

# Molekularna citogenetika nekih neurorazvojnih poremećaja

---

Rinčić, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2014

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:126796>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Rinčić, Martina (2014) *Molekularna citogenetika nekih neurorazvojnih poremećaja*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2177>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Martina Rinčić**

**Molekularna citogenetika nekih  
neurorazvojnih poremećaja**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2014.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Martina Rinčić**

**Molekularna citogenetika nekih  
neurorazvojnih poremećaja**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2014.**

Disertacija je izrađena u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s Laboratorijem za molekularnu citogenetiku, Instituta za humanu genetiku, Friedrich-Schiller Sveučilišta u Jeni (voditelj PD Dr. rer. nat. / med. habil. Thomas Liehr)

Voditelj rada: prof. dr. sc. Lukrecija Brečević

Mojoj obitelji, jer ona je sve.

1. Uvod.....	1
1.1. Neurorazvojni poremećaji.....	1
1.1.1. Razvojni intelektualni poremećaj.....	2
1.1.2. Poremećaji autističnog spektra.....	3
1.2. Genetska osnova Razvojnog intelektualnog poremećaja i Poremećaja autističnog spektra.....	5
1.2.1. Velike kromosomske aberacije.....	7
1.2.2. Mikrodelecije i mikroduplikacije.....	8
1.2.3. Promjene u pojedinim genima – monogeniski poremećaji.....	10
1.2.4. X-vezani razvojni intelektualni poremećaj.....	11
1.2.5. Epigenetske promjene – deregulacija gena s imprintom.....	13
1.2.6. Promjene u broju kopija gena.....	14
1.2.6.1. Multiplex ligation dependent probe amplification – MLPA.....	15
1.2.6.2. Biočipovi – Array komparativna genomska hibridizacija.....	17
1.3. Novi mikrodelecijski i mikroduplikacijski sindromi.....	19
1.4. Dijagnostički postupak evaluacije pacijenta s RIP-om i ASD-om.....	20
2. Hipoteza.....	22
3. Ciljevi rada.....	22
4. Materijali i metode.....	23
4.1. Ispitanici.....	23
4.2. Citogenetska analiza kromosoma.....	23
4.2.1. Kratkotrajna kultura stanica periferne krvi.....	23
4.2.2. Priprema preparata za G-pruganje.....	24
4.2.3. Metoda G-pruganja kromosoma i analiza citogenetskih preparata.....	24
4.3. Izolacija genomske DNA.....	26
4.3.1. Provjera čistoće i koncentracije izolirane DNA.....	26
4.3.2. Provjera kvalitete DNA u agaroznom gelu.....	27
4.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.....	27
4.4.1. MLPA za detekciju promjena broja kopija.....	28
4.4.2. Metilacijsko specifični MLPA – MS-MLPA.....	28
4.4.3. Detekcija MLPA proba.....	29
4.4.4. Analiza MLPA podataka.....	30
4.4.4.1. Analiza broja kopija – MLPA.....	31
4.4.4.2. Metilacijsko profiliranje – MS-MLPA.....	32
4.5. Setovi MLPA i MS-MLPA proba.....	36
4.6. Fluorescentna in situ hibridizacija.....	38
4.7. Sekvenciranje.....	39
4.8. Array komparativna genomska hibridizacija.....	40
5. Rezultati.....	44
5.1. Analiza kromosoma GTG prugama.....	50
5.1.1. Aberacije detektirane GTG prugama kod ispitanika s dijagnozom RIP-a.....	50
5.1.2. Aberacije detektirane GTG prugama kod ispitanika s dijagnozom ASD-a.....	74
5.2. Aberacije detektirane MLPA analizom.....	80
5.2.1. Aberacije detektirane MLPA analizom ispitanika s dijagnozom RIP i urednim nalazom GTG analize.....	80

5.2.2. Aberacije detektirane MLPA analizom ispitanika s dijagnozom ASD i urednim nalazom GTG analize.....	106
5.2.3. MLPA analiza ispitanika s aberacijama utvrđenim GTG analizom.....	106
5.3. Aberacije detektirane aCGH analizom.....	107
5.3.1. Aberacije detektirane aCGH analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP uz uredan nalaz GTG, MLPA i FISH analiza.....	107
5.3.2. Aberacije detektirane aCGH analizom kod ispitanika s dijagnozom ASD uz uredan nalaz GTG, MLPA i FISH analiza.....	118
5.3.2. Kandidat geni detektirani aCGH analizom.....	124
6. Rasprava.....	127
7. Zaključak.....	137
7. Sažetak.....	139
8. Summary.....	141
10. Popis literature.....	143
11. Životopis.....	152

## 1. Uvod

*„A lot can go wrong in the development of the human brain.“  
Mitchell KJ, Curr Opin Neurobiol 2010;21:1-7.*

Misterij razvoja živčanog sustava, te njegovo funkcioniranje kasnije tijekom života oduvijek su intrigirali znanstvenike. Osnovnu mapu razvoja ljudskog tijela pa tako i neurorazvoja svakog pojedinca čini genetski zapis koji je pohranjen unutar svake stanice u obliku genoma koji je građen od sljedova nukleotidnih parova baza „složenih“ u molekulu DNA (deoksiribonukleinska kiselina). Istraživanjem sekvence humanog genoma utvrđeno je da samo oko 3% humanog genoma (20-25 000 gena) ima ulogu kodiranja informacija za proteine procesima transkripcije (prepisivanjem u glasničku RNA) i translacijom (prevođenjem u proteine), dok se za ostalih 97% smatralo da je većinom nekodirajuća DNA. Analizom je transkriptoma (cjelokupna RNA) međutim utvrđeno da je više od 85% genoma čovjeka transkripcijski aktivno (1-2). Kondenzirane DNA molekule organizirane u kromatinske niti predstavljaju kromosome kojih čovjek ima 46 (23 para – 22 para autosoma i jedan par spolnih kromosoma).

Tijekom embriogeneze središnji živčani sustav složenim progresivnim i reorganizacijskim histogenetskim procesima dinamički se mijenja. Tako mozak tijekom prenatalnog razvoja i u prvim godinama života nekoliko puta promijeni strukturno-funkcionalno ustrojstvo procesom razvojne reorganizacije. Svaka, pa i najmanja, promjena ili odstupanje od genetske osnove za normalan neurorazvoj može dovesti do poremećaja te u konačnici imati širok spektar posljedica koje se mjere od male promjene u morfologiji i funkcioniranju živčanog sustava pa do potpunog gubitka različitih funkcija (3-5). Činjenica da su donedavno tehnike istraživanja bile ograničavajući faktor u otkrivanju tajni razvoja, regulacije te funkcioniranja živčanog sustava čovjeka ostavlja još mnoga neodgovorena pitanja. Napredak u razvoju tehnika molekularne genetike omogućio je bolji uvid u ulogu gena u regulaciji neurorazvoja i njegove organizacije, te uvid u njihovu ekspresiju na kognitivnoj razini.

### 1.1 Neurorazvojni poremećaji

Oštećenja koja nastaju tijekom razvoja živčanog sustava, a kao posljedicu imaju narušeno napredovanje u jednoj ili više razvojnih domena (tjelesna, kognitivna/spoznajna, socijalna i emocionalna) dovodi do nastanka neurorazvojnih poremećaja. Tako možemo reći da neurorazvojni poremećaji obuhvaćaju veliku grupu, klinički heterogenih, kroničnih poremećaja koje karakterizira oštećenje razvoja središnjeg živčanog sustava (7). Oboljenja se



smatraju neurorazvojnima ako se očituju u dojenačkoj dobi, djetinjstvu ili ranoj adolescenciji. Zbog kompleksnosti i etiološke heterogenosti poremećaji koji se ubrajaju u neurorazvojna oboljenja često su se dijagnosticirali, ne na temelju objektivnih laboratorijskih testova, nego na temelju zapaženih kliničkih simptoma. Današnja medicina u klasifikaciji oboljenja koristi dva priznata dijagnostička sustava: Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje (DSM) Američke psihijatrijske udruge i Međunarodnu klasifikaciju bolesti i srodnih zdravstvenih problema (MKB) Svjetske zdravstvene organizacije (6-7). Prema DSM-IV verziji poglavlje „Poremećaji koji se obično prvi put dijagnosticiraju u dojenačkoj dobi, djetinjstvu ili adolescenciji“ obuhvaća između ostalog Mentalnu retardaciju i Pervazivne razvojne poremećaje. MKB-10 sustav utvrđen 1990. godine izrazito je višeslojan i raščlanjen. Tako se unutar kategorije Psihički poremećaji i poremećaji ponašanja koja uključuje poremećaje psihološkog razvoja nalaze brojne grupe. Unutar grupe Poremećaji psihološkog razvoja nalaze se Pervazivni razvojni poremećaji, dok se grupa Mentalna retardacija nalazi zasebno.

Iako se termin neurorazvojna oboljenja u službene medicinske klasifikacije uvodi tek nedavno s petim izdanjem DSM-a 2013. godine, u stručnoj literaturi pojam se već dugi niz godina koristi za grupu poremećaja kojima je zajedničko teško oštećenje kognitivnog razvoja u ranoj dječjoj dobi i adolescenciji.

### **1.1.1 Razvojni intelektualni poremećaj**

Prilikom procijene neurorazvojnog statusa djeteta, u slučajevima kada postoje, vrlo brzo mogu se uočiti odstupanja u općem intelektualnom i adaptivnom funkcioniranju. Opće intelektualno funkcioniranje definirano je kvocijentom inteligencije (IQ) koji se mjeri standardiziranim, individualno primjenjivim testovima inteligencije. IQ od 70 i niže danas se smatra ispodprosječnim intelektualnim funkcioniranjem. Adaptivno funkcioniranje je širok pojam koji obuhvaća vještine svakodnevnog života kao što su komunikacija, briga o samom sebi, život kod kuće, socijalne vještine, upotreba zajedničkih sredstava, funkcionalne akademske vještine, rad, slobodno vrijeme, zdravlje i sigurnost.

Razvojni intelektualni poremećaj (RIP; engl. Intellectual Disability/ID) je novi naziv za mentalnu retardaciju, a definira se prema DSM i MKB kao ispodprosječno intelektualno funkcioniranje uz značajna ograničenje u najmanje dvije vještine svakodnevnog života. Prema DSM klasifikaciji ograničenja moraju biti prisutna prije 18. godine života. Obzirom da se intelektualno funkcioniranje teško može pouzdano procijeniti prije 5. godine života, a ono je jedan od ključnih kriterija u dijagnosticiranju RIP-a, kod djece mlađe od 5 godina koristi se termin zaostajanje u razvoju (engl. Developmental delay/DD) (8). Prema razini intelektualnog funkcioniranja RIP dijelimo na: blagi (IQ 50 – 55 do približno 70), umjereni (35-40 do 50-55), teški (20-25 do 35-40), duboki (ispod 20 ili 25), te RIP neodređene težine (IQ je nemoguće izmjeriti).

Kombinacija kliničkih obilježja, kao što je RIP, kongenitalne anomalije i dizmorfije, mogu upućivati na specifične sindrome, koji se mogu definirati kroz skup specifičnih prepoznatljivih razvojnih anomalija odnosno simptoma. Na temelju kliničkih nalaza popratnih simptoma, RIP dijelimo na sindromski i nesindromski. U slučajevima kada su uz niži IQ prisutna specifična dizmorfična fenotipska obilježja, kongenitalne anomalije te specifični obrasci ponašanja govorimo o sindromskom obliku RIP-a. Kod težih oblika RIP-a (posebice teških i dubokih) općenito je veća vjerojatnost postojanja neuroloških, neuromišićnih, kardiovaskularnih te oštećenja vida i sluha. U pravilu, nesindromski RIP definiran je nižim IQ rezultatom bez prisutnosti specifičnih kliničkih simptoma. Međutim, isključivanje postojanja suptilnih dizmorfija predstavlja izazov jer zbog prisutnog kognitivnog oštećenja one mogu biti nejasne i teško vidljive. Simptomi nekih sindroma mogu također biti toliko suptilni da ih je iznimno teško dijagnosticirati, osim ako ih se ne promatra specifično u kontekstu poznatih genetskih poremećaja (9).

Postavljanje diferencijalne dijagnoze ključno je za razumijevanje bolesti, a uključuje povezivanje fenotipskih karakteristika s kognitivno-bihevioralnim fenotipom. Prema istraživanjima u oko 40% osoba s RIP-om mogu se uočiti neke karakteristike autističnog ponašanja (prisutnost restriktivnih, repetitivnih i stereotipnih modela ponašanja, interesa i aktivnosti) (10).

U literaturi postoje različite prevalencije RIP-a, ali ipak prema najvećem broju istraživanja procjenjuje se da RIP zahvaća 1-3% opće populacije (11). Velike varijacije u procjenama proizlaze iz primjene različitih dijagnostičkih kriterija, razlikama u klasifikaciji težine oštećenja, te odabira uzorka na temelju kojih se vrši procjena (12). Prevalencija RIP-a je veća kod dječaka nego kod djevojčica u dobi do 12-15 godina (1,7:1 – dječaci:djevojčice), međutim razlike u prevalenciji u odnosu na spol nisu zabilježene među ispitanicima u dobi od 40 godina i više (13). Laki/blagi oblik RIP-a javlja se 7-10 puta češće od težih stupnjeva, te se procjenjuje da obuhvaća 80-85% svih osoba s RIP-om (14 – 15).

### **1.1.2. Poremećaji autističnog spektra**

Pervazivni razvojni poremećaji, poremećaji rane dječje dobi, karakterizirani su teškim deficitom i trajnim oštećenjima u području vještina recipročne socijalne interakcije, komunikacije, te postojanja ograničenih, stereotipnih obrazaca ponašanja, interesa i aktivnosti.

U tablici 1. prikazana je klasifikacija pervazivnih razvojnih poremećaja prema DSM-IV i MKB-10 dijagnostičkim sustavima.

Tablica 1. Klasifikacija pervazivnih razvojnih poremećaja prema DSM-IV i MKB-10.

Pervazivni razvojni poremećaji	
DSM-IV	MKB-10
Autistični poremećaj	Dječji autizam
Rettov poremećaj	Rettov sindrom
Dezintegrativni poremećaj u djetinjstvu	Drugi dezintegrativni poremećaj djetinjstva
Aspergerov poremećaj	Aspergerov sindrom
Pervazivni razvojni poremećaj, neodređen (uključujući atipičan autizam)	Atipičan autizam
	Drugi pervazivni poremećaji razvoja
	Pervazivni poremećaj razvoja, neoznačen
	Poremećaj hiperaktivnosti povezan s mentalnom retardacijom i stereotipnim pokretima

Zbog kompleksnosti oštećenja i disfunkcija koje se pojavljuju u ovoj skupini, već se osamdesetih godina u praksi i literaturi uvodi pojam autistični spektar, a obuhvaća niz psihijatrijskih poremećaja rane dječje dobi obilježenih velikim odstupanjima u socijalnim interakcijama, socijalnoj komunikaciji i imaginaciji te motoričkim vještinama koje se očituju u stereotipijama (16). U literaturi se najčešće koristi termin poremećaji autističnog spektra (engl. Autism Spectrum Disorders – ASD) koji je zapravo sinonim za autistični spektar te predstavlja prototip za pervazivne razvojne poremećaje koji uključuje Autizam, Pervazivni razvojni poremećaj, neodređen i Aspergerov poremećaj.

Bitna obilježja ASD-a su:

- 1) izrazito poremećen ili oštećen razvoj socijalnih interakcija i socijalnih komunikacija (oštećenja recipročnih socijalnih interakcija, neverbalne komunikacije i nemogućnost razvoja, zadržavanja i razumijevanja odnosa s vršnjacima);
- 2) prisutnost restriktivnih, repetitivnih i stereotipnih modela ponašanja, interesa i aktivnosti;
- 3) simptomi zakašnjelog ili poremećenog funkcioniranja moraju biti prisutni u ranom razvoju (iako se ne moraju u potpuno manifestirati u dječjoj dobi);

4) ograničenja uzrokuju klinički značajno odstupanje u društvenim, profesionalnim ili drugim svakodnevnim aktivnostima;

5) oštećenja se ne mogu bolje klasificirati kategorijom RIP-a. Težina ASD-a procjenjuje se na temelju stupnja oštećenja društvenih komunikacijskih vještina i postojanju različitih obrazaca repetitivnog ponašanja (17).

Iako veliki dio djece s ASD-om nema dizmorfična fenotipska obilježja niti druge medicinske probleme koji su povezani s prepoznatljivim genetskim ili genomskim sindromima, ASD može biti dio (i) genetskih i genomskih sindroma RIP-a koji imaju specifične kliničke simptome, te (ii) genetskih i genomskih sindroma RIP-a čija je klinička slika tijekom djetinjstva nejasna (18).

Različito tumačenje i širenje dijagnostičkih kriterija te promjene unutar klasifikacijskih sustava rezultirali su porastom u procjeni prevalencije ASD-a koja iznosi 62/10000, a javlja se 4 puta češće kod dječaka u odnosu na djevojčice (19-21).

Kako dijagnostički kriterij, MKB i DSM, nemaju postavljenu određenu razinu intelektualnog funkcioniranja kao kriterij dijagnosticiranja ASD-a, tako procjena intelektualnog statusa djeteta nije potrebna za postavljanje dijagnoze. Prvobitna zapažanja o visokom intelektualnom funkcioniranju temeljena su na malom broju djece sa dijagnozom Autizma, te se osamdesetih godina prošlog stoljeća u sve većem broju studija opisuje veća zastupljenost intelektualnog oštećenja kod djece s dijagnozom ASD-a (22-23). Takvi nalazi postavili su temelj za prihvaćanje činjenice da oko 70% djece s ASD-om ima ispodprosječno intelektualno funkcioniranje. Međutim, ti se rezultati sve više kritički sagledavaju, te se danas smatra da bi u mnogim slučajevima postavljanje „radne dijagnoze“ ili opis funkcija djeteta u različitim domenama bilo dostatno da se osigura potrebna intervencija (24).

Iako se ASD kao dijagnostička kategorija uvodi tek nedavno (2013. godine) s novim izdanjem DSM-V priručnika, u literaturi se već posljednjih dvadesetak godina termin ASD koristi za grupu perverzivnih razvojnih poremećaja koja uključuje Autistični poremećaj, Aspergerov poremećaj i Pervazivni razvojni poremećaj, neodređen (25-26).

## **1.2. Genetska osnova Razvojnog intelektualnog poremećaja i Poremećaja autističnog spektra**

Razvojni intelektualni poremećaj ima kompleksnu i heterogenu etiologiju koja može imati (i) genetsku, (ii) stečenu ili (iii) okolišnu podlogu. Stečeni i okolišni faktori mogu djelovati prenatalno, perinatalno te postnatalno, a među njima se nalaze izloženost infekcijama i teratogenima, traume te asfiksije. Genetska podloga može preko (i) kromosomskih aberacija koje rezultiraju disbalansom u broju kopija određenih gena ili

genomskih regija; (ii) epigenetskih promjena, deregulacije *imprinting* zapisa određenih gena ili genomskih regija; (iii) disfunkcije pojedinih gena ključnih za razvoj kognitivnih funkcija rezultirati poremećenom kognitivnom funkcijom. Ponekad postoji nekoliko različitih faktora koji mogu djelovati istovremeno. Etiološka dijagnoza u osoba s RIP-om identificira se u 40-60% slučajeva. Međutim etiologija blagog RIP-a koji se javlja 7-10 puta češće od umjerenog i teškog, poznata je tek u oko 24% slučajeva (27). Genetski faktori nalaze se u podlozi 30% svih slučajeva RIP-a, te predstavljaju više od 60% svih poznatih uzroka. Izrazito je teško dati procjenu o doprinosu pojedinih genetskih faktora u podlozi RIP-a jer studije variraju u parametrima kao što su kriterij selekcije osoba, različitosti u dijagnostičkim postupcima i evaluacije pacijenta, te tehničkim mogućnostima (odabir i dostupnost molekularno citogenetskih tehnika) (28). Najčešći genetski uzrok RIP-a su trisomije autosoma spojive s postnatalnim životom, te aneuploidije X kromosoma (29). Kromosomske aberacije najčešći su pojedinačni nalaz kod osoba s RIP-om te on kao takav predstavlja najvažniju indikaciju za analizu kromosoma.

Poremećaji autističnog spektra imaju izrazito heterogenu etiologiju koja obuhvaća genetske faktore, epigenetske modifikacije unutar genoma, te utjecaj okoline. Važnost genetskog doprinosa razvoju ASD-a postala je jasna početkom 1980tih godina kada su zabilježeni prvi slučajevi autističnog poremećaja kod osoba s kromosomskim poremećajima i rijetkim sindromima. Genetski faktori koji predstavljaju najveći dio poznate etiologije (10-20%) mogu biti različiti (od poznatih genetskih sindroma pa do promjena u pojedinim bazama DNA), međutim niti jedan od njih ne obuhvaća više od 1-2% svih slučajeva ASD-a (30). Smatra se da postoji znatno veća genetska osnova ASD-a, na što ukazuje i veliki rizik pojavljivanja ASD-a kod braće i sestara unutar zahvaćene obitelji. Učestalost pojavljivanja kod zahvaćenih braće i sestara raste na 2-8%, kod dvojajčanih (dizigotnih) blizanaca na 10%, a kod monozigotnih blizanaca na čak 92% (31-32). Unatoč ekstenzivnim istraživanjima etiologija u najvećem broju slučajeva (oko 80%) ostaje nepoznata. Danas se smatra da je ASD kompleksan multifaktorski poremećaj.

Zbog velike etiološke heterogenosti RIP-a i ASD-a, njihova se moguća zajednička genetska osnova teško može kvantificirati. Tome pridonosi i činjenica da se velik broj rijetkih genetskih varijanti nalazi i u podlozi RIP-a i ASD-a. Međutim, sve veći broj otkrivenih genetskih uzroka ASD-a koji uključuju mnoge genetske i genomске poremećaje sugeriraju da su genetske podloge ASD-a i RIP-a vrlo slične.

Od kada je sekvenca ljudskog genoma poznata, otkriven je zapanjujuće veliki broj genetskih poremećaja povezanih s RIP-om i ASD-om. Znanstvenoj zajednici dostupan je niz kataloga genskih poremećaja i osobina, u kojima je posebno naglašen molekularan odnos između genetske promjene i fenotipske ekspresije. U najvećem katalogu OMIM-u (engl. – Online Mendelian Inheritance in Man, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine) nalazi se ukupno 22 358 zapisa genetskih

fenotipova, od kojih 13% odgovara RIP-u (2 601\*) i ASD-u (264\*\*) što potvrđuje da je istraživanje genetske podloge izuzetno važno u etiologiji RIP-a i ASD-a.

