti i jednostavnosti korištenja softvera za obradu dobivenih podataka
- Rezultati dobiveni upotrebom početne koncentracije DNA od ~ 20 ng, prema uputi proizvođača reagensa (MRC Holland) nisu bili reproducibilni, rezultati dobiveni ponovljenom analizom s početnom koncentracijom DNA od 150 do 200 ng pokazali su se reproducibilnima.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ciljevi ovoga istraživanja bili su otkrivanje novih genetičkih uzroka intelektualnog zaostajanja MLPA metodom, utvrđivanje prevalencije kromosomskih aberacija detektiranih tehnikom molekularne citogenetike (MLPA) te procjena navedene tehnike kao metode probira u evaluaciji klinički značajnih i novodefiniranih varijacija u broju kopija DNA povezanih s intelektualnim zaostajanjem.

**Nacrt studije:** Retrospektivno istraživanje kromosomskih promjena u subtelomernim regijama kod pacijenata s intelektualnim zaostajanjem.

**Ispitanici i metode:** Ispitanici u ovoj studiji su djeca, njih 50 (10 djevojčica i 40 dječaka), upućena s Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek zbog kliničke slike koja upućuje na mentalnu retardaciju / razvojno zaostajanje. Pacijentima je napravljeno inicijalno genetičko testiranje koje obuhvaća kariotipizaciju i molekularno-genetičku analizu za fragilni X sindrom. Kod svih je pacijenata dobiven uredan nalaz inicijalnim testiranjem te je rađena analiza MLPA metodom upotrebom proba za detekciju subtelomernih promjena (P036 i P070).

**Rezultati:** Analizom su dokazane promjene kod 5 ispitanika (2 djevojčice i 3 dječaka), odnosno kod 10 % ispitanika. Promjene su primijećene na kromosomima 15, 19, 21 i X te su u skladu s kliničkom slikom pacijenata.

**Zaključak:** MLPA metoda pokazala se odličnom metodom probira za pacijente s intelektualnim zaostajanjem. Utvrđena prevalencija kromosomskih aberacija detektiranih navedenom tehnikom veća je od očekivane i čini 10 %. Jedini je nedostatak metode primijećen u ovom istraživanju nemogućnost dobivanja reproducibilnih rezultata koncentracijom DNA koju preporučuje proizvođač (MRC – Holland). Prikazani rezultati rađeni su s početnom koncentracijom DNA 150 - 200 ng.

**KLJUČNE RIJEČI:** MLPA, mentalna retardacija, subtelomerne aberacije

## 9. SUMMARY

**Objectives:** The objectives of this study were to discover new genetic causes of intellectual disability using MLPA method, to determine the prevalence of chromosomal aberrations detected using molecular cytogenetic technique (MLPA) and the assessment of this technique as a screening method in the evaluation of clinically relevant and newly discovered variations in the number of copies of DNA associated with the intellectual disability.

**Study Design:** Retrospective study of chromosomal changes in subtelomeric regions in patients with intellectual disabilities.

**Participants and methods:** 50 children (10 girls and 40 boys), evaluated at the Clinic of Pediatrics, University Hospital Center Osijek and referred for mental retardation/developmental delay, participated in the study. Initial genetic testing that included karyotyping and molecular-genetic analysis for fragile X syndrome was performed. Since all patients had normal results of initial testing, MLPA testing using probes for the detection of subtelomeric changes (P036 and P070) was performed.

**Results:** The study has shown pathological CNV changes in 5 patients (2 girls and 3 boys) or 10%. The changes were observed on chromosomes 15, 19, 21 and X, and are in accordance with clinical features of patients.

**Conclusion:** The study has shown that MLPA method is optimal screening method for patients with intellectual disability. The prevalence of chromosomal aberrations detected using this technique is higher than expected (10%). The only disadvantage found in this study was the inability to obtain reproducible results using concentration of initial DNA recommended by the manufacturer (MRC – Holland). The presented results were obtained with initial concentration of 150 – 200 ng DNA.