*\*pretraga OMIM baze prema ključnim riječima: RIP (mental retardation, developmental delay, intellectual disability). \*\* pretraga OMIM baze prema ključnim riječima: ASD (autism, autism spectrum disorder, autistic disorder).*

### **1.2.1 Velike kromosomske aberacije**

Temelji humane citogenetike postavljeni su 1956. godine kada je utvrđeno da diploidna stanica čovjeka ima 46 kromosoma. Ubrzo su citogenetske studije pokazale da se višak ili manjak cijelih kromosoma nalazi u podlozi oboljenja. Tako su već 1959. godine otkrivene prve kromosomske aberacije u podlozi poznatih kliničkih sindroma, te je utvrđeno da je Down sindrom posljedica trisomije kromosoma 21. Iste je godine i nekoliko abnormalnosti spolnih kromosoma bilo povezano sa sindromima RIP-a (Turner sindrom i Klinefelter sindrom). Veliki slijedeći korak u istraživanju kromosoma i kromosomskih aberacija postignut je razvojem tehnika pruganja početkom 70-tih godina, koje su omogućile točnu i nedvosmislenu identifikaciju svakog pojedinog kromosoma čovjeka. Numeričke promjene u broju kromosoma, višak ili manjak kromosoma, predstavljaju odstupanje od normalnog diploidnog broja kromosoma, koje za posljedicu uvijek ima RIP i dizmorfičan fenotip.

Implementacija tehnika pruganja kromosoma i napredak na području kulture stanica 1970tih godina omogućili su identifikaciju i karakterizaciju kako numeričkih promjena tako i mikroskopski vidljivih strukturnih kromosomskih aberacija. Strukturne kromosomske aberacije nastaju kao posljedica promjene u strukturi kromosoma, a mogu nastati de novo ili biti naslijeđene od jednog od roditelja, „mirnog“ nositelja kromosomskog poremećaja. Strukturne promjene mogu obuhvaćati samo jedan kromosom (intrakromosomske), ili može doći do izmjene segmenata dva ili više kromosoma (interkromosomske). Promjena u strukturi kromosoma može biti balansirana i nebalansirana, ovisno o tome da li za posljedicu imaju promjenu u broju kopija DNA. Balansirane strukturne aberacije (inverzije i recipročne translokacije) ne uzrokuju promjene u broju kopija DNA, dok nebalansirane strukturne aberacije (nebalansirane translokacije, delecije, duplikacije, te marker kromosomi) za posljedicu uvijek imaju promjenu u broju kopija DNA unutar genoma.

Standardna analiza kromosoma zasniva se na analizi metafaznih i prometafaznih kromosoma obojenih bojom Giemsa (GTG engl – G-bands by Trypsin using Giemsa; G-pruganje). Ovako obojeni kromosomi pokazat će svjetlije i tamnije pruge ovisno o strukturi i raspodjeli kromatina. Tamno obojane regije kromosoma u pravilu sadrže heterokromatin koji je bogat adenin i timin bazama i sadrže relativno mali broj gena. Nasuprot tome, svjetlije obojane regije kromosoma u pravilu su područja manje kondenziranog kromatin koji sadrži guanin i

citozin baze, te je transkripcijski aktivniji. Svaki kromosom ima točno određen i specifičan uzorak pruga što omogućava usporedbu homolognih kromosoma. Rutinska citogenetska analiza metafaznih kromosoma G-pruganjem na rezoluciji od 400-500 pruga po haploidnom genomu omogućava detekciju strukturnih aberacija veličine  $\geq 5-10$  Mb. Dijagnostički potencijal G-pruganja na toj razini prema procjenama iznosi oko 5-10% kod osoba s RIP-om. Maksimalna rezolucija G-pruganja postiže se analizom prometafaznih kromosoma. Takav oblik pruganja predstavlja kariotipizaciju visoke rezolucije i omogućava detekciju preraspodjela kromosoma veličine  $\geq 3-5$  Mb (550-800 pruga/haploidnom genomu) koje se otkrivaju u sljedećih 3-4% osoba s RIP-om. Citogenetski vidljive kromosomske aberacije, prema danas dostupnim podacima, otkrivaju kod 6-7% slučajeva ASD-a, iako bi taj postotak mogao biti i znatno veći kod kliničke slike ASD-a udružene s dizmorfijama i nižim intelektualnim funkcioniranjem (33).

### **1.2.2. Mikrodelecije i mikroduplikacije**

Iako su tehnike pruganja kromosoma i danas standardne metode citogenetske analize, njihova rezolucija ovisi isključivo o dužini kromosoma i moći rezolucije svjetlosnog mikroskopa. Međutim, velik broj kliničkih fenotipova uzrokovan je kriptičnim kromosomskim preraspodjelama ili preraspodjelama koje su veličinom manje od 3 Mb, te ih je nemoguće pouzdano identificirati metodom G-pruganja. Strukturne kromosomske promjene veličinom manje od 5 Mb, a napose one  $\geq 3$  Mb predstavljaju submikroskopske aberacije; mikrodelecije u slučaju manjka/delecije DNA sekvenci i mikroduplikacije u slučaju viška/duplikacije DNA sekvenci.

Razvoj tehnika fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) započeo je krajem 1980tih, da bi punu kliničku i znanstvenu primjenu u identifikaciji i preciznoj karakterizaciji suptilnih i submikroskopskih kromosomskih preraspodjela u podlozi RIP-a i ASD-a FISH tehnologija dosegla posljednjih dvadeset godina. Razvojem FISH tehnika započela je era molekularne citogenetike koja je enormno povećala moć rezolucije istraživanja kromosoma.

Osnovni princip FISH tehnike je da se ciljana sekvenca DNA (FISH proba) fluorescentno obilježi te hibridizira na preparate na kojima se nalaze kromosomi ili interfazne jezgre test uzorka/pacijenta. Sami preparati prije hibridizacije prolaze proces umjetnog starenja, dehidracije i denaturacije, dok se FISH probe denaturiraju neposredno prije hibridizacije na preparate. Nakon standardne hibridizacije od 12 sati na 37 °C preparati se peru i boje s fluorescentnom kontrastnom bojom DAPI radi vizualizacije kromosoma i stanica u interfazi. Fluorescentni mikroskop koristi se za vizualizaciju obilježenih fragmenata DNA vezanih za komplementarne DNA sekvence kromosoma na preparatima. FISH tehnika omogućava detekciju (i) kriptičnih i submikroskopskih strukturnih kromosomskih preraspodjela, (ii) promjene broja kromosoma, (iii) mapiranje gena, (iiii) određivanje

mehanizma nastanka kromosomske preraspodjele, te (iiii) mikroskopskih vidljivih strukturnih poremećaja kromosoma koje G-prugama nije bilo moguće precizno karakterizirati.

Razvijene su različite modifikacije osnovne tehnike, ovisno o dizajnu proba i broju korištenih fluorokroma. FISH probe mogu biti specifične za određeni manji dio kromosoma (lokus ili gen specifične probe, subtelomerne probe, centromerne probe) ili mogu pokrivati veće regije kromosoma, pojedine krakove kromosoma ili pak cijele kromosome.

Već početkom 1990tih godina FISH tehnike našle su veliku kliničku primjenu kako u identifikaciji poznatih sindroma RIP-a tako i u otkrivanju novih. Napredak tehnika molekularne citogenetike omogućio je povezivanje sličnih fenotipskih karakteristika s recipročnim mikrodelecijama i mikroduplicacijama, te karakterizaciju novih sindroma. U brojnim bolje poznatim slučajevima kliničkih sindroma, FISH specifične probe omogućile su njihovo direktno, jednostavno i pouzdano testiranje.

Na osnovi spoznaje da su subtelomerne regije kromosoma bogate važnim genima, početkom 1990tih postavlja se hipoteza o subkategoriji kriptičnih kromosomskih aberacija u podlozi RIP-a. Jedan od prvih radova o nebalansiranim preraspodjelama subtelomera u etiologiji RIP-a objavljen 1992. godine predlaže analizu svih subtelomernih regija kromosoma kod osoba s RIP-om s ciljem otkrivanja kriptičnih aberacija (34), no tek je 1996. godine razvijen prvi set FISH subtelomernih proba koje su omogućile dijagnostičko testiranje svih subtelomernih regija kromosoma (35). Poboljšane verzije subtelomernih proba kasnijih godina omogućile su njihovu široku primjenu (36). Literaturni podatci navode da prosječno 3% (1-9%) osoba s RIP-om, uz normalni nalaz kariotipa G-prugama, ima kriptične aberacije subtelomernih regija (124).

Znatan napredak FISH tehnologije omogućen je istodobnim korištenjem više od tri fluorokroma, tj. razvojem multikolor FISH tehnika (engl - multicolor FISH, mFISH), te razvojem digitalnih sistema i softvera za analizu slike u citogenetici koji su omogućili kvantifikaciju podataka. Prvi set proba za sva 24 humana kromosoma opisan je 1996. godine, što je kombinacijom različitih fluorokroma omogućilo istodobnu detekciju svih ljudskih kromosoma (37-38). Danas postoje brojne modifikacije osnovnog mFISH seta proba bilo molekularnom modifikacijom samih proba i/ili dodavanjem specifičnih FISH proba. Među najčešće upotrebljavanim mFISH tehnikama su: hrMCB (engl. high-resolution multicolor-banding) temeljena na fluorescentno obilježenim preklapajućim probama raspoređenih duž kromosoma, te pomoću specifično dizajniranog MCB softvera rezultiraju fluorescentnim profilima kromosoma što omogućuje kvantifikaciju podataka; cenMFISH (engl. – Centromere-specific multicolor FISH) omogućava istodobnu karakterizaciju svih centromera koristeći sekvence centromerne satelitne DNA kao probe; acroM-FISH i acro-cenM-FISH omogućavaju karakterizaciju kratkih krakova i centromera akrocentričnih kromosoma (kromosomi 13, 14, 15, 21 i 22); subcenM-FISH (engl. – Subcentromere-specific multicolor FISH) je specifično modificiran set proba koji detektira eukromatinske sekvence vrlo blizu



centromera (39). Lokus specifične probe su sekvence DNA koje se propagiraju pomoću različitih vektora te se fluorescentno obilježavaju. Najčešći vektori korišteni za kloniranje FISH proba su umjetni bakterijski kromosomi (BAC engl. – Bacterial artificial chromosome) koji daju mogućnost propagiranja DNA fragmenta veličine od 150-300 kb. Razvoj lokus specifičnih FISH proba bio je usko vezan uz projekt određivanja redoslijeda nukleotida humanog genoma – sekvenciranje humanog genoma (The Human Genome Project) koji je omogućio točno mapiranje DNA sekvenci. Sekvence dobivene propagiranjem unutar BAC-ova mapirane su na genom čovjeka, te je određen specifični lokus pojedinog BAC klona. Danas je dostupna najmanje jedna BAC-FISH proba za svaki segment genoma veličine 1 Mb, što je ukupno više od 7 000 BAC-FISH proba (40).

Kako je razvoj FISH tehnika omogućio detekciju submikroskopskih kromosomskih aberacija tako se u stručnu literaturu uvode nazivi mikrodelecijski i mikroduplicacijski sindromi koji imaju specifične fenotipske karakteristike te poznatu genetsku podlogu. Da se naglasi da su mikrodelecijski sindromi posljedica strukturne i funkcionalne monosomije zahvaćenog kromosomskog segmenta u literaturi se pored naziva mikrodelecijski sindromi susreće naziv segmentalna aneusomija (41). Kod većine mikrodelecijskih i mikroduplicacijskih sindroma klinička slika sindroma posljedica je delecija odnosno duplikacija više susjednih gena, te u tim slučajevima govorimo o sindromima susjednih gena (engl. contiguous gene syndromes). U nekim slučajevima fenotipska slika može biti posljedica poremećaja, mutacije ili gubitka funkcije jednog gena te tada govorimo o monogenским poremećajima (engl. single gene disorders).

### **1.2.3. Promjene u pojedinim genima – monogenški poremećaji**

Tradicionalno identifikacija pojedinih genskih regija koje su vezane za neurorazvojna oboljenja zasnivala se na karakterizaciji obiteljskih slučajeva analizom vezanosti lokusa (engl. Linkage analysis) te analizi većeg broja sporadičnih slučajeva citogenetskim i molekularno citogenetskim tehnikama. Na temelju opažanja velikog broja obiteljskih slučajeva RIP-a koji su u nekim slučajevima bili znatno češći i slijedili su mendelov obrazac nasljeđivanja, već šezdesetih godina prošlog stoljeća postavljen je koncept po kojemu su aberacije specifičnih gena odgovorne za razvoj RIP-a.

Promjene unutar svakog pojedinog gena koje služe kao nacrt za izgradnju svih proteina može imati ozbiljne posljedice čija težina ovisi kako o prirodi same promjene tako i o funkciji samog proteina. Oboljenja koja nastaju kao rezultat promjena pojedinih gena nazivamo monogenским oboljenjima, a karakterizirana su klasičnim Mendelovim nasljeđivanjem. Obrazac pojavljivanja monogenških oboljenja ovisi o (i) kromosomskoj lokaciji gena, koja može biti autosomna (gen se nalazi na autosomu) ili X-vezana (gen se nalazi na X kromosomu); te (ii) da li je fenotip dominantan (promjena samo jedne kopije,

jednog alela, gena dovoljna je za punu fenotipsku ekspresiju oboljenja) ili recesivan (puna ekspresija fenotipa uvjetovana je prisutnošću dva promijenjena alela gena).

Identifikacija novih gena odgovornih za autosomno dominantna oboljenja RIP-a temeljila se na analizi pojedinaca sa sličnim fenotipskim obilježjima, sustavnim mapiranjem kromosomskih aberacija s ciljem utvrđivanja najmanje regije odgovorne za puni fenotip (kritična regija), te analizom mutacija direktnim sekvenciranjem gena. U slučajevima sporadičnog nesindromskog RIP-a kada ne postoje mikroskopski vidljive kromosomske aberacije, upotreba isključivo FISH tehnika u velikoj većini slučajeva neće rezultirati otkrivanjem etiologije. Istraživanja se pak autosomno recesivnih oboljenja RIP-a većinom odnose na velike obiteljske studije koje obuhvaćaju velik broj zahvaćenih članova kroz nekoliko generacija analizama vezanosti lokusa i homozigotnim mapiranjem.

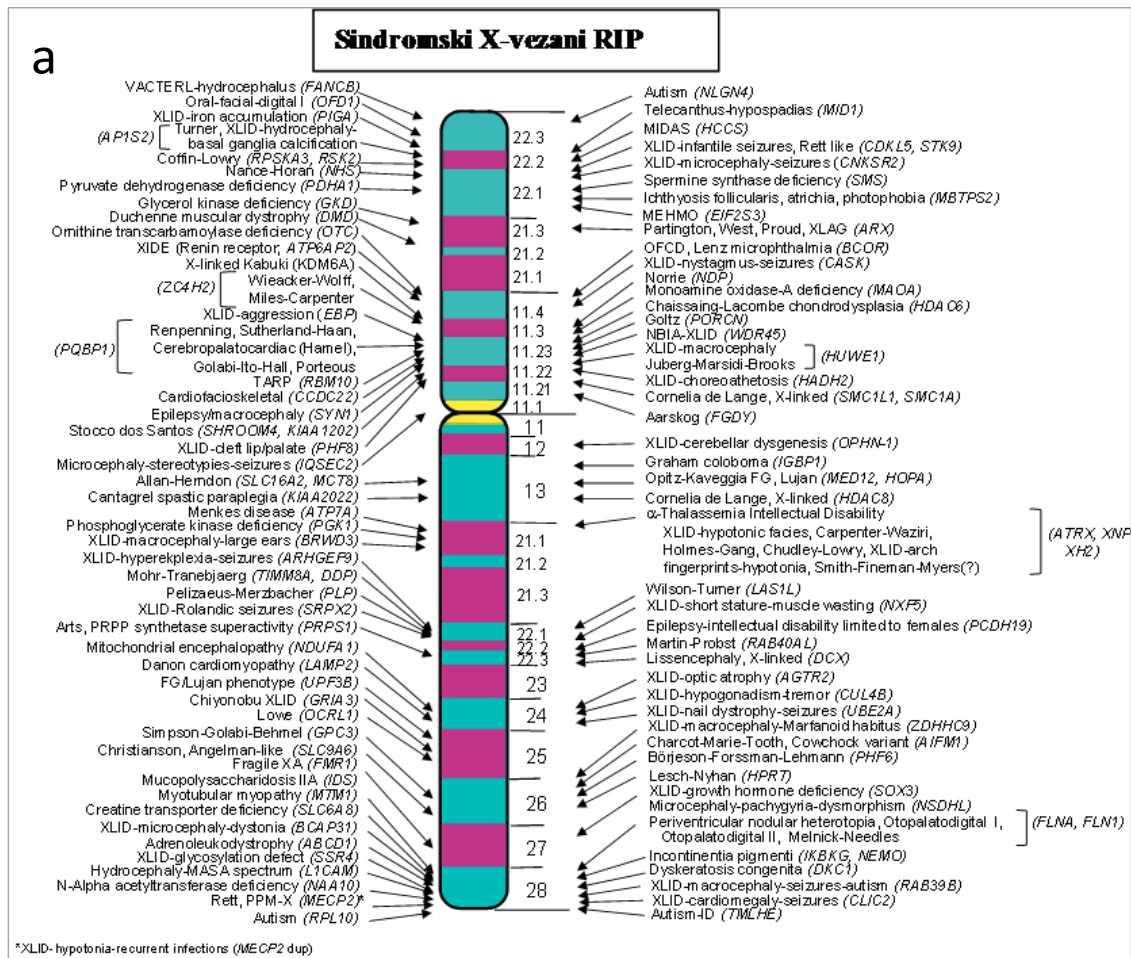
Poznato je više od 120 gena na X kromosomu, te nešto više od 400 gena na autosomima, čije aberacije mogu uzrokovati RIP. Iako X kromosom najvjerojatnije broji disproporcionalno puno gena koji reguliraju neurorazvoj, prema grubim procjenama mutacije unutar 1400 gena na autosomima mogle bi biti odgovorne za razvoj RIP-a.

#### **1.2.4. X-vezani razvojni intelektualni poremećaj**

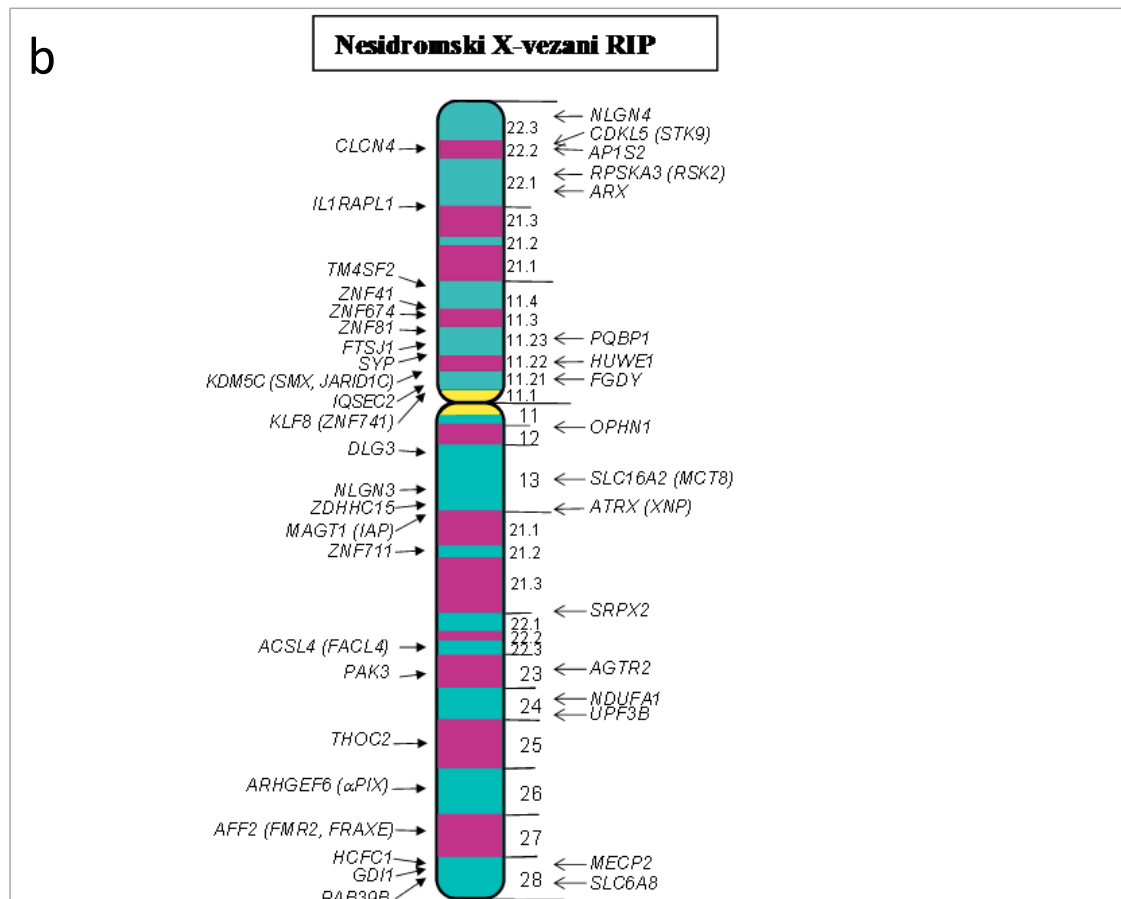
Osnovni koncept da su aberacije gena na X kromosomu važan etiološki faktor RIP-a postavljen je već 1970ih godina na temelju zapažanja da je RIP značajno učestaliji kod muškog spola te opisa velikog broja obiteljskih slučajeva kod kojih se mogao uočiti X-vezani uzorak nasljeđivanja. X-vezani razvojni intelektualni poremećaj (engl. X-linked mental retardation – XLMR; X-linked intellectual disability – XLID) definira se kao RIP u čijoj genetskog podlozi se nalaze, ili je vrlo vjerojatno da se nalaze aberacije gena na X kromosomu. X-vezani RIP nalazi se u podlozi 5-10% ukupnih slučajeva RIP-a kod muškog spola. Projekt resekvenciranja X kromosoma otkrio je da se oko 4% svih gena nalazi upravo na X kromosomu. Velika većina gena s X kromosoma uključena je u proces sinaptičke plastičnosti te formiranje i sazrijevanje dendrita (42). Oko 40% svih gena s X kromosoma visoko su eksprimirani u mozgu, posebno u hipokampusu, regiji koja je odgovorna za procese učenja i pamćenja (43).

Na temelju kliničke slike X-vezani RIP dijeli se na sindromski i nesindromski. Nesindromski X-vezani RIP (MRX, IDX) predstavlja skupinu gdje je kognitivni deficit jedina patološka manifestacija. Sindromski X-vezani RIP (MRXS, IDXS) ima prateće promjene rasta, prepoznatljiv kraniofacijalni izgled, neuromišićne promjene, abnormalnosti ponašanja, ili metaboličke poremećaje koji se javljaju u manje ili više dosljednom i klinički prepoznatljivom obrascu (44-46). Razlika između tih oblika XLMR postupno postaje manje jasna jer su mutacije u nekoliko gena identificirane u obje skupine.

Mutacije/promjene u pojedinim genima mogu se utvrditi u oko 42% obiteljskih slučajeva X vezanog RIP-a (46). Poznato više od 160 sindromskih poremećaja X vezanog RIP, te velik broj obiteljskih slučajeva nesindromskog X vezanog RIP-a, od kojih je 95 mapirano na X kromosom. Mutacije u preko 120 X vezanih gena odgovorne su za više od 80 sindromskih oblika RIP-a, te za preko 35 obiteljskih slučajeva nesindromskog RIP-a koje su regionalno mapirane na X-kromosom. Na slici 1. prikazani su X vezani geni u podlozi RIP-a.



Slika 1a. Shematski prikaz gena u podlozi RIP-a. Geni u podlozi sindromskog X-vezanog RIP-a. Modificirano prema Atlas of X-Linked Intellectual Disability Syndromes.



Slika 1b. Geni u podlozi nesindromskog X-vezanog RIP-a. Modificirano prema Atlas of X-Linked Intellectual Disability Syndromes.

### 1.2.5. Epigenetske promjene – deregulacija gena s imprintom

Ekspresija gena je dinamički proces koji traje cijeli život, a reguliran je vremenski i prostorno te ovisi o mnogo faktora. Transkriptom, koji predstavlja ekspresijski profil multiplih gena, izrazito je tkivno i regionalno specifičan (47-48). Regulacija ekspresije gena odvija se na nekoliko razina unutar genoma što omogućava da pojedini geni budu aktivni u pojedinim tkivima/organima te kroz određene vremenske periode. Promjenu u ekspresiji gena koja nastaje bez promjene u broju ili slijedu DNA nazivamo epigenetskom promjenom. Molekularne mehanizme koji dovode do epigenetskih promjena te diferencijalne ekspresije gena možemo podijeliti na (i) metilacijske modifikacije, (ii) modifikacije histona, (iii) RNA interferenciju – nekodirajuća RNA te (iv) komplekse regulacije remodeliranja strukture kromatina. U slučaju regulacije ekspresije gena epigenetskim mehanizmima homeostaza može biti narušena (i) aberacijama samih gena s epigenetskim modifikacijama, (ii) aberacijama gena koji kontroliraju epigenetske modifikacije, te (iii) aberantnim epigenetskim modifikacijama gena.

Većina gena prepisuje obje genske kopije. Međutim, postoje geni i skupine gena koji se eksprimiraju samo s majčina ili očeva kromosoma, što znači da je jedna genska kopija inaktivirana/utišana, a taj je fenomen poznat kao imprinting (engl. genomic imprinting). Mehanizam inaktivacije u podlozi imprintinga je epigenetska modifikacija – alel specifična inaktivacija metiliranjem citozina, a takvi se geni nalaze obično u skupinama ili klasterima, te imaju specifičnu kromosomsku lokalizaciju i bogati su CG parovima baza. Genima koji podliježu ovom tipu genske regulacije svojstvena je funkcijska monosomija uz strukturnu disomiju. Poznato je blizu 80 gena koji se diferencijalno eksprimiraju obzirom na roditeljsko podrijetlo (49).

Deregulacija gena s imprintom leži u podlozi niza neurorazvojnih oboljenja, a može nastati kao posljedica (i) delecije genomskog segmenta koji sadrži gene s imprintom, (ii) uniparentne disomije te (iii) delecije ili mutacije centra za imprinting. Uniparentna disomija kao poseban oblik kromosomskih aberacija označava prisutnost cijelog ili djela homolognog kromosoma istog roditeljskog podrijetla u diploidnom kariotipu (heterodisomija i izodisomija). Kod poremećaja centra za imprinting kromosomi su biparentnog porijekla ali uniparentnog tipa DNA metilacije.

Epigenetska deregulacija pojedinih gena i genskih skupina u mozgu može rezultirati razvojem RIP-a. Istraživanja također ukazuju na važnost epigenetike u etiologiji ASD-a. Poznato je nekoliko regija (engl. epigenetic hotspots) koje nose gene s imprintom, a povezane su s razvojem sindroma ASD-a (50-52).

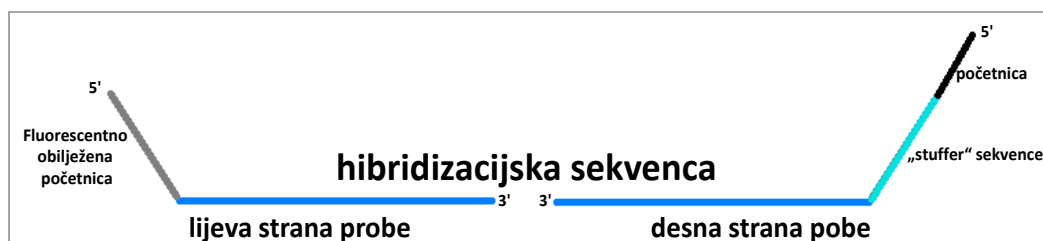
### **1.2.6. Promjene u broju kopija gena**

Iako FISH tehnike omogućavaju detekciju aberacija na znatno većoj rezoluciji od standardne kariotipizacije postoje ograničavajući faktori. Multicolor FISH tehnika ograničena je fluorescentnim spektrom kojeg je moguće detektirati i razlikovati fluorescentnim mikroskopom, te iako FISH tehnika omogućava detekciju vrlo malih segmenata DNA, nije pogodna za analize velikog broja uzoraka. Završetkom projekta sekvenciranja genoma, 2000. godine, i razvojem sofisticiranih tehnika molekularne citogenetike omogućena je detekcija vrlo malih strukturnih promjena u broju kopija DNA – višak ili manjak (engl. Copy Number Variation – CNV).

### 1.2.6.1. Multiplex ligation dependent probe amplification – MLPA

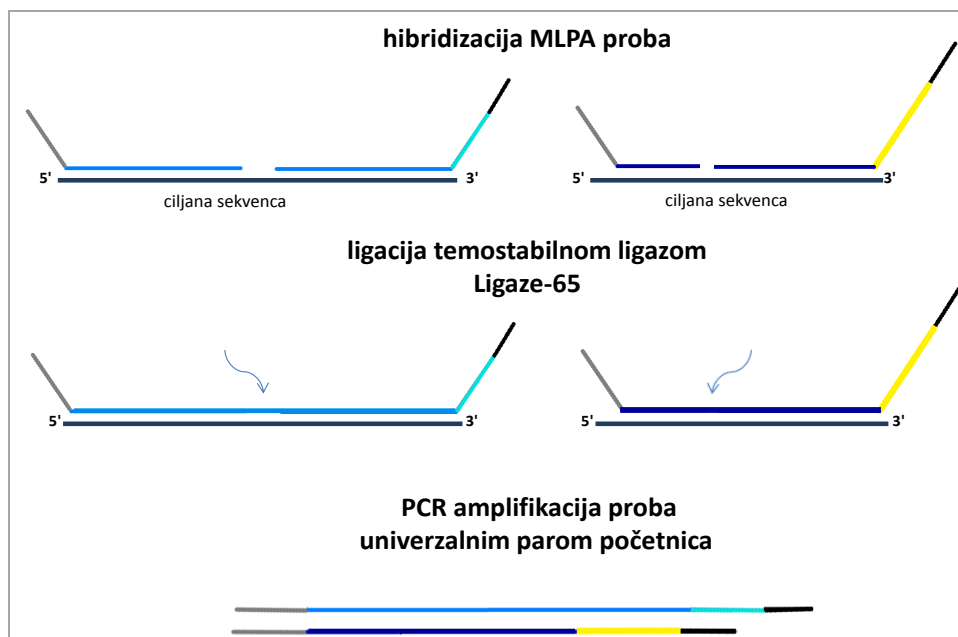
Noviji pristup u analizi genoma opisan 2002. godine predstavlja MLPA tehnika (engl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) čiji dizajn omogućava istovremenu kvantifikaciju do 50 različitih DNA sekvenci veličine 50-60 nukleotidnih parova uz minimalnu količinu DNA uzorka (20 ng) (53).

Specifičnost tehnike, bazirane na PCR metodi (polimerazna lančana reakcija – engl. Polymerase Chain Reaction), zasniva se na principu po kojemu se umnaža proba dodana uzorku, a ne testna DNA. Umnažanje probe isključivo ovisi o prisutnosti komplementarne sekvence DNA u uzorku. Svaka MLPA proba sastoji se od dva dijela, što znači da za sekvencu od interesa postoje dva dijela probe. Jedan dio probe je kratki sintetizirani oligonukleotid sastavljen od dva dijela. Na 3' kraju sadrži jedan dio sekvence od interesa (engl. target-specific sequence) dužine 21-30 nukleotida, a na 5' kraju sadrži fluorescentno obilježenu početnicu od 19 nukleotida koja je zajednička svim MLPA probama. Drugi, duži dio probe je produkt kloniranja u jedan od specifičnih vektora (M13-derived SALSA vektor) koji sadrži određena restrikcijska mjesta te jedinstvene „stuffer“ sekvence. Takav produkt u konačnici je sastavljen od tri djela. Na 3' kraju sadrži drugi dio sekvence od interesa dužine 25-43 nukleotida, na 5' kraju sadrži komplementarnu PCR početnicu dužine 36 nukleotida koja je jedinstvena za sve probe, dok se treći dio probe („stuffer“ sekvenca od 19-370 nukleotida) nalazi između. Svaki dugi dio MLPA probe produkt je različitog M13 vektora koji nosi „stuffer“ sekvencu različite dužine. Na slici 2. shematski je prikazan dizajn MLPA probe.



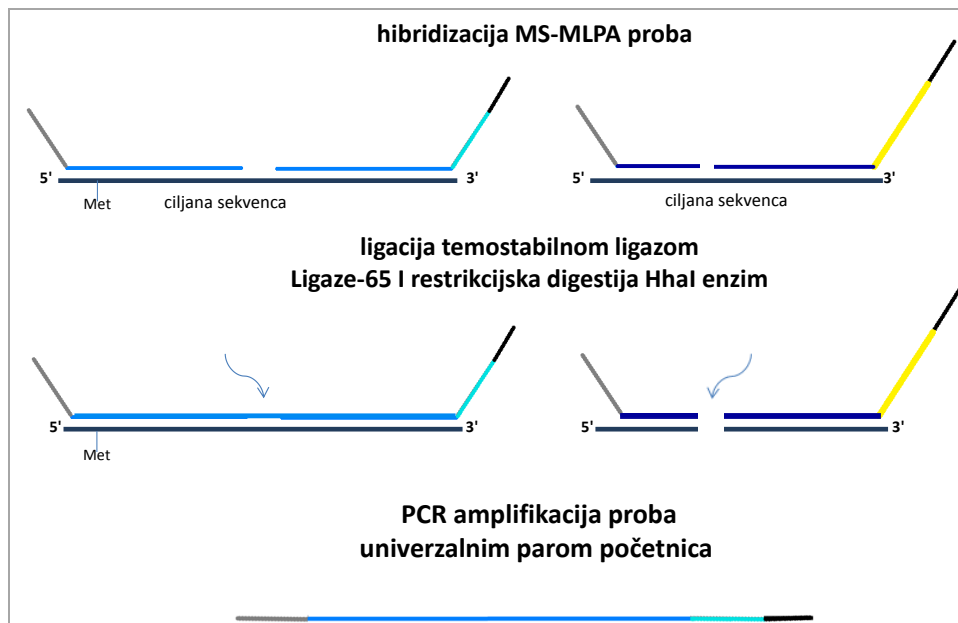
Slika 2. Shematski prikaz dizajna MLPA probe.

Kombinacijom različitih „stuffer“ sekvencija (različitih dužina) i različitih dužina sekvencija od interesa moguće je razlikovanje pojedinih MLPA proba. U konačnici svaka MLPA proba (kratki dio plus dugi dio) dugačka je između 100-500 nukleotida sa razlikom u dužini od 6-9 nukleotida između proba. Ovakav dizajn proba omogućava istovremenu hibridizaciju do 50 MLPA proba. Samo u slučaju kad su oba dijela MLPA probe (hibridizacijska sekvencija) cijelom dužinom hibridizirale na komplementarnu DNA u uzorku (svi nukleotidi MLPA probe su komplementarni testnoj DNA), moguća je ligacija lijevog i desnog dijela MLPA probe termostabilnim enzimom (Ligaze-65), što dalje omogućava umnažanje MLPA proba te njihovu kvantifikaciju.



Slika 3. Osnovni princip MLPA tehnike

Specifični dizajn MLPA tehnike omogućava uz kvantifikaciju promjene broja kopija do 50 različitih DNA sekvenci i metilacijsko profiliranje. MS-MLPA test (engl. – Methylation-specific MLPA) prati princip dizajna MLPA proba uz modifikaciju koja se odnosi na probe koje se koriste za kvantitativno određivanje metilacije. Takve probe sadrže jedno HhaI restrikcijsko mjesto unutar ciljane sekvence što nakon hibridizacije uz ligaciju omogućava istovremeno digestiju restrikcijskim enzimima osjetljivim na metilaciju (HhaI enzim). Metilacija ciljane sekvence inhibira djelovanje restrikcijskog enzima što rezultira normalnim MLPA produktom, dok je ciljana sekvenca bez metilacijske modifikacije izložena digestiji HhaI enzimu što onemogućava ligaciju dijelova MLPA probe i PCR amplifikaciju (54). Osnovni princip MS-MLPA tehnike prikazan je na slici 4.



Slika 4. Osnovni princip MS-MLPA tehnike.

Jednostavnost primjene MLPA tehnike omogućila je njenu brzu implementaciju u evaluaciji pacijenta s RIP-om i ASD-om (55-57). Dostupna su 74 različita MLPA kita u kategoriji neurorazvojnih poremećaja (MRC-Holland, [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) koja sadržavaju različite kombinacije proba te omogućavaju jednostavno i isplativo (cost effective) testiranje pacijenata s RIP-om i ASD-om (58).

#### 1.2.6.2. Biočipovi – Array komparativna genomska hibridizacija (aCGH)

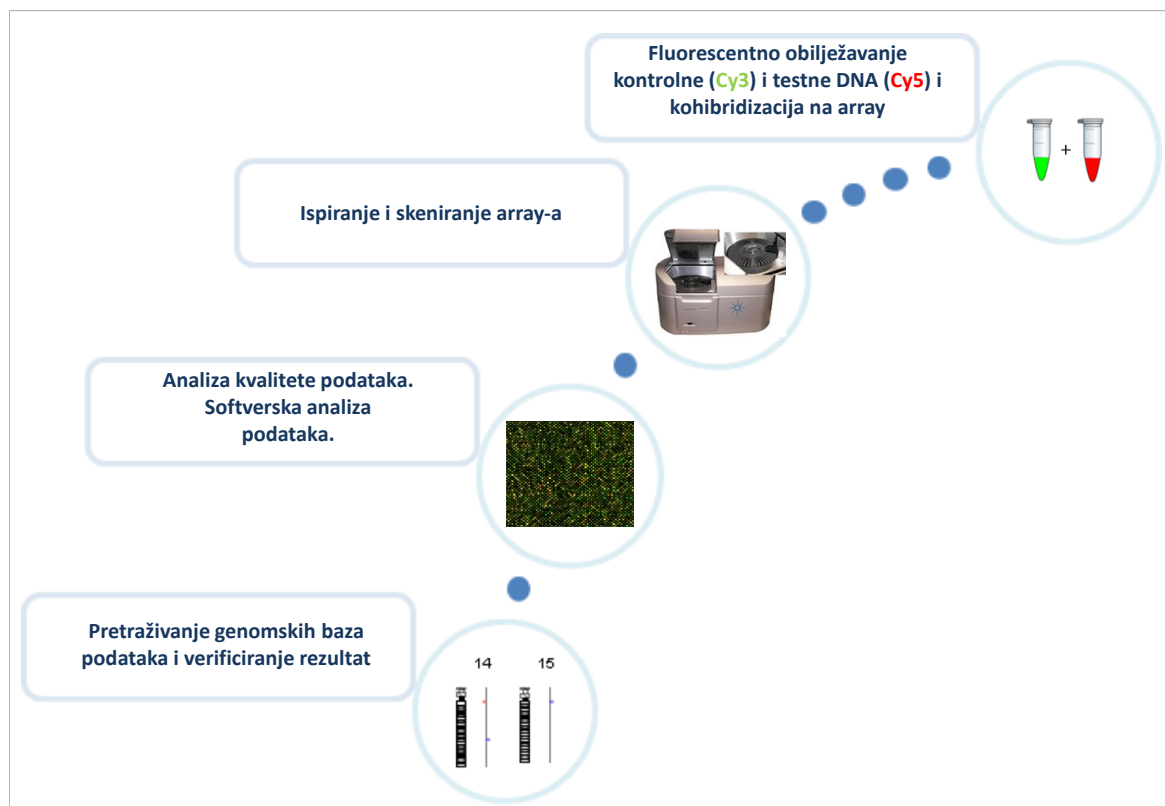
Daleko najveći napredak na području rezolucije detekcije genomskih aberacija ostvaren je uvođenjem tehnike biočipova koja omogućava skrining čitavog genoma na višak odnosno manjak specifičnih DNA sekvenci. Tehnička osnova biočipova odnosno array komparativne genomske hibridizacije (engl. - array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) postavljena je 1997. godine kada su objavljeni prvi radovi opisujući protokol tehnike Matrix DNA, koji omogućuje kohibridizaciju cjelokupne genomske DNA i kontrolne DNA obilježene različitim fluorescentno modificiranim nukleotidima na staklenu površinu veličine predmetnog stakalca koje sadrži imobilizirane vrlo male sekvence DNA kao probe (59-60).

Nakon sekvenciranja humanog genoma i napretka tehnike biočipova omogućeno je dizajniranje čipova sa oligonukleotidnim sekvencama za skrining čitavog genoma (61-62). Danas su dostupne različite platforme za detekciju suptilnih submikroskopskih promjena broja kopija DNA sekvenci znatno manje rezolucije od 1Mb. Rezolucija ovisi o dizajnu platforme; pojedine platforme mogu sadržavati od 40 tisuća do 1 milion proba. Rezolucija ovisi i o tome da li su probe razmještene ciljano, i obuhvaćaju napr. lokuse poznatih mikrodelecijskih/duplikacijskih sindroma (engl. targeted array), ili s većim odnosno manjim



razmacima pokrivaju cijeli genom (engl. whole genomic array). U dizajniranju i proizvodnji array čipova postoje različiti pristupi. Jedna od vodećih kompanija za proizvodnju array čipova, Agilent Technologies, pruža nekoliko različitih platformi (SurePrint G3 Human CGH Microarray) za array analizu visoke rezolucije. Osnovni princip proizvodnje temelji se na in situ sintezi oligonukleotida, gdje tehnologija bezkontaktnog inkjet SurePrint procesa tiskanja omogućava sintezu oligonukleotida bazu po bazu na temelju digitalne datoteke koja sadrži zadane sekvence proba. Upravo zbog tehnike direktne sinteze oligonukleotida na površinu stakalca postiže se iznimno velika gustoća proba, a takvi array čipovi nazivaju se oligonukleotidni čipovi visoke rezolucije.

Osnovni princip tehnike bazira se na hibridizaciji cjelokupne genomske DNA na array koji sadrži imobilizirane DNA probe. Za array CGH analizu genomska DNA pacijenta/testna DNA i kontrolna/referentna DNA prvo prolaze proces kemijske ili mehaničke fragmentacije. Testna i kontrolna DNA potom se fluorescentno obilježe modificiranim nukleotidima, Cy5-dUTP odnosno Cy3-dUTP, te se kohibridizaju na array. Nakon hibridizacije pranjem array-a uklonjaju se nehibridizirani ostatci DNA, nakon čega slijedi skeniranje. Skener visoke moći razlučivanja od 2 mikrona, bilježi razinu fluorescencije za svaku pojedinu probu na čipu. Razina fluorescencije softverskim paketom za analizu prevodi se u logaritamsku vrijednost ( $\log_2$ ) što omogućava mjerenje broja kopija DNA u uzorku. Shematski prikaz array tehnike prikazan je na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz array tehnike.

Molekularna kariotipizacija pokazala je veliki potencijal i pronašla je široku primjenu u analizi ljudskog genoma. Mnogi znanstveni radovi potvrdili su iznimnu važnost primjene array CGH tehnike na uzorku pacijenta s RIP-om i ASD-om. Array tehnikom visoke rezolucije za skrining cijelog genoma moguće je utvrditi etiologiju u više od 20% slučajeva (63-65) u uzorku pacijenata s RIP-om koji su imali normalne nalaze kariotipa visoke rezolucije i subtelomernog skrininga. Također velik broj studija potvrđuje velik potencijal array tehnike u istraživanju etiologije ASD-a, te povezanost CNV-ova s razvojem autističnog spektra (66-69). U literaturi je opisan i niz specifično dizajniranih array-a (engl. Custom designed array) za određene gene i skupine gena, a koji omogućuju njihovu vrlo detaljnu karakterizaciju (70-73).