**KEY WORDS:** MLPA, mental retardation, subtelomeric aberrations

## 10. 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. Bickmore WA. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *Encyclopedia of Life Sciences.* Online edition. Nature Publishing Group; 2001.
3. Chen X, Li H, Mao Y, et al. Subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification as a supplement for rapid prenatal detection of fetal chromosomal aberrations. *Mol Cytogenet.* 2014;7:96.
4. Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet.* 2011;54:425-32.
5. Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics.* 2006;117:2304-16.
6. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord.* 2010;2:182-209.
7. Damnjanovic T, Cuturilo G, Maksimovic N, et al. Subtelomeric screening in Serbian children with dysmorphic features and unexplained developmental delay/intellectual disabilities. *Turk J Pediatr.* 2015;57:154-60.
8. Kon M, Fukami M. Submicroscopic copy-number variations associated with 46,XY disorders of sex development. *Mol Cell Pediatr.* 2015;2:7.
9. Stupia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13:3245-76.
10. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res.* 2002;504:17-36.
11. Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene.* 2001;20:5572-9.
12. Devriendt K, Vermeesch JR. Chromosomal phenotypes and submicroscopic abnormalities. *Hum Genomics.* 2004;1:126-33.

13. Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014;15:215-44.
14. Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, et al. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem.* 2012;60:346-58.
15. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, 10. revizija (MKB – 10). 2.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
16. Wehmeyer ML. Defining Mental Retardation and Ensuring Acces to the General Curriculum. *Education and Training in Developmental Disabilities.* 2003;38:271-282.
17. Salvador-Carulla L, Reed GM, Vaez-azizi LM, Cooper SA, Martinez Leal R, Bertelli M et al. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability" in ICD-11. *World Psychiatry.* 2011;10:175-80.
18. Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics.* 2006;117:2304-16.
19. De vries BB, Winter R, Schinzel A, Van ravenswaaij-arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet.* 2003;40:385-98.
20. O'Connor, C.: Telomeres of human chromosomes. *Nature Education* 2008; 1:166
21. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol.* 2012;41:1561-9.
22. National Organisation for Rare Disorders, Dup15q. Dostupno na adresi: <http://www.dup15q.org>. Datum pristupa: 16.10.2016.
23. Orphanet. Dostpno na adresi: <http://www.orpha.net>. Datum prisutpa: 16.10.2016.
24. Striano P, Coppola A, Paravidino R, Malacarne M, Gimelli S, Robbiano A, et al. Clinical significance of rare copy number variations in epilepsy: a case-control survey using microarray-based comparative genomic hybridization. *Arch Neurol.* 2012;69:322-30.
25. Qi Q, Zhou X, Jiang Y, Hao N, Zhou J, Zhang L. A rare de novo duplication of chromosome 21q22.12 → q22.3 with other concomitant deletion and duplication of small fragments in 21q associated with Down syndrome: Prenatal diagnosis, molecular cytogenetic characterization. *Molecular Cytogenetics. Online edition.* 2013;6:1



# 11. ŽIVOTOPIS

## Mirna Anđelić

Datum i mjesto rođenja:

- 16. siječnja 1993., Osijek

Obrazovanje:

- 2014. – do danas: Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2011. – 2014.: Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu
- 2007. – 2011.: Opća gimnazija A. G. Matoša, Đakovo

Dodatna edukacija:

- 2007. – 2011.: DSD program naprednog učenja njemačkog jezika, Gimnazija A. G. Matoša, Đakovo

Radno iskustvo:

- Travanj 2016. – srpanj 2016.: Klinički institut za medicinsku genetiku, Klinički medicinski centar Sveučilišta u Ljubljani
- Ožujak 2015. – travanj 2016.: MBL Bojčić, Vlanić, Dom zdravlja Osijek, stručno osposobljavanje za prvostupnicu medicinsko laboratorijske dijagnostike

Članstvo u profesionalnim udrugama:

- Rujan 2015. – do danas: predsjednica CMLDSA, Hrvatska udruga studenata MLD
- Travanj 2016. – do danas: član HKZR – razred MLD

Kongresni sažetci:

- HLA Class II Allele Association with Juvenile Idiopathic Arthritis in Eastern Croatia.; S. Marzi, M. Anđelić, Lj. Glavaš - Obrovac, N. Turjak, S. Tokić; Treći kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Lipanj 2. - 5. 2016; Opatija, Hrvatska, Knjiga sažetaka