### **1.3. Novi mikrolelecijski i mikroduplikacijski sindromi**

Revolucionarni pristup istraživanja čitavog ljudskog genoma u rezoluciji od svega nekoliko kb pomoću aCGH tehnike doveo je do eksponencijalnog rasta u otkrivanju mikrolelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma. Do 2000. godine bilo poznato dvadesetak mikrolelecijskih sindroma i par mikroduplikacijskih sindroma. Smatra se da za svaki mikrolelecijski sindrom postoji recipročni mikroduplikacijski. Pristup dosadašnjih istraživanja etiologije RIP-a i ASD-a temeljio se na pristupu od „fenotipa prema genotipu“ tj. prikupljanju i obradi pacijenta sa sličnim dizmorfičnim fenotipskim karakteristikama, s ciljem definiranja zajedničkih genomskih regija u podlozi oštećenja, te definiranja novih mikrolelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma. Za veliku većinu nesindromskih oblika RIP-a etiologija je tim pristupom i dalje ostajala nepoznata. Nove sofisticirane tehnologije molekularne citogenetike (MLPA i aCGH) danas međutim, omogućavaju istraživanje velikog broja pacijenata bez obzira na fenotipske karakteristike, a time i neuporedivo brže definiranje novih kliničkih entiteta i sindroma kroz pristup „od genotipa prema fenotipu“ (74-75).

Nakon 2003. godine broj novootkrivenih mikrolelecija ali i mikroduplikacija počinje eksponencijalno rasti, a time i povezivanje submikroskopskih kromosomskih aberacija s novim kliničkim fenotipovima, te karakterizaciju novih mikrolelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma. Zahvaljujući array tehnici u recentnoj literaturi postoji opis za 211 mikrolelecija i 79 mikroduplikacija koje uključuju 267 različitih genomskih regija (76). Široka primjena tehnika visoke rezolucije u istraživanjima etiologije RIP-a i ASD-a doprinosi sve većem broju otkrivenih strukturnih promjena što se posebno odražava na brzo rastućem broju objavljenih publikacija.

RIP i ASD imaju mnogo zajedničkih domena. Tri najznačajnija kognitivno fenotipska obilježja ASD (poremećaj komunikacije, socijalni deficit i stereotipni obrasci ponašanja) često se u određenom stupnju mogu uočiti kod osoba s RIP-om. Osobe s RIP-om često imaju stereotipne obrasce ponašanja uz ponekad izraženu autoagresivnost koji postaju sve

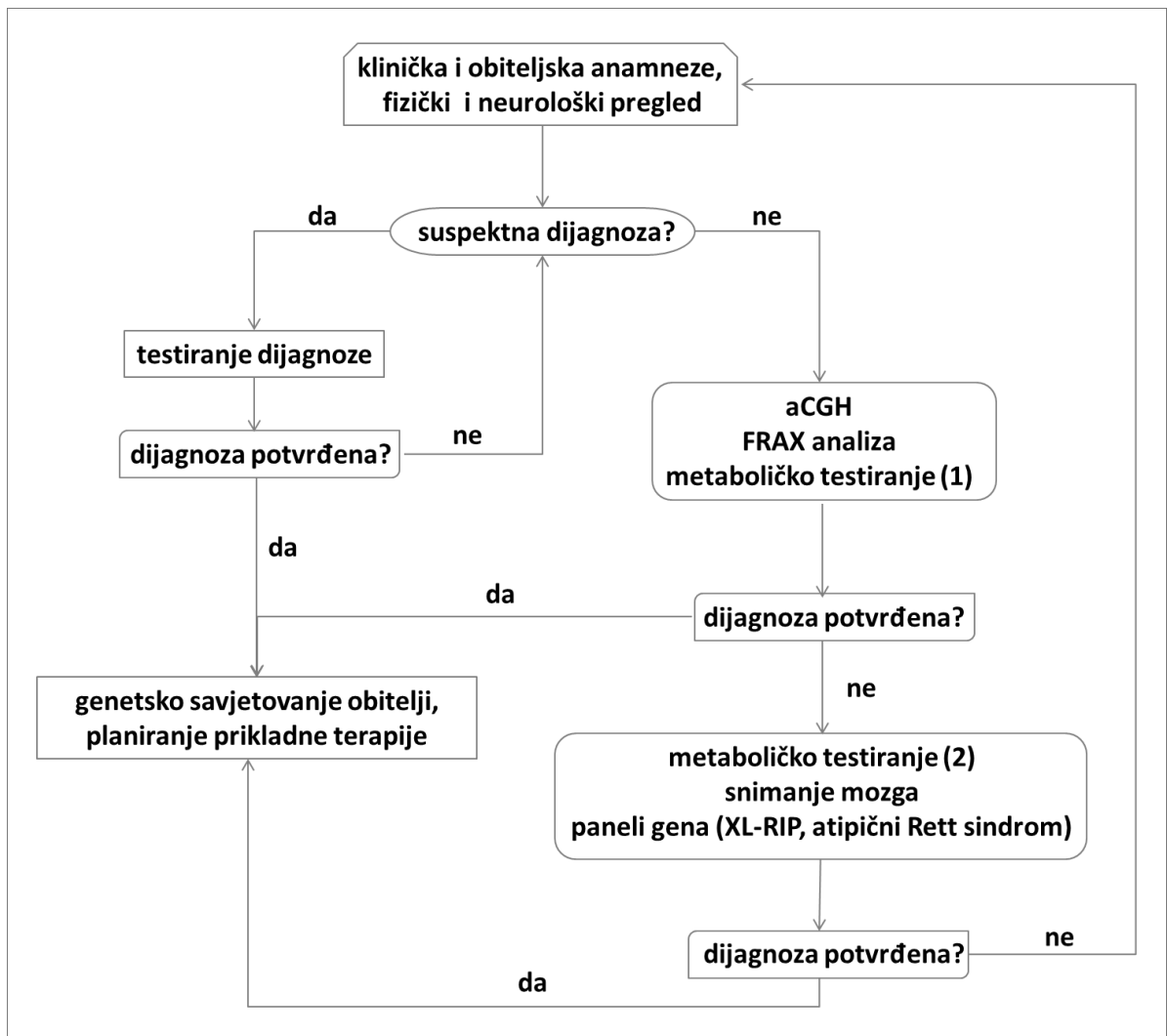
izraženiji kod osoba s nižim IQ-rezultatom (77). Poteškoće u komunikaciji također su izraženije kod osoba s teškim i dubokim RIP-om. Mnogi sindromi RIP-a imaju učestalost autizma koja je znatno veća od učestalosti u općoj populaciji. Iako RIP i ASD predstavljaju dvije odvojene dijagnostičke kategorije, zajedničke fenotipske i etiološke karakteristike ne mogu se zanemariti.

Usprkos napretku i razvoju tehnika molekularne citogenetike nerazjašnjena etiologija RIP-a, i ASD-a još uvijek predstavlja veliki znanstveno-istraživački izazov. Patogeneza neurorazvojnih poremećaja samo je djelomično razjašnjena, a smatra se da se genetska podloga nalazi kod velikog broja slučajeva RIP-a i ASD-a čiju etiologiju nije bilo moguće odrediti uslijed nedostupnosti dovoljno osjetljivih metoda skrininga.

Biološki mehanizmi u podlozi neurorazvojnih oboljenja još su nedovoljno dobro poznati, međutim očigledno je da RIP i ASD mogu biti posljedica poremećaja gena koji funkcioniraju u gotovo svim biološkim procesima, a to ukazuje da fenotip sniženog intelektualnog funkcioniranja odražava općenitu disfunkciju neurona (78).

#### **1.4. Dijagnostički postupak evaluacije pacijenta s RIP-om i ASD-om**

Genetski faktori nalaze se u najvećem djelu poznatih uzroka RIP-a i predstavljaju veliki broj svih poznatih uzroka ASD-a. Upravo zbog toga genetska evaluacija ispitanika prvi je korak u postavljanju etiološke dijagnoze. Poznavanje etiologije poremećaja može se prevesti u klinički korisne informacije za obitelj koje uključuju: pružanje informacija o prognozi, rizicima ponavljanja, te preferiranim oblicima terapije. Prema dosadašnjem algoritmu nakon kliničke i obiteljske anamneze, fizičkog i neurološkog pregleda u slučaju indikacije učinjene su specifične analize (FISH analiza specifičnih kromosomskih regija, FRAX analiza ili metaboličko testiranje). Međutim, u slučaju nespecifične ili nejasne kliničke slike prvo je indicirana GTG analiza kromosoma, zatim u negativnim slučajevima FISH analiza subtelomera i metaboličko testiranje (8). Značajne promjene dogodile su se u zadnjih nekoliko godina na području dijagnostike genetskih poremećaja. Veća dostupnost modernih tehnika molekularne citogenetike uvelike je promijenila uvriježene algoritme dijagnostičke evaluacije ispitanika s RIP-om i ASD-om. Tako danas nakon kliničke i obiteljske anamneze, fizičkog i neurološkog pregleda u slučaju nejasne kliničke slike aCGH postaje prva indicirana analiza. U nastavku na slici 6. prikazan je dijagnostički algoritam evaluacije ispitanika s RIP-om prema najnovijim smjernicama (79).



Slika 6. Dijagnostički postupak evaluacije pacijenta s RIP-om i ASD-om. (1) ukupni homocistein, acylcarnitine profil, aminokiseline i organske kiseline, mukopolisaharidi (glikozaminoglikani), oligosaharidi, kreatin, i drugi. (2) drugi urođeni metabolički poremećaji.

## **2. Hipoteza**

Hipoteza predloženog istraživanja je da će se upotrebom kombinacije klasičnih metoda analize kromosoma (GTG pruganja) i najnovijih tehnika molekularne citogenetike (MLPA i aCGH) povećati stopa detekcije suptilnih kromosomskih aberacija uključenih u RIP i ASD, dok aCGH analiza ispitanika s dijagnozom RIP-a i ASD-a nepoznate etiologije, uz uredan nalaz GTG analize, može otkriti nove kandidat gene u podlozi neurorazvojnih poremećaja.

## **3. Ciljevi rada**

Cilj predloženog istraživanja je otkrivanje novih genetskih uzroka u podlozi RIP-a i ASD-a kombinacijom klasičnih metoda analize kromosoma (GTG pruganja) i strategijom specifičnog skrininga (MLPA analiza) i skrininga čitavog genoma (aCGH analiza).

### **Specifični ciljevi:**

- a) unapređenje dijagnostike RIP-a i ASD-a u svijetlu napretka tehnologije u molekularnoj citogenetici;
- b) utvrditi prevalenciju kromosomskih aberacija detektiranih tehnikama klasične citogenetike (GTG pruganje) i tehnikama molekularne citogenetike (MLPA i aCGH);
- c) procjena MLPA tehnike kao skrining metode u evaluaciji klinički značajnih i novodefiniranih varijacija u broju kopija DNA (višak ili manjak broja kopija DNA) povezanih s RIP-om i ASD-om;
- d) precizna molekularna karakterizacija (određivanje veličine, pozicije i sadržaja gena) detektiranih kromosomskih aberacija s ciljem boljeg razumijevanja mehanizama u podlozi oštećenja kognitivnih funkcija;
- e) otkrivanje novih gena kandidata u podlozi RIP-a i ASD-a što će posljedično omogućiti definiranje novih kliničkih fenotipova (novih sindroma).

## **4. Materijali i metode**

### **4.1. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno ukupno 379 ispitanika. 355 ispitanika s dijagnozom RIP-a (277 ispitanika iz Centra za rehabilitaciju Stančić i 78 ispitanika iz Centra za rehabilitaciju Zagreb). 24 ispitanika s dijagnozom ASD-a iz Centra za rehabilitaciju Edukacijsko-rehabilitacijskog fakulteta, Kabinet za poremećaje iz autističnog spektra. Za sve ispitanike pribavljen je informirani pristanak roditelja/staratelja, i/ili predstavnika udruge roditelja, i/ili ravnateljstva centara. Istraživanje je sprovedeno prema svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje, sigurnost osoba koji sudjeluju u istraživanju te zaštita osobnih podataka ispitanika. Za potrebe istraživanja od svakog ispitanika prikupljeni su uzorci venske krvi s agensima protiv zgrušavanja, ukupno 3 ml krvi s EDTA za izolaciju DNA, te 3 ml krvi s heparin antikoagulantom za izradu kratkotrajne kulture limfocita. Također je od ispitanika prikupljena relevantna medicinska dokumentacija na temelju koje je izvršena selekcija prema kojoj su primjenjene specifične metode.

### **4.2. Citogenetska analiza kromosoma**

Citogenetska analiza standardnom metodom kariotipizacije učinjena je kod svih ispitanika s indikacijama iz obje grupe (RIP i ASD grupa).

Standardna metoda kariotipizacije temelji se na analizi preparata metafaznih i prometafaznih kromosoma dobivenih iz kratkotrajne stanične kulture limfocita periferne krvi stimuliranih na diobu u kulturi in vitro.

#### **4.2.1. Kratkotrajna kultura stanica periferne krvi**

U sterilnim uvjetima na sobnoj temperaturi 0,5 ml venske heparinirane krvi dodaje se u 5 ml hranjivog medija (Lymphochrome, SFM for growth of Lymphocytes, For Karyotyping, Lonza). Uzorci se inkubiraju u posebnim epruvetama s kosim dnom površine 5,5 cm<sup>3</sup> za rast limfocita (Cell Culture Tubes, Nunc). Vrijeme inkubacije je 72 sata (vrijeme inkubacije može varirati od 48-56 sata), a temperatura inkubacije 37°C. Nakon 72 sata u kulturu se dodaje 0,1 ml kolcemida (Colcemid solution 10 µg/ml, Serva) i 0,1 ml 0,01% otopine etidij bromida (UltraPure Ethidium Bromide 10 mg/ml, Invitrogen), te se inkubira daljnjih 90 minuta. Nakon inkubacije kultura se centrifugira 5 min na 1800 rpm, supernatant se izbacuje a na resuspendirani talog dodaje se 10 ml prethodno zagrijane (37°C) 0,075 M otopine kalijevog klorida – KCl (KaryoMAX Potassium Chloride Solution, Gibco). Inkubacija kulture s hipotoničnom otopinom traje 20 minuta na 37°C, te se nakon toga dodaje 1 ml rashlađene (4°C) otopine fiksativa (glacijalna octena kiselina : 96% metanol = 1 : 3, Octena kiselina (99-100 %) Kemika; Metanol, apsolutni (> 99.0 %) Kemika). Suspenzija se centrifugira 10 min na 500 g. Odstrani se supernatant te se na resuspendirani talog pažljivo dodaje 10 ml

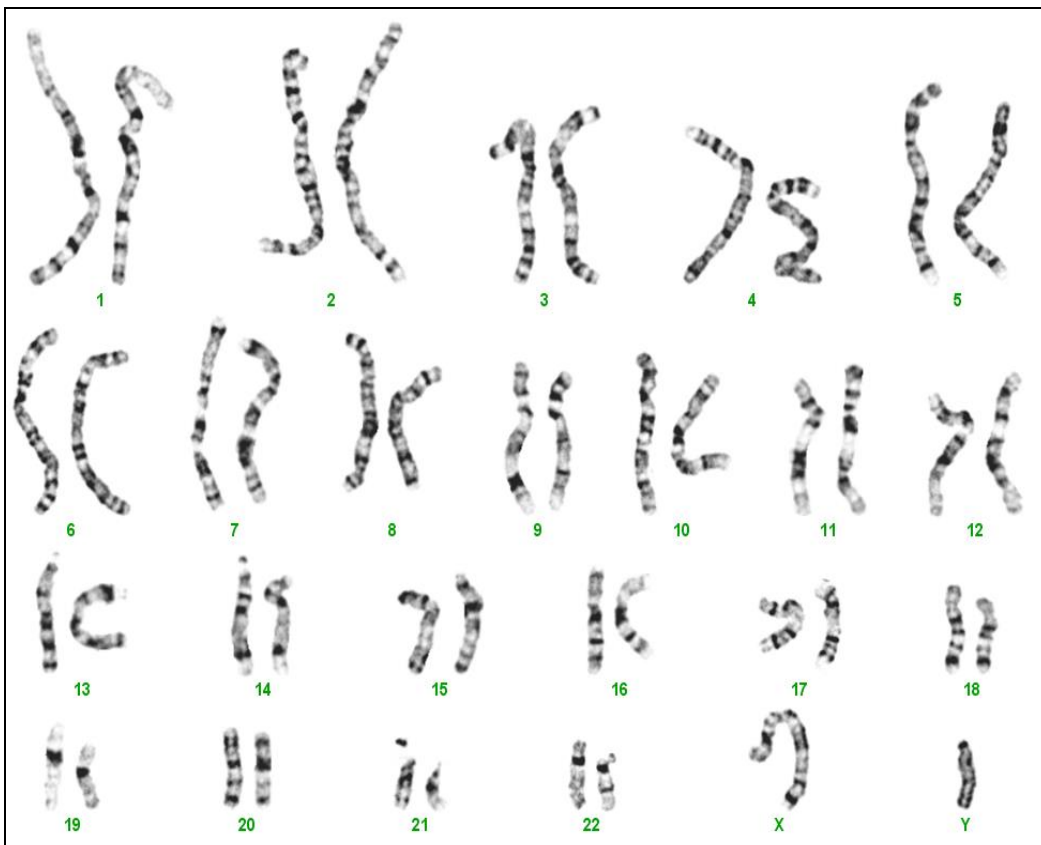
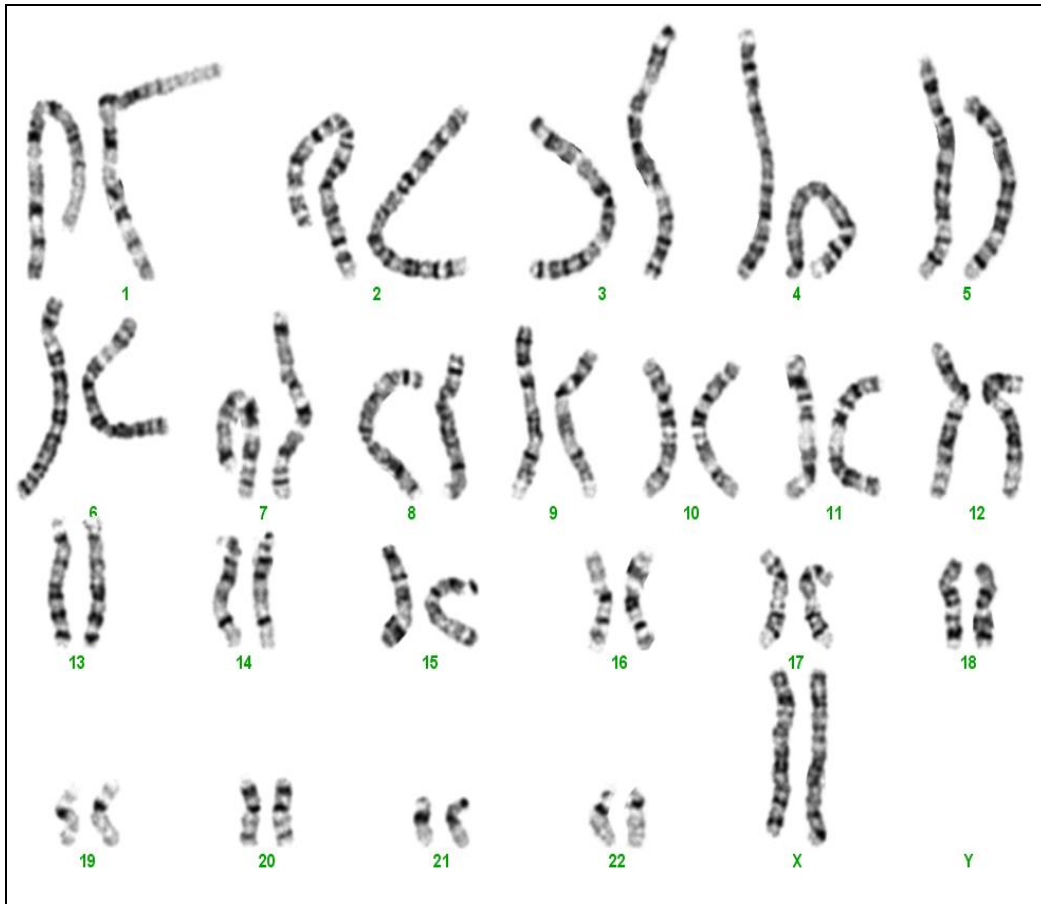
rashlađenog fikastiva. Suspenzija se stanica ponovo centrifugira 10 min na 1800 rpm. Nakon tri izmjene fikastiva suspenzija se ostavlja preko noći na -20°C. Sljedeće jutro suspenzija se centrifugira 10 min na 1800 rpm. Supernatant se pažljivo odvoji ne dirajući talog. Ovisno o veličini taloga dodaje se do 1 ml svježe pripremljene otopine rashlađenog (4°C) fikastiva.

#### **4.2.2. Priprema preparata za G-pruganje**

Na predmetna stakalca (Microscope slides Superfrost, cut edges, Roth) ohlađena na 4°C u destiliranoj vodi, kapne se 20-50 µl čiste suspenzije limfocita i jedna do dvije kapi svježe pripremljenog fikastiva (4°C). Prema potrebi preparati se suše iznad grijane vodene kupelji radi postizanja boljeg raspršenja metafaznih/prometafaznih kromosoma (Cytogenet Genome Res. 2002;98(2-3):136-46.). Predmetna stakalca se potom ostave 24 sata u termostatu grijanom na 70°C.

#### **4.2.3. Metoda G-pruganja kromosoma i analiza citogenetskih preparata**

Preparati ohlađeni do sobne temperature uranjaju se u 0,25% otopinu tripsina/PBS (Trypsin 250, Difco; PBS pufera, GIBCO) u trajanju od 5-15 sekundi. Nakon toga slijedi kratko ispiranje u PBS puferu, te potom u fosfatnom puferu pH 6,88 (Gurr Buffer Tablets, GIBCO). Preparati se boje 5-10 min u 0,03 % otopini Giemsa/fosfatni pufer (Giemsa Stain, Modified, Sigma Diagnostics) i ispiru u destiliranoj vodi. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi preparati su spremni za analizu pod svjetlosnim mikroskopom. Za analizu je korišten Zeiss Axioplan 2 imaging mikroskop te softverski program CytoVison 4.02, Applied Imaging. Na 20x/0,50 povećanju traže se lijepo raspršene metafaze, a zatim se na 100x/1,4 Oil povećanju radi analiza. Svaka metafaza se digitalno zabilježi i analizira pomoću softverskog programa. Na slici 7. prikazan je uredan muški i ženski kariotip dobiven GTG tehnikom G-pruganja kromosoma.



Slika 7. Prikaz standardnog ženskog 46,XX (gornja slika) i muškog 46,XY (donja slika) kariotipa



### 4.3. Izolacija genomske DNA

Kod svih ispitanika (RIP i ASD grupa) za potrebe MLPA, metilacijsko specifične MLPA i arrayCGH analize, genomska DNA izolirana je modificiranom metodom izoliranja upotrebom komercijalnog kita (Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen). Uzorci krvi uzeti na EDTA antikoagulans smrznuti su na  $-20^{\circ}\text{C}$  na nekoliko dana (maksimalno 7 dana) prije izolacije DNA. Pri sobnoj temperaturi odmrznuti uzorci periferne krvi od 3 ml prebacuju se u epruvete od 15 ml (BD Falcon Centrifuge Tubes, BD Biosciences) te se dodaje 9 ml otopine za lizu eritrocita (RBC Lysis Solution). Sadržaj epruvete promiješa se okretanjem te se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorak se centrifugira 20 sekundi na  $13\ 000 - 16\ 000 \times g$  radi taloženja bijelih krvnih stanica. Supernatant se odvoji do  $200\ \mu\text{l}$  tekućine iznad taloga koji se resuspendira na vibracijskoj miješalici pri najvećoj brzini. Resuspendirane stanice razgrađuju se dodavanjem 3 ml otopine za lizu stanica (Cell Lysis Solution) uz dodatak  $1,5\ \mu\text{l}$  proteinaze K (Puregene Proteinase K, Qiagen) miješanjem na vibracijskoj miješalici pri najvećoj brzini 10-30 sekundi. Da bi se dobila veća količina DNA moguće je inkubirati uzorke na  $37^{\circ}\text{C}$  preko noći. Staničnom lizatu dodaje se  $1,5\ \mu\text{l}$  otopine RNAse A (RNase A Solution) na  $37^{\circ}\text{C}$  kroz 15 min, čime se uklanja zaostala RNA. Nakon inkubacije smjesa se brzo ohladi na ledu, te se u hladnu otopinu dodaje 1 ml otopine za taloženje proteina (Protein Precipitation Solution). Uklanjanje proteina olakšano je miješanjem smjese na vibracijskoj miješalici pri najvećoj brzini 20 sekundi, nakon čega slijedi centrifugiranje 5 minuta na  $2000 \times g$  da bi došlo do taloženja proteina. Supernatant koji sadži DNA odlije se u čistu epruvetu od 15 ml u kojoj se nalazi 3 ml hladnog izopropanola (2-Propanol,  $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich). Epruveta se oprezno okrene nekoliko puta da bi se pospješilo formiranje vidljivih fragmenta DNA. Prikupljanje izolirane DNA omogućeno je centrifugiranjem 3 min na  $2000 \times g$  (DNA je vidljiva u obliku malog bijelog taloga na dnu epruvete). Supernatant se odlije te se DNA ispere s 3 ml  $70\%$  etanola (Etanol,  $96\%$ , Kemika). DNA se taloži centrifugiranjem 3 min na  $2000 \times g$  nakon čega se supernatant pažljivo ukloni. Istaložena DNA suši se na sobnoj temperaturi 5-10 min, a potom se resuspendira dodatkom  $300\ \mu\text{l}$  puferske otopine (DNA Hydration Solution). Prema potrebi moguće je inkubirati uzorke 1 sat na  $65^{\circ}\text{C}$  da bi se DNA potpuno otopila.

#### 4.3.1. Provjera čistoće i koncentracije izolirane DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određuje se apsorpcijskom metodom na 2100 Bioanalyzer sistemu (Agilent Technologies) uz softverski paket 2100 Expert Software (Agilent Technologies). Koncentracija DNA određuje se na temelju apsorpcijske vrijednosti na  $260\ \text{nm}$  valne duljine, a izražava se  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Čistoća DNA procjenjuje se na temelju omjera valnih duljina  $260/280$  (DNA/proteini) koji za čistu DNA iznosi  $\sim 1,8$ , te omjera  $260/230$  (DNA/soli) koji iznosi  $2,0-2,2$ .

#### 4.3.2. Provjera kvalitete DNA u agaroznom gelu

Provjera kvalitete izolirane DNA određuje se elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Ukratko: 2% agarozni gel u 1xTBE puferu (engl. Tris-borate-EDTA: 0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA, pH 8.0) zagrije se do vrenja. U gel ohlađen na 50°C dodaje se otopina etidijeva bromida do finalne koncentracije 10mg/ml. Uzorci DNA se pripremaju za gel dodavanjem pufera za nanošenje uzoraka (GelPilot DNA Loading Dye, 5x, Qiagen) koji u konačnici čini 1/5 volumena uzorka koji se nanosi na gel. Uz uzorke DNA na gel se nanosi i molekularni biljeg poznatih molekulskih masa (DNA Step Ladders, 50bp DNA Step Ladder, Promega). Elektroforeza se odvija pod stalnim naponom od 100V kroz 30 minuta, nakon čega se DNA vizualizira pomoću UV-transiluminatora.

#### 4.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

MLPA analiza provedena je kod ispitanika iz obje skupine s urednim nalazom GTG pruganja, te u specifičnim slučajevima na temelju evaluacije medicinske dokumentacije primjenjeni su specifični setovi MLPA proba prema sljedećem algoritmu:

1. Ženske ispitanice s kliničkom slikom sindroma Rett: MLPA skrining MECP2 i CDKL5 gena.
2. Muški ispitanici s RIP-om i nejasnim fenotipom: MLPA skrining za poznate XMR/XID gene.
3. Muški ispitanici s kliničkom slikom sindroma FRAX: MLPA analiza FMR1 i AFF2 gena
4. Ispitanici s kliničkom slikom Prader-Willi ili Angelman sindroma: MLPA skrining PWS/AS kromosomske regije.
5. Ispitanici s kliničkom slikom Angelman sindrom i normalnim nalazom pod (4): MLPA analiza UBE3A gena.
6. Ispitanici s indikacijom za specifične mikrolelecijske sindrome: primjena MLPA setova proba za mikrolelecijske sindrome.
7. Kod svih negativnih slučajeva nakon (1)-(6): MLPA analiza subtelomera.
8. Kod svih negativnih slučajeva nakon (1)-(5) i pod (7): MLPA analiza za klasične i nove mikrolelecijske sindrome.
9. Kod ispitanika s ASD-om i ispitanika s RIP-om i elementima autističnog ponašanja primjena MLPA set proba za ASD.
10. Kod negativnih slučajeva (9) primjena seta proba za PWS/AS kromosomsku regiju.

Kod ispitanika kod kojih su aberacije detektirane GTG analizom prema potrebi primjenjeni su specifični setovi MPLA proba radi detaljne karakterizacije detektiranih aberacija.

#### 4.4.1. MLPA za detekciju promjena broja kopija

Tehnika MLPA za detekciju delecija i duplikacija omogućava izvođenje eksperimenata standardnim protokolom bez obzira na set MLPA proba (SALSA MLPA Probemix) koji se primjenjuje.

**Hibridizacija MLPA proba.** Za svaku pojedinu MLPA reakciju potrebno je 100 ng DNA u 5 µl 1 X TE-pufera (TE Buffer, 1X, Molecular Biology Grade, Promega). U slučaju analize velikog broja uzoraka koriste se stripovi od 8 tubica volumena 0,2 mL s pričvršćenim poklopcima (0,2 mL PCR Tube Strips, Fisherbrand). Uzorci se denaturiraju na 98°C kroz 5 minuta te se ohlade na sobnu temperaturu. U ohlađene uzorke dodaje se 3 µl hibridizacijskog master mix-a (hibridizacijski master mix/po reakciji: 1,5 µl MLPA pufera + 1,5 µl MLPA seta proba), nakon čega slijedi kratka denaturacija na 95°C/1 minuta, a potom hibridizacija uzoraka i proba na 60°C kroz 16 sati.

**Ligacija MLPA proba.** Nakon hibridizacije slijedi ligacija (spajanje) dva dijela MLPA probe koja je moguća ukoliko oba dijela hibridiziraju na ciljane sekvence punom dužinom, tj. ako odgovaraju ciljanim DNA sekvencama u svim nukleotidima. Uzorke se ohladi na 54°C te se u svaki uzorak doda 32 µl ligacijskog master mix-a (ligacijski master mix/po reakciji: 25 µl UltraPure H<sub>2</sub>O + 3 µl Ligase Buffer A + 3 µl Ligase Buffer B + 1 µl Ligase-65 enzima). Reakcija ligacije proba odvija se na 54°C kroz 15 minuta, nakon čega slijedi inaktivacija enzima grijanjem na 95°C kroz 5 minuta. Uzorci se zatim hlade na 20°C.

**Amplifikacija MLPA proba.** MLPA probe koje su uspješno spojene reakcijom ligacije umnažaju se lančanom reakcijom polimeraze (engl. polimerase chain reaction – PCR) uz samo jedan par primera (početnica). Za PCR reakciju u nove PCR tubice u kojima se nalazi 30 µl hladnog PCR pufer mix-a (PCR pufer mix/po reakciji: 4 µl SALSA PCR buffer + 26 µl UltraPure H<sub>2</sub>O) dodaje se 10 µl MLPA ligacijske reakcije iz prethodnog koraka. Držeći reakcijsku smjesu na hladnom dodaje se potom 10 µl master mix-a koji sadrži enzim polimerazu, primere te nukleotide (polymerase master mix/po reakciji: 7.5 µl dH<sub>2</sub>O + 2 µl SALSA PCR primer mix + 0.5 µl SALSA Polymerase). PCR reakciju potrebno je započeti odmah nakon dodavanja master mix-a. PCR-a reakcija odvija se pod sljedećim uvjetima: 1. denaturacija 95°C/30 sekundi, sparivanje primera (annealing) 60°C/30 sekundi, te sinteza (elongation) 72°C/60 seconds X 35 ciklusa; 2. završna sinteza 72°C/20 minutes; 3. hlađenje uzoraka na 15°C.

#### 4.4.2. Metilacijsko specifični MLPA – MS-MLPA

Metilacijsko specifični MLPA setovi proba primjenjeni su kod ispitanika s kliničkom slikom Prader-Willi ili Angelman sindroma i kliničkom slikom sindroma FRAX.

Metilacijsko specifična MLPA tehnika omogućava istodobnu detekciju promjene u broju kopija i metilacijsko profiliranje.

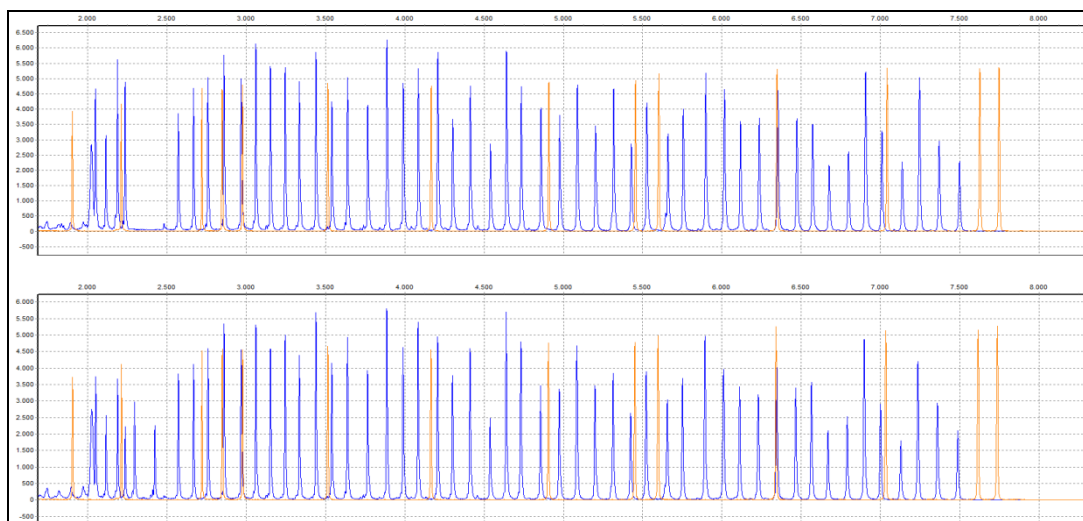
**Hibridizacija MLPA proba.** Standardni postupak hibridizacije opisan u prethodnom poglavlju primjenjuje se i u MS-MLPA tehnici kao prvi korak.

**Ligacija i digestija MLPA proba.** Nakon hibridizacije uzorke se ohladi na 20°C te se na sobnoj temperaturi u svaki uzorak dodaje 3 µl Ligase buffer A i 10 µl UltraPure H<sub>2</sub>O. Cijeli uzorak se podjeli na dva jednaka djela tako da se 10 µl prenese u nove tubice. U jedan dio uzorka se dodaje 10 µl Ligase-65 master mix (Ligase-65 master mix/po reakciji: 8.25 µl dH<sub>2</sub>O + 1.5 µl Ligase buffer B + 0.25 µl Ligase-65 enzyme), dok se u drugi dio uzorka dodaje 10 µl Ligase-Digestion master mix (Ligase-Digestion master mix/po reakciji: 7.75 µl dH<sub>2</sub>O + 1.5 µl Ligase buffer B + 0.25 µl Ligase-65 enzyme + 0.5 µl HhaI enzyme (Promega, 10 units/µl)). U prvom dijelu uzorka odvija se reakcija ligacije, dok se u drugom dijelu uzorka uz ligaciju istodobno odvija reakcija digestije. Uzorci se inkubiraju 30 minuta na 48°C, nakon čega slijedi inaktivacija enzima grijanjem na 98°C/5 minuta. Uzorci se potom ohlade na 20°C.

**Amplifikacija MLPA proba.** PCR amplifikacija MLPA proba slijedi princip protokol opisan u prethodnom poglavlju, ali se amplifikacija MLPA proba ligacijske i ligacijsko-digestijske reakcije odvijaju odvojeno/u odvojenim PCR tubicama. Ukratko, u nove PCR tubice u kojima se nalazi 30 µl hladnog PCR pufer mix-a (PCR pufer mix/po reakciji: 4 µl SALSA PCR buffer + 26 µl UltraPure H<sub>2</sub>O) dodaje se 10 µl MLPA ligacijske odnosno ligacijsko-digestijske reakcije iz prethodnog koraka. Držeći reakcijsku smjesu na hladnom u nju se doda 5 µl master mix-a koji sadrži enzim polimerazu, primere te nukleotide (polymerase master mix/po reakciji: 3,75 µl dH<sub>2</sub>O + 1 µl SALSA PCR primer mix + 0,25 µl SALSA Polymerase). Reakciju PCR-a potrebno je započeti odmah nakon dodavanja master mix-a. PCR-a reakcija odvija se pod istim uvjetima opisanim u prethodnom poglavlju (1. 95°C/30 sekundi, 60°C/30 sekundi, 72°C/60 sekundi X 35 ciklusa; 2. 72°C/20 minuta; 3. hlađenje uzoraka na 15°C.)

#### **4.4.3. Detekcija MLPA proba**

Svi setovi MLPA proba (MLPA i MS-MLPA) detektiraju se u sustavu kapilarne elektroforeze. Primeri mogu biti obilježeni različitim fluorescentnim bojama ovisno o uređaju koji se koristi za razdvajanje i detekciju MLPA proba. FAM obilježeni primeri koriste se kod detekcije MLPA proba sustavom 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uzorci za kapilarnu elektroforezu pripremaju se na sljedeći način: 9 µl HiDi formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) + 0,3 µl LIZ-500 standarda (GeneScan 500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) + 0,7 µl PCR produkta. Ovako pripremljeni uzorci denaturiraju se na 94°C kroz 2 minute nakon čega se inkubiraju 5 minuta na 4 °C. Softverski paket GeneMapper (Applied Biosystems) koristi se za prikupljanje podataka elektroforeze. Kako su produkti hibridizacije i umnažanja MLPA proba različite dužine (64-500 nukleotida), moguće je na temelju dužine PCR produkta razlikovati pojedine MLPA probe, a na temelju intenziteta fluorescentnog signala svake probe utvrditi količinu PCR produkta tj. utvrditi količinu svake pojedine probe. Na slici 8. prikazan je standardni elektroforegram, profil MLPA proba i LIZ-500 standarda, dobiven kapilarnom elektroforezom SALSA MLPA P036 Human Telomere-3 probemix-a.



Slika 8. Elektroforeogram ženske (gornja slika) i muške (donja slika) osobe (SALSA MLPA P036 Human Telomere-3 probemix)

#### 4.4.4. Analiza MLPA podataka

Prema preporukama svaki pojedinačni uzorak analizira se uz 3 kontrolna uzorka. U slučaju analize velikog broja uzoraka (više od 21) dodaje se 1 dodatni referentni uzorak za svakih dodatnih 7 testnih uzoraka.

Prvi korak u analizi podataka je vizualna provjera elektroforegram kojom je moguće utvrditi kvalitetu MLPA reakcije. Postupak analize softverskim paketom GeneMarker V 1,95 (SoftGenetics, USA) u prvom dijelu uključuje dimenzioniranje, filtriranje i normalizaciju podataka, nakon čega slijedi određivanje broja kopija te analiza metilacijskog statusa.

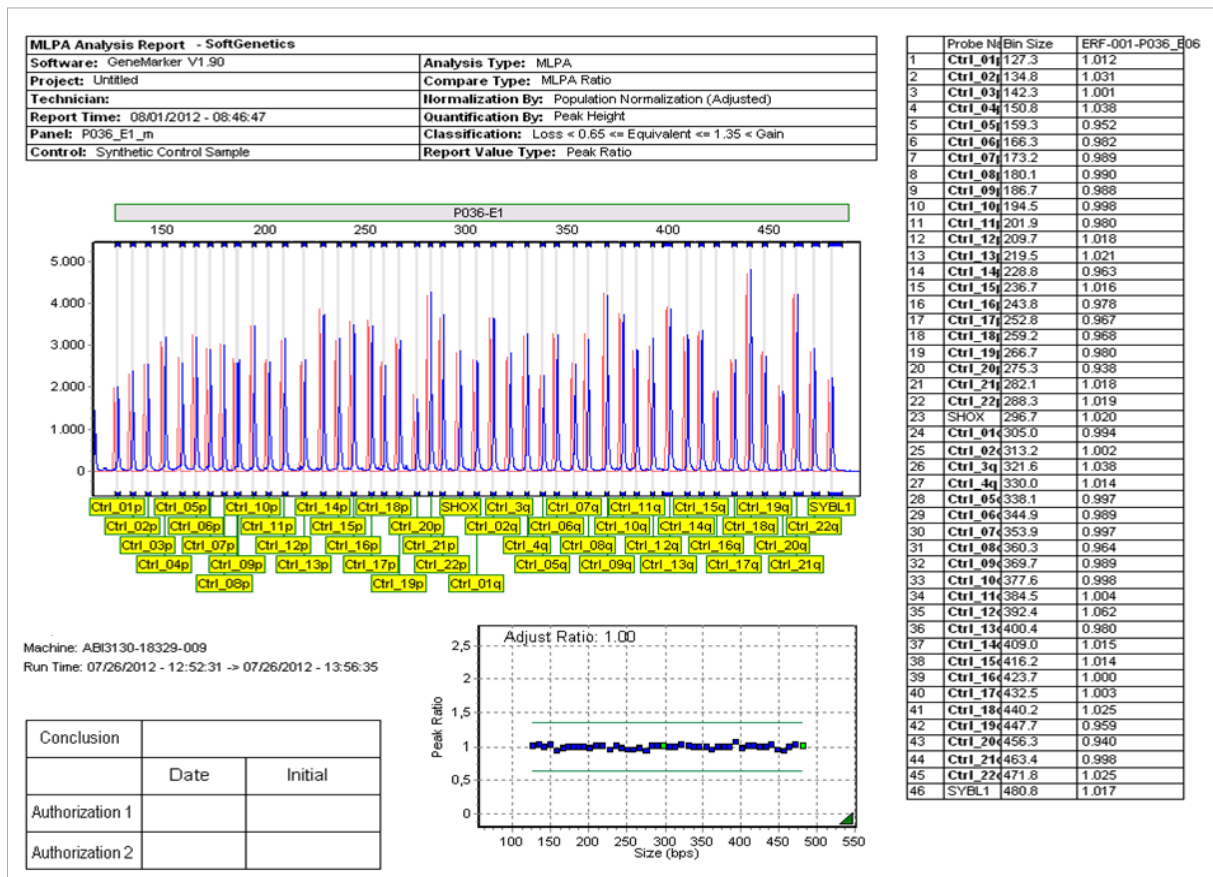
Dimenzioniranja (engl. sizing) je određivanje dužine pojedinih fragmenta/proba uz pomoć LIZ-500 standarda koji sadrži fragmente točno određene dužine (16 jednolančanih fragmenta dužine od 35-500 baza). Standardne postavke softverskog paketa kroz filtriranje omogućuju detekciju uzoraka koji ne zadovoljavaju parametre kvalitete. Zbog varijabilnosti PCR tehnike (veća učinkovit amplifikacije kraćih fragmenta, te moguće varijabilnosti među samim uzorcima) prije same analize potrebno je napraviti normalizaciju podataka. Standardna metoda normalizacije koja se koristi za MLPA podatke u softverskom paketu GeneMarker je populacijska normalizacija (engl. Population Normalization). Populacijska metoda normalizacije koristi sve probe u uzorku za ispravljanje preferencijalnog učinaka amplifikacije. Medijani intenziteta proba su izvedeni iz prvih devet točaka u elektroforegram, a zatim se isto računa za probe 2-10, 3-11, itd., kako bi se utvrdilo lokalne medijane intenziteta. Ovaj filter mediana smanjuje razlike u maksimalnim intenzitetima među probama. Svi medijani intenziteta koriste se kako bi odgovarali eksponencijalnoj funkciji.

#### 4.4.4.1 Analiza broja kopija – MLPA

Određivanje promjena u broju kopija temelji se na usporedbi intenziteta signala proba. Visina proba u elektroforeogramu ovisna je o broju kopija određene sekvence koja je prisutna u reakciji. Visina proba dobivenih u uzorku uspoređuje se s visinom odgovarajućih proba u kontrolama, te se na taj način izračunava MLPA omjer. U slučaju kada je MLPA omjer manji od 0,65 tada je riječ o deleciji, dok MLPA omjer viši od 1,35 odgovara duplikaciji. U tablici 2 prikazane su vrijednosti MLPA omjera u odnosu na CNV status. Na slici 9. prikazan je normalan rezultat analize dobivene s SALSA MLPA P036 Human Telomere-3 probemix-om.

Tablica 2. Odnos vrijednosti MLPA omjera u odnosu na broj kopija (CNV)

CNV status	MLPA omjer
Normalan broj kopija	0,85-1,15
Heterozigotna duplikacija	1,35-1,55
Triplikacija	1,70-2,20
Heterozigotna delecija	0,35-0,65
Homozigotna delecija	0



Slika 9. Normalan rezultat MLPA analize (SALSA MLPA P036 Human Telomere-3 probemix)

#### 4.4.4.2. Metilacijsko profiliranje – MS-MLPA

U metilacijskom testu prvi dio analize odnosi se na utvrđivanje broja kopija opisan u prethodnom poglavlju gdje se za ligacijski dio uzorka računa MLPA omjer. Za drugi dio analize koriste se podatci dobiveni ligacijsko-digestijskom reakcijom. Metilacijski profil utvrđuje se usporedbom visine proba dobivenih u ligacijsko-digestijskoj reakciji s visinom proba u ligacijskoj reakciji istog uzorka. Metilacijskim profiliranjem moguće je odrediti genomski imprinting te metilaciju promotora gena.

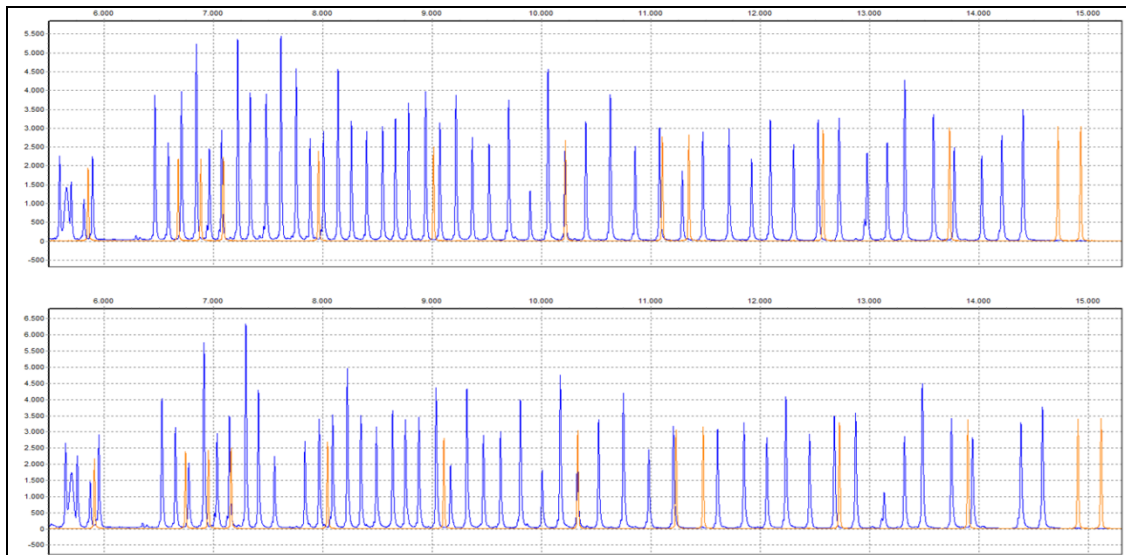
Svaki MS-MLPA set za određivanje **genomskog imprintiga** sadrži probe koje su tako dizajnirane da pokrivaju genske lokacije za koje je poznato da nose metilacijske modifikacije (jedna kopija je metilirana u uzorcima periferne krvi). Uz te probe svaki kit sadrži kontrolne probe za koje je poznato da se nalaze na mjestima na kojima ne postoji metilacijska modifikacije (u uzorcima periferne krvi).

Omjeri ligacijsko-digestijske/ligacijske reakcije za metilacijske probe u MS-MLPA kitu za određivanje genomskog imprinta nalaze se u tablici 3.

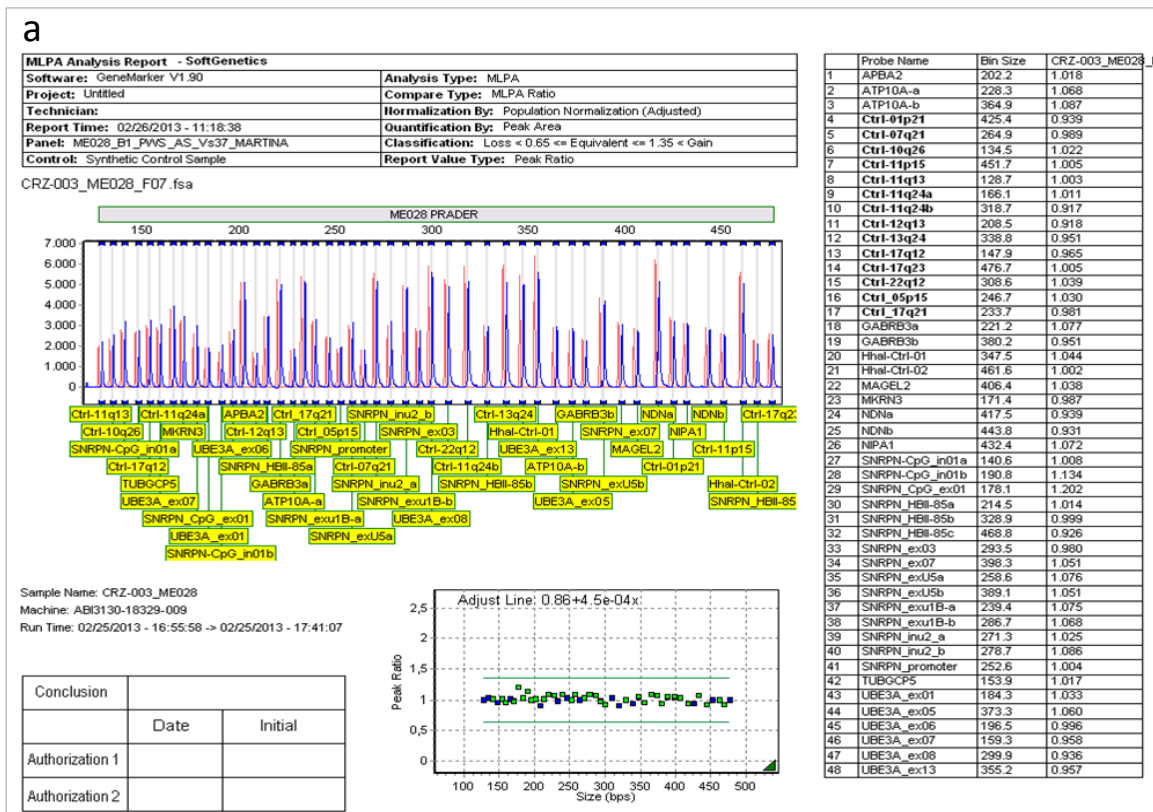
Tablica 3. Odnos ligacijsko-digestijske/ligacijske reakcije za metilacijske probe u MS-MLPA kitu

Metilacijski status kopija gena	Omjer ligacijsko-digestijske /ligacijske reakcije
Dvije metilirane kopije	$2/2 = 1$
Jedna metilirana i jedna nemetilirana	$1/2 = 0,5$
Dvije nemetilirane kopije	$0/2 = 0$

Na slici 10. prikazan je standardni elektroforegram, profil MLPA proba i LIZ-500 standarda, dobiven kapilarnom elektroforezom SALSA MLPA ME028 Prader Willi/Angelman probemix-a. Slika 11. prikazuje normalan rezultat analize upotrebom SALSA MLPA ME028 Prader Willi/Angelman probemix-a.

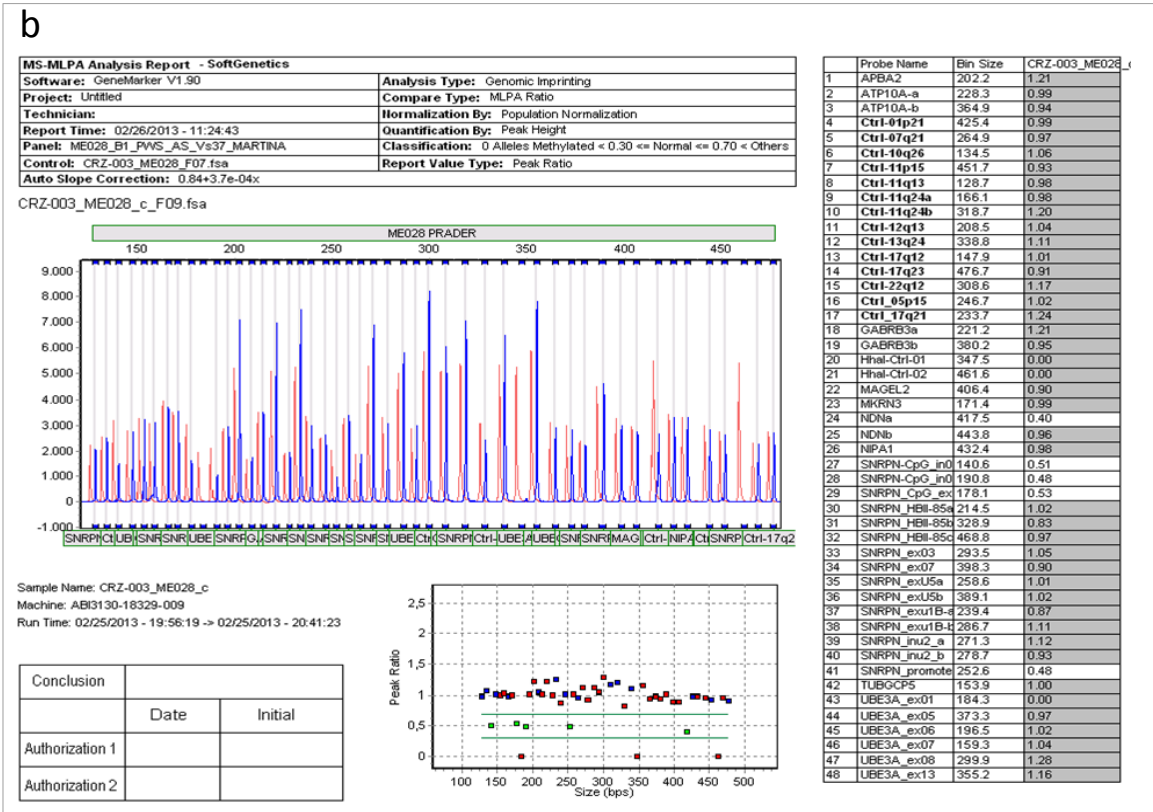


Slika 10. Elektroforeogram SALSA MLPA ME028 Prader Willi/Angelman probemix-a. Gornja slika prikazuje produkte ligacijske reakcije, donja slika prikazuje produkte ligacijsko digestijske reakcije.



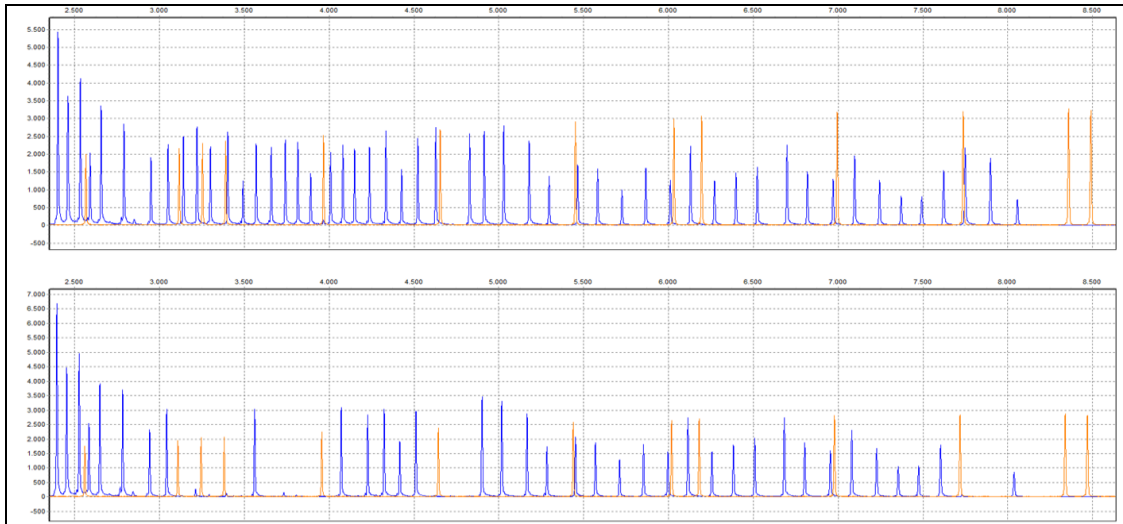
Slika 11a. Normalan rezultat analize broja kopija (SALSA MLPA ME028 Prader Willi/Angelman probemix).



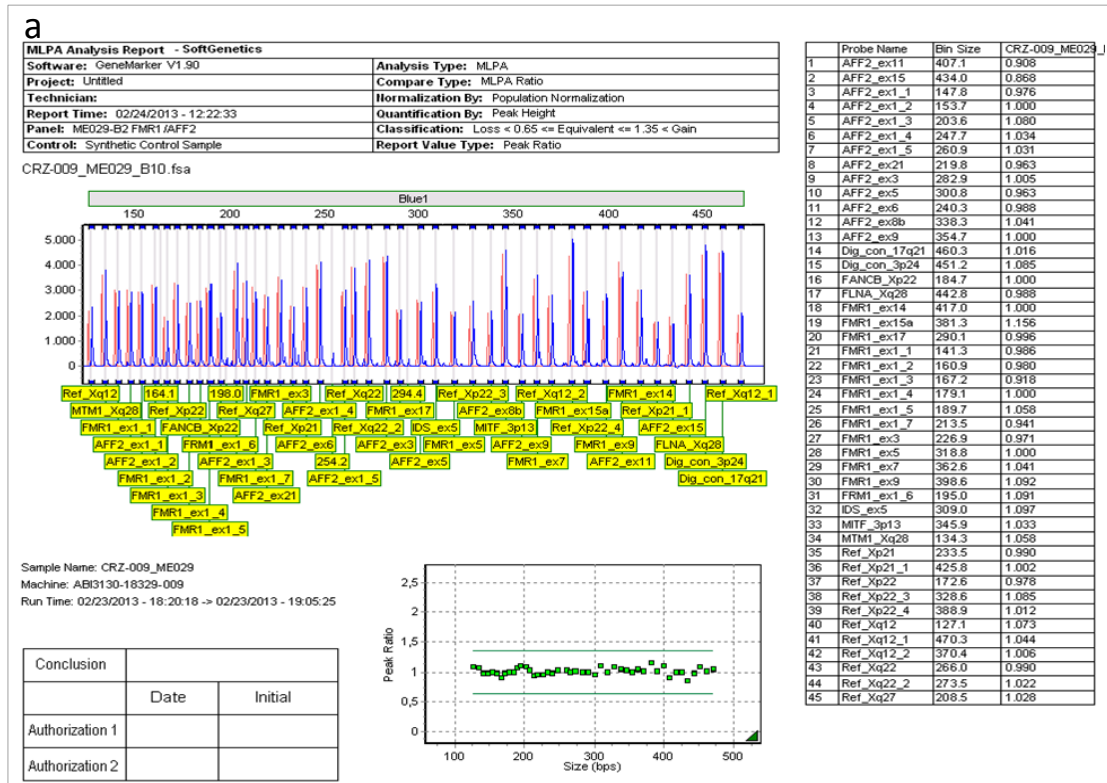


Slika 11b. Normalan rezultat metilacijskog statusa NDN i SNRPN gena(SALSA MLPA ME028 Prader Willi/Angelman probemix).

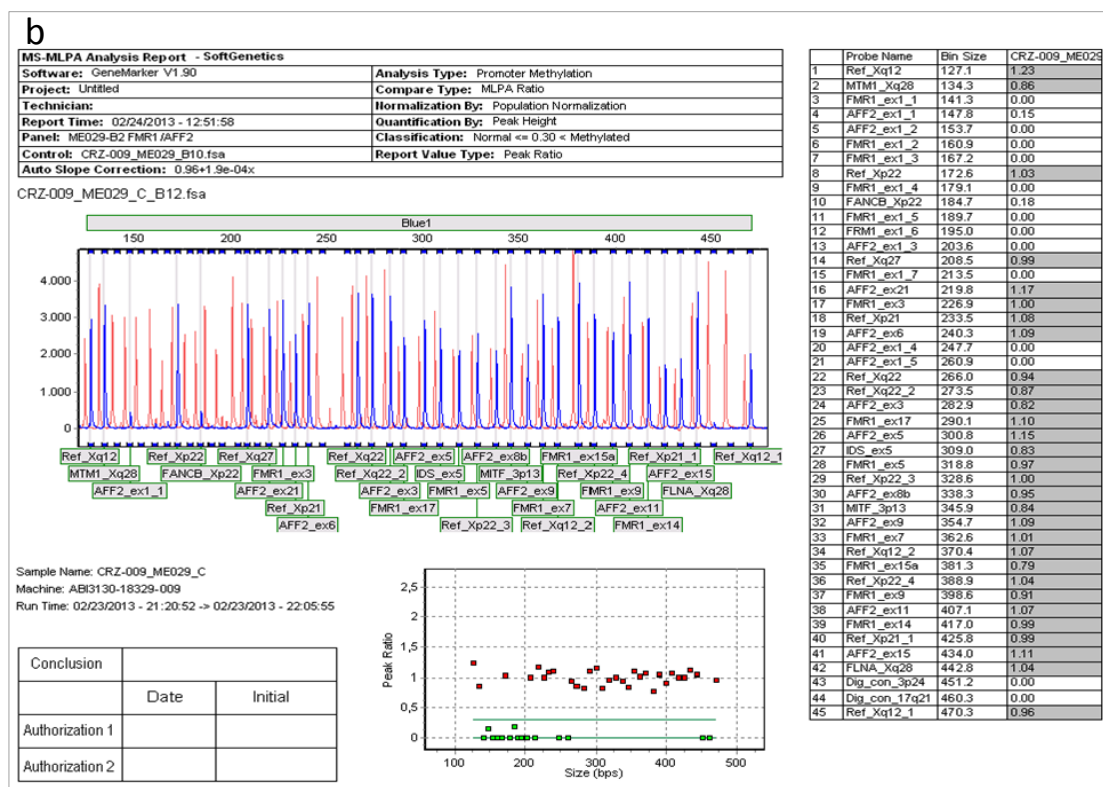
Setovi MS-MLPA proba za određivanje **metilacijskog statusa promotora gena** sadrže probe koje se nalaze unutar promotora gena. Promotori aktivnih gena ne sadrže metilacijske modifikacije, te je omjer ligacijsko-digestijske/ligacijske reakcije za takve gene 0; dok je omjer ligacijsko-digestijske/ligacijske reakcije za gene čiji promotori nose metilacijske modifikacije 1. MS-MLPA setovi za određivanje metilacijskog statusa promotora također sadrže kontrolne probe. Na slici 12. prikazan je standardni elektroforegram, profil MLPA proba i LIZ-500 standarda, dobiven kapilarnom elektroforezom SALSA MLPA ME029 FMR1/AFF2 probemix-a. Slika 13. prikazuje normalan rezultat analize upotrebom SALSA MLPA ME029 FMR1/AFF2 probemix-a.



Slika 12. Elektroforeogram SALS MLPA ME029 FMR1/AFF2 probemix-a. Gornja slika prikazuje produkte ligacijske reakcije, donja slika prikazuje produkte ligacijsko digestijske reakcije.



Slika 13a. Normalni rezultat analize broja kopija (SALS MLPA ME029 FMR1/AFF2 probemix).



Slika 13b. Normalni metilacijski status promotora FMR1 i AFF2 gena (SALSA MLPA ME029 FMR1/AFF2 probemix).

#### 4.5. Setovi MLPA i MS-MLPA proba

Svi setovi MLPA i MS-MLPA proba sadrže 9 proba/fragmenata dužine od 64 do 105 nukleotida koje omogućavaju analizu kvalitete MLPA reakcije. Proba dužine 92 nukleotida (92 nt benchmark probe) je normalna proba koja omogućava usporedbu ostalih kontrolnih proba. Fragmenti dužine 64, 70, 76, 82 nukleotida (Q-fragments) vidljivi su samo u slučaju nedovoljne količine DNA po reakciji ili neuspješne ligacije. Fragmenti dužine 88 i 96 nukleotida (Q-fragments) vidljivi su u slučaju nepotpune denaturacije uzoraka. Fragmenti dužine 100 i 105 nukleotida (X and Y fragments) su spolno specifični (100 – X specifična proba, 105 – Y specifična proba). Uz navedene fragmente za analizu kvalitete reakcije svaki MLPA i MS-MLPA set sadrži probe specifične za određene kromosomske regije/gene različitih dužina.

**Setovi MLPA proba za detekciju promjena u broju kopija korišteni u istraživanju**  
(kompletan popis proba nalazi se u Prilogu)

1. **SALSA MLPA P036 Human Telomere-3 probemix** i **SALSA MLPA P070 Human Telomere-5 probemix** sadrže probe za sve subtelermerne regije. Za akrocentrične kromosome 13, 14, 15, 21 i 22 ne postoje probe za p krak. Umjesto toga u kit su uključene probe na q kraku blizu centromere. *Primjena: subtelermerne skrining.* (Prilog 1. I 2.)

2. **SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes-1 probemix** sadrži probe za: 1p36 delecijski sindrom, 2p16 mikrodelecija, 2q23 mikrodelecija/MBD5, 2q33 mikrodelecija/ SATB2, 3q29 mikrodelecija, 9q22.3 mikrodelecija, 15q24 delecijski sindrom, 17q21 mikrodelecija, 22q13/Phelan-McDermid sindrom, 5p15 Cri du Chat sindrom, 22q11 DiGeorge sindrom, Distal 22q11 regija, 10p14 DiGeorge regija 2, 8q Langer-Giedion sindrom, 17p Miller-Dieker sindrom, NF1 mikrodelecijski sindrom, Prader-Willi/Angelman sindrom, MECP2/Xq28 duplikacija, Rubinstein-Taybi sindrom, Smith-Magenis sindrom, 5q35.3 Sotos sindrom, Williams sindrom, 4p16.3 Wolf-Hirschhorn sindrom. Primjena: mikrodelecijski sindromi. (Prilog 3. i 4.)
3. **SALSA MLPA P297 Microdeletion Syndromes-2 probemix** sadrži probe za: 1q21.1–TAR sindrom, 1q21.1–ne-TAR sindrom, 3q29 mikrodelecija, 7q36.1 mikrodelecija, (CNTNAP2 gene), 12p11.23 mikrodelecija, 15q13 mikrodelecija, 15q24.1 mikrodelecija (PML gen), 16p11 mikrodelecija, 17q12 mikrodelecija, 18q21.2 mikrodelecija (TCF4 gen), 20p12.2 mikrodelecija (PAK7 gene). Primjena: mikrodelecijski sindromi. (Prilog 5.)
4. **SALSA MLPA P015 MECP2 probemix** sadrži probe za MECP2, CDKL5, ARX i NTNG1 gene. Primjena: Rett sindrom. (Prilog 6.)
5. **SALSA MLPA P189 CDKL5 probemix** sadrži probe za ARX, NTNG1, FOXP1 i CDKL5 gene. Primjena: atipični Rett sindrom. (Prilog 7.)
6. **SALSA MLPA P106 MRX probemix** sadrži probe za 16 MRX gena: RPS6KA3, ARX, IL1RAPL1, TSPAN7, PQBP1, HUWE1, OPHN1, ACSL4, PAK3, DCX, AGTR2, ARHGEF6, FMR1, AFF2 (FMR2), SLC6A8 i GDI1. Primjena: nesindromski X vezani RIP. (Prilog 8.)
7. **SALSA MLPA P343 Autism-1 probemix** sadrži probe za tri kromosomske regije: 15q11-q13 (UBE3A, GABRB3 gene, te 15q13 mikrodelecijaska regija s CHRNA7 genom), 16p11 mikrodelecijaska regija te SHANK3 gen na 22q13. Primjena: poremećaji autističnog spektra. (Prilog 9.)
8. **SALSA MLPA P080 Craniofacial probemix** sadrži probe za FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, MSX2, ALX1, ALX3, ALX4, EFN1 i RUNX2 gene. Primjena: kraniofacijalni poremećaji. (Prilog 10.)
9. **SALSA MLPA P313 CREBBP probemix** sadrži probe za CREBBP gen, te probe za EP300 gen. Primjena: Rubinstein-Taybi sindrom. (Prilog 11.)
10. **SALSA MLPA probemix P336 UBE3A** sadrži probe za UBE3A, GABRB3 i MTHFR gene, te probu specifičnu za MTHFR A222V mutaciju. Također se u kitu nalaze probe za 16p13 kromosomsku regiju (AXIN1, CREBBP i TSC2 gene). Primjena: Angelman sindrom. (Prilog 12.)

### **Setovi Metilacijsko specifičnih MLPA proba korišteni u istraživanju**

*(kompletan popis proba nalazi se u Prilogu)*

1. **SALSA MS-MLPA probemix ME028-B2 PRADER-WILLI/ANGELMAN** sadrži 32 probe specifične za PWS/AS kritičnu regiju (15q11) koje služe za određivanje promjena u broju kopija DNA. Od ukupnog broja proba, pet proba je specifično za imprint regiju. Unutar tih

proba nalaze se restrikcijska mjesta za HhaI enzim, što omogućava metilacijsko profiliranje. Primjena: Prader-Willi i Angelman sindrom. (Prilog 13.)

2. **SALSA MS-MLPA probemix ME029-B2 FMR1/AFF2** sadrži 27 probu specifičnu za FMR1 i AFF2 gene. Također od ukupnog broja proba, deset proba sadrži restrikcijska mjesta za HhaI enzim. Takve probe daju informaciju o metilacijskom statusu sekvence. Primjena: Sindrom fragilnog X kromosoma. (Prilog 14.)

#### 4.6. Fluorescentna in situ hibridizacija

Kod ispitanika kod kojih su aberacije detektirane GTG i MLPA analizama precizna molekularna karakterizacija učinjena je FISH tehnikama.

Standardan protokol FISH tehnike obuhvaća pripremu preparata i proba, denaturaciju preparata i proba, hibridizaciju proba na preparate, pranje preparata i detekciju proba te analiziranje preparata.

**Priprema i denaturacija citogenetskih preparata.** Citogenetski preparati se za potrebe FISH-a inkubiraju 5 minuta u 0,005 % otopini pepsina/10 mM HCl na 37°C nakon čega slijedi inkubacija u 1XPBS otopini kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na neosušene preparate dodaje se 100 µl 1 % otopine formaldehida/1XPBS/20 mM MgCl<sub>2</sub>, preparati se pokrivaju pokrovnica te inkubiraju na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon 10 minuta preparati bez pokrovnica inkubiraju se u 1XPBS otopini kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Preparati se zatim dehidriraju u 70 %, 95 % i 100 % etanolu kroz 3 minute u svakoj koncentraciji nakon čega se osuše na zraku. Osušeni preparati stavljaju se na grijanu ploču (73 °C) te se na njih dodaje 100 µl 70% formamid/2 x SSC, pH 7.0. Preparati se pokriju pokrovnica i inkubiraju 3 min nakon čega se bez pokrovnica stavljaju u ohlađeni 70% etanol (-20 °C) i inkubiraju daljnje 3 minute. Preparati se dalje dehidriraju u 95% i 100% etanolu kroz 3 minute po koncentraciji i osuše na zraku pri sobnoj temperaturi.

**Priprema i denaturacija komercijalnih FISH proba.** Komercijalne FISH probe pripremaju se prema uputama proizvođača. U istraživanju su se koristili FISH probe tvrtke Abbott Molecular i Kreatech Diagnostics koje su direktno obilježene.

**Priprema i denaturacija samostalno izrađenih FISH proba.** Samostalno izrađene FISH probe mogu se direktno ili indirektno (potrebna je kasnija detekcija proba) obilježiti PCR tehnikom. Za direktno obilježavanje koriste se modificirani nukleotidi koji nose fluorokrome (TexasRed-dUTP, SpectrumGreen-dUTP, SpectrumOrange-dUTP te DY-415-aadURP – DEAC), dok se za indirektno obilježavanje koriste modificirani nukleotidi (Biotin-dUTP i Digoxigenin-dUTP) koji omogućuju vezanje fluorescentnih antitijela. U istraživanju je korištena DOP-PCR tehnika (Degenerate oligonucleotide-primed PCR) obilježavanja proba prema standardnom protokolu. Ukratko, u master mix (H<sub>2</sub>O, 10XPufer, DOP-primer, label-mix(dNTPs), MgCl<sub>2</sub> i AmpliTaq polimeraza) dodana je DNA odgovarajuće FISH probe te biotin-dUTP ili digoksigenin-dUTP odnosno TexasRed-dUTP ili SpectrumGreen-dUTP ili SpectrumOrange-dUTP ili DY-415-aadURP. Smjesa se zagrije na 94 °C 3 min nakon čega slijedi 30 ciklusa: 94 °C 1 min, 62 °C 1 min 30 sec, 72 °C 2 min 45sec, te inkubacija 10 min na 72 °C. Probe se zatim

ohlade na 4 °C. Standardna etanol precipitacija (70% etanol / 0,3M natri-acetat) korištena je za pročišćavanje obilježenih proba. Samostalno izrađene i obilježene probe denaturiraju se uz dodatak Cot-1 DNA (Roche) i hibridizacijskog pufera 20%DS/50%formamid/1M natrijfosfatnog pufera (DS, dekstransulfat, Sigma). Smjesa se prvo zagrije na 75 °C 5 min, zatim ohladi na 4 °C te inkubira na 37 °C kroz 30 minuta.

**Hibridizacija.** Gotove probe stavljaju se na denaturirane preparate te se pokrivaju pokrovnica koje se pričvrste tekućim ljepilom. Preparati se zatim stavljaju u vlažnu komoru u termostatu na 37 °C 12-16 sati.

**Pranje preparata s direktno obilježenim FISH probama.** Preparati na kojima su hibridizirane komercijalne i samostalno izrađene direktno obilježene probe pere se u prethodno zagrijanom 0,4XSSC-u na 63 °C 5 min, nakon čega slijedi ispiranje u 0,4XSSC/0,05%Tw (Tween 20, Sigma) 5 min na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Preparati se zatim kratko ispiru u destiliranoj vodi i dehidriraju u seriji etanola (70%, 95% i 100% – 3 min/koncentraciji). Nakon sušenja na sobnoj temperaturi na preparate se dodaje dvije do tri kapi DAPI-atifade otopine te se preparati pokriju pokrovnicom.

**Pranje preparata i detekcija indirektno obilježenih FISH proba.** Preparati s indirektno obilježenim probama peru se u prethodno zagrijanom 1XSSC-u na 68 °C 5 min, nakon čega slijedi ispiranje u 4XSSC/0,05%Tw 5 min na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi detekcija FISH proba. Probe obilježene biotinom detektiraju se sa streptavidin-FITC (1:250) i streptavidin-Cy5 (1,5:50), a digoxigenin obilježene probe detektiraju se s anti digoksigenin rhodamin (1:8-10) i anti digoksigenin fluorescein (1:8-10) fluorokromima obilježenim antitijelima. Fluorescentna antitijela razrjeđuju se prema navedenim omjerima u 4xSSC / 0,05%Tw / 0,4% Marvel otopini. Na mokre preparate stavlja se 100 µl antitijela koja se pokriju pokrovnicom. Preparati se inkubiraju u vlažnoj komori na 37°C 30 min. Nakon detekcije preparati bez pokrovnice peru se u 4XSSC / 0,05%Tw-u 5 min na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Preparati se zatim kratko ispiru s destiliranom vodom i denaturiraju kroz seriju etanola (70%, 95% i 100% – 3 min/koncentraciji). Nakon sušenja na sobnoj temperaturi na preparate se dodaje dvije do tri kapi DAPI-atifade otopine te se preparati pokriju pokrovnicom.

**Analiziranje FISH preparata.** Za vizualizaciju i analizu FISH proba koristi se epifluorescentni mikroskop povezan s digitalnom kamerom i softverskim paketom Isis Fluorescence Imaging System, MetaSystems.

#### 4.7. Sekvenciranje

Kod ispitanika kod kojih su MLPA skriningom detektirane aberacije unutar pojedinih gena provjera i potvrda rezultata učinjena je sekvenciranjem specifičnih genskih regija. Popis početnica korištenih u istraživanju nalazi se u tablici 4.

Za umnažanje odsječaka DNA za sekvenciranje korištena su dva PCR sustava LongAmp Taq PCR Kit i Q5 High-Fidelity PCR Kit (New England BioLabs). Početnice su dizajnirane prema preporukama svakog sustava uz program Primer designing tool, The National Center for

Biotechnology Information. Popis početnica dizajniran za istraživanje nalazi se u tablici 4. Reakcijska smjesa (pufer za PCR, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, lijeva i desna početnica, DNA, polimeraza i UltraPure H<sub>2</sub>O) za oba sustava pripravljena je prema preporukama proizvođača. PCR uvjeti (početna denaturacija, kratka denaturacija, sparivanje početnica s DNA, produljivanje lanca, te konačno proučavanje) postavljeni su prema preporukama proizvođača obzirom na korišteni sustav amplifikacije. Radi provjere uspješnosti umnažanja te određivanja veličine PCR produkata učinjena je elektroforeza uzoraka u 2% agaroznom gelu.

Sekvenciranje amplificiranih DNA segmenta učinjeno je u MacroGen Inc. kompaniji korištenjem Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer uz BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Za analizu podataka korišten je Mutation Surveyor softverski paket (SoftGenetics).

Tablica 4. Parovi početnica korišteni u istraživanju.

gen	početnica 1	početnica 2
<i>CHMP2A</i>	GGAAGTGACAGGAGTGTGAGTG	TCCTGTGTCCTTGATACCCTTG
<i>FGFR3</i>	CATTGGAGGCATCAAGGTGGG	TAACGTAGGGTGTGCCGTCC
<i>FGFR3</i>	CATGAGCTCCAACACACCACT	ATCCCTGACGGCCCTAAAC
<i>RUNX2</i>	GGCCACCAGATACCGCTTA	CACATCTCCTCTGGTAGCCC
<i>RUNX2</i>	TGAAGGTCTGTCTGTGGCTTG	GCAGGTAGGTGTGGTAGTGAG
<i>SATB2</i>	ATGACAGGTTTCTTGGGGT	CAGGAAGTGTCCCTCTGTAGC
<i>SNAP29</i>	AGAAGGAGTTTGGCACAGAGG	CCCTCACTTCTTGTCTCTCT
<i>MSX2</i>	TAACAACCTGCTGACTGCTCC	ATTTCCGACTTGACCGAGGC
<i>SEMA7A</i>	GCTTTGCTCAGACTCTCCAGAT	CCATGTCAGTGCAGGAAGTACTC
<i>GABRB3</i>	CTTCTGCCTCCAAGGTCATC	GTCTCCCTGCTTCTCTCTTGG

#### 4.8. Array komparativna genomska hibridizacija

Array komparativna genomska hibridizacija primijenjena je kod ispitanika iz obje skupine s urednim nalazom GTG, MLPA i FISH analiza. Kod ispitanika kod kojih su GTG i MLPA analizama utvrđene kromosomske aberacije array komparativna hibridizacija učinjena je radi detaljne molekularne karakterizacije detektiranih aberacija.

Protokol array komparativne genomske hibridizacije (aCGH) uključuje izolaciju i provjeru kvalitete DNA, fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA, hibridizaciju na array/čip, ispiranje čipa, skeniranje te analizu podataka. Postupak izolacije i provjere kvalitete DNA opisan je u prethodnim poglavljima. U istraživanju je korišten SurePrint G3 Human CGH Microarray, 4x180K Agilent čip prema uputama proizvođača (Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood, Cells, or Tissues (with a High Throughput option) Protocol Version 7.2).

**Fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA.** Fluorescentno obilježavanje testne i kontrolne DNA (Promega) odvija se odvojeno. Spol testne i kontrolne DNA za svaki je eksperiment usklađen. Ukratko na 1μg testne odnosno kontrolne DNA u 26 μl 1XTE (pH 8.0), Molecular grade, Promega) pufera dodaje se 5 μl Random Primer-a. Uzorci se inkubiraju na 98°C 10 min te se brzo ohlade na ledu. U testne uzorke stavlja se 19 μl Labeling Master Mix

koji sadrži Cyanine 5-dUTP, a u kontrolne DNA 19 µl Labeling Master Mix koji sadrži Cyanine 3-dUTP (Labeling Master Mix po uzorku: 10 µl 5× Reaction Buffer + 5 µl 10× dNTPs + 3 µl Cyanine 3-dUTP ili Cyanine 5-dUTP + 1 µl Exo (-) Klenow). Uzorci se inkubiraju 2 sata na 37°C, nakon čega se inkubiraju 65°C 10 minuta te ohlade na ledu. U uzorke se tada dodaje 430 µl 1XTE te se cijeli volumen prebacuje u odgovarajuće obilježene kolone za purifikaciju (Agilent Purification Column). Uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 14,000×g. Nakon centrifugiranja na uzroke se dodaje 480 µl 1XTE te se ponovno centrifugiraju 10 minuta na 14 000 g. Kolone se tada okrenu u čiste 2 ml tubice i centrifugiraju 1 minute na 1 000 g. Nakon centrifugiranja 1,5 µl uzorka se analizira na 2100 Bioanalyzer sistemu radi utvrđivanja prinosa reakcije obilježavanja, koji se računa prema standardnom protokolu.

**Hibridizacija uzoraka na array.** Za hibridizaciju uzorci se sparuju prema spolu i prinosu. Nakon spajanja testnih i kontrolnih DNA u uzorke se dodaje 5 µl Cot-1 DNA (1.0 mg/mL), 11 µl 10X aCGH Blocking Agent te 55 µl 2X HI-RPM Hybridization Buffer, te se inkubiraju 3 minute na 98 °C, a potom 30 minuta na 37 °C. Od svakog gotovog uzorka, 100 µL se nanosi na posebno polje „gasket slide-a“ čime se sprječava miješanje uzorka. Array se zatim položi aktivnom stranom na uzorke i pričvrsti u nosač.

**Pranje i skeniranje array-a.** Nakon hibridizacije array se izvadi iz nosača te se odvaja od „gasket slide-a“ dok je potpuno uronjen u Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1. Odvojeni array stavlja se na nosač za stakalca te se uranja u novi Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1, ispire 5 minuta na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga nosač se stavlja u prethodno zagrijani (37 °C) Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 gdje se array ispire 1 minutu na rotacijskoj miješalici. Zatim slijedi kratko ispiranje u acetonitrilu (Sigma-Aldrich), 10 sekundi na rotacijskoj miješalici pri sobnoj temperaturi, te 30 sekundi u Stabilization and Drying Solution (Agilent). Array se zatim stavlja u nosač za skeniranje, a na njega se stavlja Agilent Ozone-Barrier Slide Cover. Skeniranje array potrebno je učiniti neposredno nakon pranja. Za skeniranje array-a korišten je Agilent C Scanner uz standardne postavke: Dye channel: R+G (red and green), Scan region: Agilent HD (61 x 21.6 mm), Scan resolution: 3 µm, Tiff file dynamic range: 16 bit Red PMT gain: 100%, Green PMT gain: 100%, XDR: <No XDR>.

**Analiza podataka.** Provjera kvalitete aCGH eksperimenta temelji se na evaluaciji parametara dobivenim Feature Extraction softverskim paketom. Standardne postavke evaluacije kvalitete uključuju analizu parametara: BGNoise, Signal Intensity, Signal to Noise, Reproducibility i DLRSO za Cy3 i Cy5 fluorokrome zasebno. U tablici 5. prikazane su vrijednosti navedenih parametara. Na slici 14. prikazano je standardno izvješće o kvaliteti array eksperimenta (Quality Control report – QC report). Visoko kvalitetni podatci obrađeni su Agilent CytoGenomics softverom uz standardne postavke (Default Analysis Method - CGH v2). Na slici 14. prikazan je standardni citogenetski izvještaj Agilent CytoGenomics softvera.



Tablica 5. Vrijednosti evaluacijski parametara.

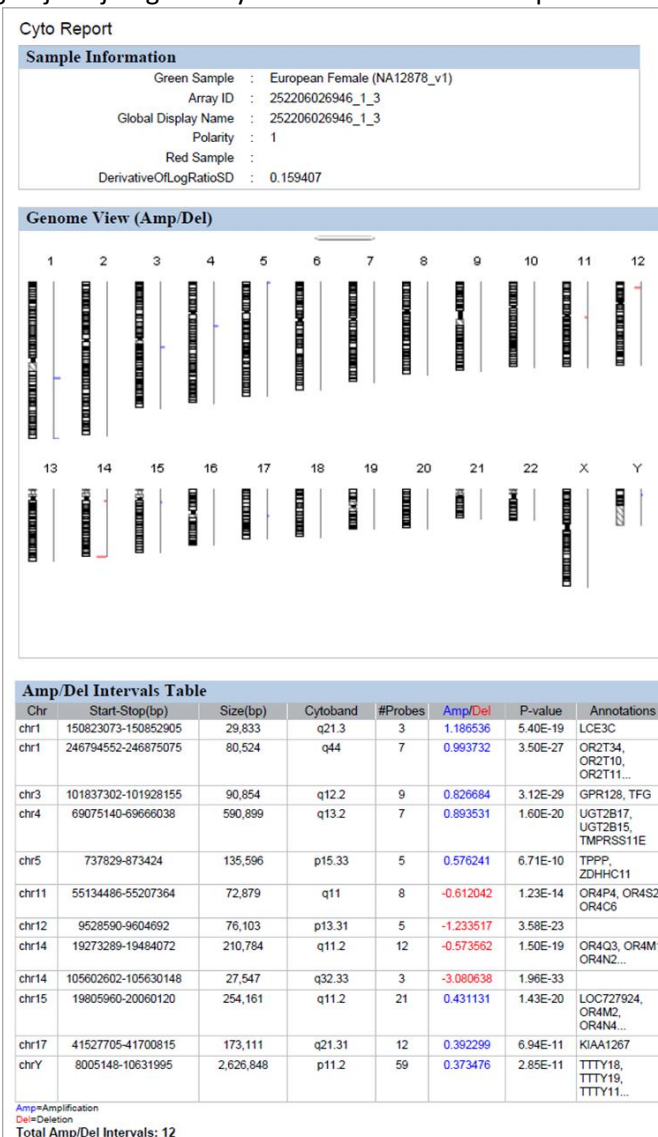
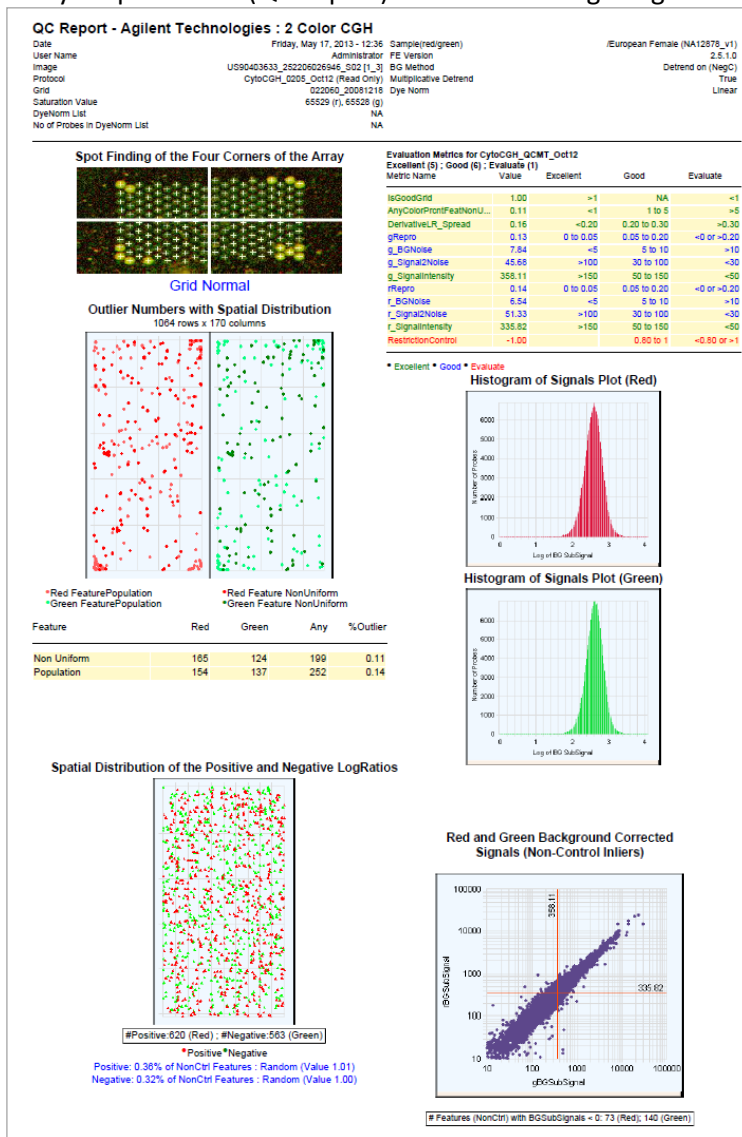
	Kvaliteta array-a		
	Izvrсна	Dobra	Prolazna
<i>BGNoise</i>	< 10	10 – 20	> 20
<i>Signal Intensity</i>	> 150	50 – 150	< 50
<i>Signal to Noise</i>	> 100	30 – 100	< 30
<i>Reproducibility</i>	< 0,05	0,05 – 0,2	> 0,2
<i>DLRSD</i>	< 0,2	0,2 – 0,3	> 0,3

Prema dobivenim kordinatama delecija i duplikacija pretražene su recentne bioinformatičke genomske baze podataka koristeći NCBI36, hg18 (UCSC Genome Browser, Ensembl Genome Browser, Gene Card, OMIM, NCBI Genome, Map Viewer, PubMed). Prema koordinatama kromosomskih regija detektiranih array analizom pretražene su bioinformatičke baze podataka s ciljem utvrđivanja gena za koje prema literaturnim podacima postoje podatci o ekspresiju u SŽS ili su njihove aberacije povezane s malformacijskim sindromima.

Prema dobivenim podacima aberacije su klasificirane u četiri kategorije:

- (i) patogene aberacija se one za koje postoje literaturni dokazi da varijacije u broju kopija DNA posljedično uzrokuju RIP i ASD (opisani mikrodelecijski i mikroduplikacijski sindromi);
- (ii) potencijalno patogene aberacije sadrže gene koji su bitni za razvoj SŽS, visoko su eksprimirani u mozgu ili su njihove aberacije povezane s razvojem malformacija, ali za sada nisu definirani mikrodelecijski/mikroduplikacijski sindromi ili postoje podatci o varijabilnom nasljeđivanju i/ili nepotpunoj penetraciji;
- (iii) nepoznate/nesigurne važnosti
  - aberacije koje sadrže gene za koje prema literaturnim podacima postoje indicacije o utjecaju na razvoj SŽS i malformacija, ali također postoje u bazama podataka varijanti utvrđenih u kontrolnim studijama (Database of Genomic Variants);
  - detekcija viškovka kromosomskih regija ili gena za koje su opisani mikrodelecijski sindromi, a u slučaju da nisu opisani mikroduplikacijski sindromi;
- (iv) benigne promjene u broju kopija kromosomskih segmenata prisutne su kao varijante utvrđene u općoj populaciji karakterizirane, te one nemaju utjecaj na fenotip.

Slika 14. Izvješće o kvaliteti array eksperimenta (QC Report). Dio standardnog citogenetskog izvještaja Agilent CytoGenomics softvera sa prikazom svih detektiranih aberacija.



## 5. Rezultati

Istraživanje je provedeno na ukupno 379 ispitanika. 355 ispitanika s dijagnozom RIP-a (141 ženska ispitanica i 214 muških ispitanika), te 24 ispitanika s dijagnozom ASD-a (4 ženske ispitanice i 20 muških ispitanika). Broj ispitanika, te prosječna starost po centrima prikazana je u tablici 6.

Tablica 6. Broj ispitanika i prosječna starost po centrima.

	Broj ispitanika			Dob ispitanika u godinama		
	ženske	muški	ukupno	najmlđi	najstariji	prosječna starost
<b>RIP</b>	<b>141</b>	<b>214</b>	<b>355</b>	<b>1</b>	<b>74</b>	<b>36</b>
<i>CRZ Stančić</i>	115	162	277	8	74	40
<i>CRZ Zagreb</i>	26	52	78	1	38	17
<b>ASD (CRZ ERF)</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>6</b>

U tablici 7 prikazan je ukupan broj manjkova i viškova broja kopija DNA detektiranih u istraživanju kroz obje skupine ispitanika.

Prikaz ukupnog broja analiza za GTG analizu i MLPA skrining nalazi se u Tablici 8a. Prikaz ukupnog broja analiza za GTG analizu, MLPA skrining i aCGH nalazi se u Tablici 8b.

Prikaz ukupnog broja analiza provedenih u centru Stančić za GTG analizu i MLPA skrining nalazi se u Tablici 9a. Prikaz ukupnog broja analiza provedenih u centru Stančić za GTG analizu, MLPA skrining i aCGH nalazi se u Tablici 9b.

Prikaz ukupnog broja analiza provedenih u centru Zagreb za GTG analizu i MLPA skrining nalazi se u Tablici 10a. Prikaz ukupnog broja analiza provedenih u centru Stančić za GTG analizu, MLPA skrining i aCGH nalazi se u Tablici 10b.

Prikaz ukupnog broja analiza provedenih u centru Zagreb za GTG analizu i MLPA skrining nalazi se u Tablici 11a. Prikaz ukupnog broja analiza provedenih u centru Stančić za GTG analizu, MLPA skrining i aCGH nalazi se u Tablici 11.

Tablica 7. Ukupni broj manjkova i viškova broja kopija DNA detektiranih u istraživanju.

<i>tehnika</i>		<i>manjak</i>	<i>višak</i>	<i>balansirani poremećaj</i>	<i>promjena metilacije</i>
<b>GTG</b>	RIP	10 (6+4*)	9 (5+4*)		
	ASD	1	1	1	
<b>MLPA</b>	RIP	21 (12 <sup>◦</sup> +8 <sup>◦◦</sup> +1 <sup>#</sup> )	16 (5 <sup>x</sup> +1 <sup>•</sup> +3 <sup>x</sup> +4 <sup>Δ</sup> +3 <sup>≡</sup> )		4 (1'+1''+1 <sup>•</sup> +1 <sup>#</sup> )
	ASD				
<b>aCGH<sup>§</sup></b>	RIP	6 (3+2 <sup>L</sup> +1 <sup>z</sup> )	2 (2+1 <sup>z</sup> )		
	ASD	4			

\* 4 nebalansirane translokacija (4 viška i 4 manjka)

◦ delecije pojedinih gena

◦◦ mikrodelecijski sindromi (delecija nekoliko gena)

# ispitanik ima punu metilaciju FMR1 gena (FRAX) i deleciju prvog egzona FMR1 gena

x duplikacija pojedinog gena

• ispitanik ima duplikaciju subtelomere 5p i punu metilaciju FMR1 gena

x mikroduplikacijski sindromi (duplikacija nekoliko gena)

Δ dva ispitanika imaju duplikacija po dva gena sa različitih kromosoma

≡ jedan ispitanik ima duplikacije tri gena istog kromosoma

' UPD (Angelman sindrom)

'' FRAX sindrom

§ prikazane su samo aberacije klasificirane kao patogene i potencijalno patogene

<sup>L</sup> jedan ispitanik ima dvije delecije

<sup>z</sup> kod jednog ispitanika detektirana je delecija i duplikacija

Tablica 8a. Ukupni rezultati GTG, FISH i MLPA analiza.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P015	P189	P106	P343	P313	P080	P336	ME028	ME029	UKUPNO
Broj analiza	348/379	347/379	354/379	337/379	46/379	19/277	92/379	97/379	5/379	17/379	20/379	39/379	57/379	
<i>Aberantni nalaz</i>														
Dijagnoza/ broj analiza	18/348	12/347	12/354	5/337	0	0	1/92	2/97	0	2/17	0	1/39	3/57	14%
Nejasan fenotipski efekt												13*		3,4%
<b>UKUPNO</b> <b>%</b>	18/348 5,5%	12/347 3,6%	12/354 3,4%	5/337 1,5%	0/46 0	0/19 0	1/92 1%	2/97 2,1%	0/5 0	2/17 11,8%	0/20 0	14/39 35,9%	3/57 5,3%	17,4%

\*MTHFR 677C>T mutacija (A222V)

Tablica 8b. Ukupni rezultati GTG, FISH, MLPA i aCGH analiza.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P015	P189	P106	P343	P313	P080	P336	ME028	ME029	aCGH	UKUPNO
Broj analiza	348/379	347/379	354/379	337/379	46/379	19/277	92/379	97/379	5/379	17/379	20/379	39/379	57/379	68/379	
<i>Aberantni nalaz</i>															
Dijagnoza/ broj analiza	18/348	12/347	12/354	5/337	0	0	1/92	2/97	0	2/17	0	1/39	3/57	11**/68	16,9%
Nejasan fenotipski efekt												13*			3,4%
<b>UKUPNO</b> <b>%</b>	18/348 5,5%	12/347 3,6%	12/354 3,4%	5/337 1,5%	0/46 0	0/19 0	1/92 1%	2/97 2,1%	0/5 0	2/17 11,8%	0/20 0	14/39 35,9%	3/57 5,3%	11/68 16,2%	20,3%

\* MTHFR 677C>T mutacija (A222V)

\*\* Poznati mikrolepcijski i mikroduplikacijski sindromi

Tablica 9a. Rezultati GTG, FISH i MLPA analiza za Centar Stančić.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P015	P189	P106	P343	P313	P080	P336	ME028	ME029	UKUPNO
Broj analiza	250/277	254/277	262/277	252/277	45/277	19/277	84/277	72/277	5/277	17/277	20/277	33/277	42/277	
<i>Aberantni nalaz</i>														
Dijagnoza/ broj analiza	9/250	9/254	9/262	5/252	0	0	0	1/72	0	2/17	0	1/33	2/42	13%
Nejasan fenotipski efekt												13*		4,7%
<b>UKUPNO</b> <b>%</b>	9/250 3,6%	9/254 3,5%	9/262 3,4%	5/252 2%	0/45 0	0/19 0	0/84 0	1/72 1,4%	0/5 0	2/17 11,8%	0/20 0	14/33 42,4%	2/42 4,8%	17,7%

\*MTHFR 677C>T mutacija (A222V)

Tablica 9b. Rezultati GTG, FISH i MLPA analiza za Centar Stančić.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P015	P189	P106	P343	P313	P080	P336	ME028	ME029	aCGH	UKUPNO
Broj analiza	250/277	254/277	262/277	252/277	45/277	19/277	84/277	72/277	5/277	17/277	20/277	33/277	42/277	16/241	
<i>Aberantni nalaz</i>															
Dijagnoza/ broj analiza	9/250	9/254	9/262	5/252	0	0	0	1/72	0	2/17	0	1/33	2/42	3**/16	14,1%
Nejasan fenotipski efekt												13*			4,7%
<b>UKUPNO</b> <b>%</b>	9/250 3,6%	9/254 3,5%	9/262 3,4%	5/252 2%	0/45 0	0/19 0	0/84 0	1/72 1,4%	0/5 0	2/17 11,8%	0/20 0	14/33 42,4%	2/42 4,8%	3/16 18,7%	18,8%

\*MTHFR 677C>T mutacija (A222V)

\*\* Poznati mikrodelecijski i mikroduplicacijski sindromi

Tablica 10a. Rezultati GTG, FISH i MLPA analiza za Centar Zagreb.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P015	P106	P343	ME028	ME029	UKUPNO
Broj analiza	74/78	70/78	69/78	65/78	1/78	8/78	2/78	5/78	7/78	
<i>Aberantni nalaz</i>										
Dijagnoza/ broj analiza	6/74	3/70	3/69	0	0	1/8	0	0	1/7	18%
<i>Nejasan fenotipski efekt</i>										
<b>UKUPNO</b> <b>%</b>	6/74 8,1%	3/70 4,3%	3/69 4,3%	0/65 0	0/1 0	1/8 12,5%	0/2 0	0/5 0	1/7 14,3%	18%

Tablica 10b. Rezultati GTG, FISH i MLPA analiza za Centar za rehabilitaciju Zagreb.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P015	P106	P343	ME028	ME029	aCGH	UKUPNO
Broj analiza	74/78	70/78	69/78	65/78	1/78	8/78	2/78	5/78	7/78	31/64	
<i>Aberantni nalaz</i>											
Dijagnoza/ broj analiza	6/74	3/70	3/69	0	0	1/8	0	0	1/7	4*/31	23%
<i>Nejasan fenotipski efekt</i>											
<b>UKUPNO</b> <b>%</b>	6/74 8,1%	3/70 4,3%	3/69 4,3%			1/8 12,5%			1/7 14,3%	4/31 13%	23%

\* Poznati mikrolecijski i mikroduplikacijski sindromi

Tablica 11a. Rezultati GTG, FISH i MLPA analiza za Centar za rehabilitaciju ERF.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P343	ME028	ME029	UKUPNO
Broj analiza	24/24	23/24	23/24	23/24	23/24	1/24	8/24	
<i>Aberantni nalaz</i>								
<i>Dijagnoza/ broj analiza</i>	3/24	0	0	0	1/23	0	0	12,5%
<i>Nejasan fenotipski efekt</i>								
<b>UKUPNO</b>	3/24	0/23	0/23	0/23	1/23	0/23	0/23	
<b>%</b>	<b>12,5%</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4.3%</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12,5%</b>

Tablica 11b. Rezultati GTG, FISH i MLPA analiza Centar za rehabilitaciju ERF.

Metoda	GTG FISH	P036/ P070	P245	P297	P343	ME028	ME029	aCGH	UKUPNO
Broj analiza	24/24	23/24	23/24	23/24	23/24	1/24	8/24	21/24	
<i>Aberantni nalaz</i>									
<i>Dijagnoza/ broj analiza</i>	3/24	0	0	0	1/23	0	0	4*/21	29%
<i>Nejasan fenotipski efekt</i>									
<b>UKUPNO</b>	3/24	0/23	0/23	0/23	1/23	0/23	0/23	4/21	
<b>%</b>	<b>12,5%</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4.3%</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>19%</b>	<b>29%</b>

\* Poznati mikrolelecijski i mikroduplikacijski sindromi



## 5.1. Analiza kromosoma GTG prugama

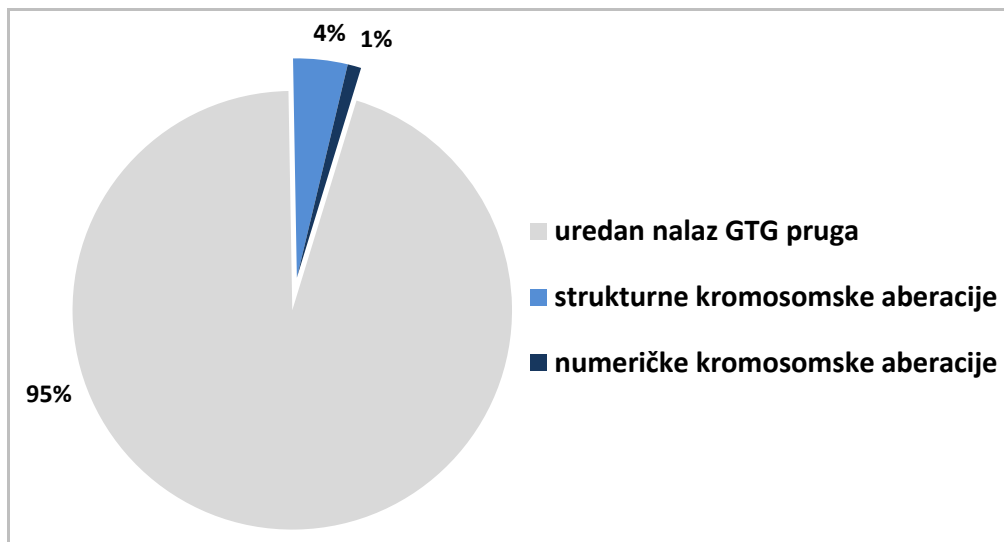
### 5.1.1. Aberacije detektirane GTG prugama kod ispitanika s dijagnozom RIP-a

GTG analiza kromosoma provedena je kod 324 ispitanika s dijagnozom RIP-a. Kod 15 ispitanika (4,6%) detektiran su kromosomske aberacije.

#### ***Numerički i strukturni kromosomski poremećaji otkriveni kod ispitanika s dijagnozom RIP-a***

- 47,XY,+21[29]/48,XY,+21,+mar[1]r(13)(::p1?2>q1?3::)[1]/  
der(13)(pter>q?12.11::p11.1>q1?3::q11.1->p1?1.2:)[2]
- 51,XXXX,+9,+9/56,XXX,+6,+6,+7,+7,+8,+12,+16,-19,+20,+21/48,XXXX/  
47,XX,+17/60,XXXX,+3,+5,+5,+6,+8,+13,+14,+15,+16,+17,+18,+19/47,XX,+5,+5,+19
- 46,XX.ish 15q11.2 (SNRPNx1,UBE3Ax1)
- 46,XY,der(18)t(10;18)(q26.11;p11.21)
- mos 47,XY,+r(1)(::p21.1->p21.3::)[80%]/46,XY[20%]
- mos 47,XXY/47,XXY/45,X/?45,Y/46,XY
- 46,XX.ish 15q11.2 (SNRPNx1,UBE3Ax1)
- 46,XY,der(1)t(1;10)(p12.2;p36.2)
- 47,XXY
- 46,XY,der(18)t(2;18)(p23;p11.3)
- arr15q11.1q11.2(20,481,702-22,558,756)x3,15q11.2q13.1(22,765,628-28,535,051)x1
- 46,XX,der(1)(pter->q32.1::q42.2->q44::q32.3->q42.2::q44->qter)
- 46,XX.ish del(17)(p11.2p11.2)(RAI-)
- 46,XX,del(7)(q31.31q32.3)
- 46,XX,der(18)t(10;18)(q24.3;p11.22)

Kromosomske aberacije detektirane GTG analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP-a bile su numeričke aberacije, 20% (3/15) i strukturne promijene, 80% (12/15). Od detektiranih numeričkih aberacija dvije aberacije bile su vezane za spolne kromosome (2/3), dok je jedna bila hiperdiploidija (1/3) (Slika 15.)

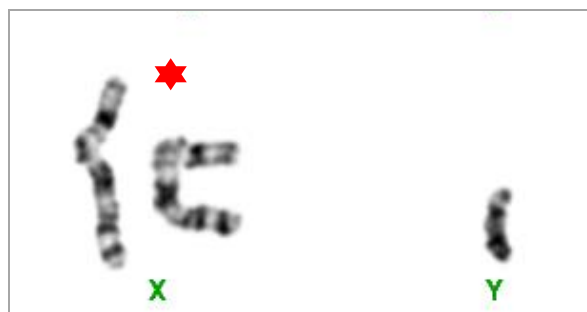


Slika 15. Kromosomske aberacije detektirane GTG analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP-a.

U nastavku poglavlja detaljno je opisan svaki pojedinačni nalaz numeričkih i strukturnih kromosomskih poremećaja otkriveni GTG analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP-a, te su navedene sve dodatne analize (FISH, MLPA, sekvenciranje ili aCGH) učinjene u svrhu precizne molekularne karakterizacije otkrivenih aberacija.

**1. ST-329** – muški ispitanik, 34 godine. Uputna dijagnoza: RIP i ASD. Analizom kromosom utvrđen je kariotip s dvije kopije X kromosoma, te jednom kopijom Y kromosoma (Slika 16.). Navedeni nalaz nalazi se u podlozi Klinefelter sindroma.

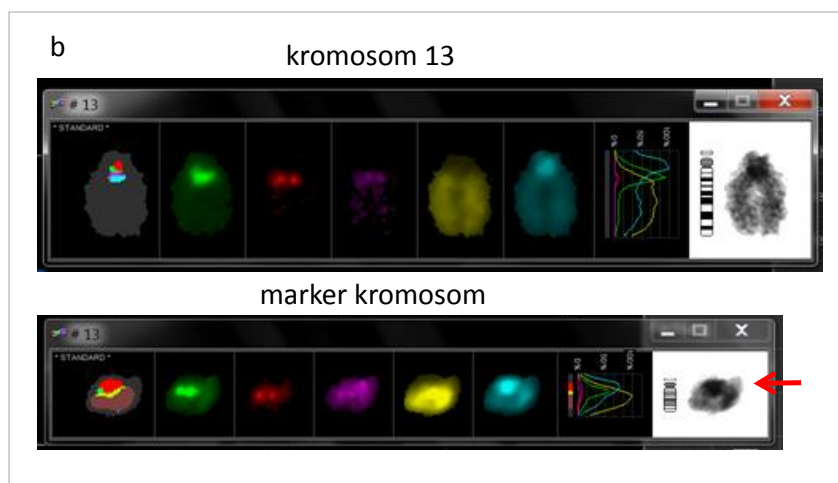
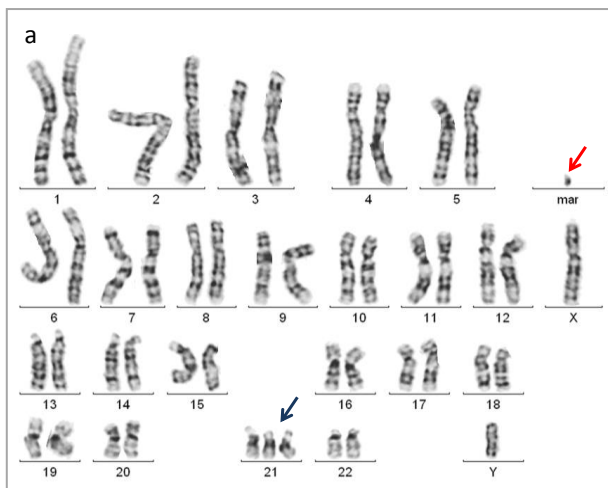
*Kariotip: 47,XXY*



Slika 16. Parcijalni kariotip. Crvena zvjezdica označava dvije kopije X kromosoma.

**2. ST-010** – muški ispitanik, 42 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Analizom kromosoma utvrđena je trisomija 21 (Down sindrom) uz prekobrojni marker kromosom (Slika 17a.). FISH analizom (subcenM-FISH); Satellite Enumeration SE 13/21, Kreatech Diagnostics) utvrđeno je da je prekobrojni marker kromosom ring 13. (Slika 17b).

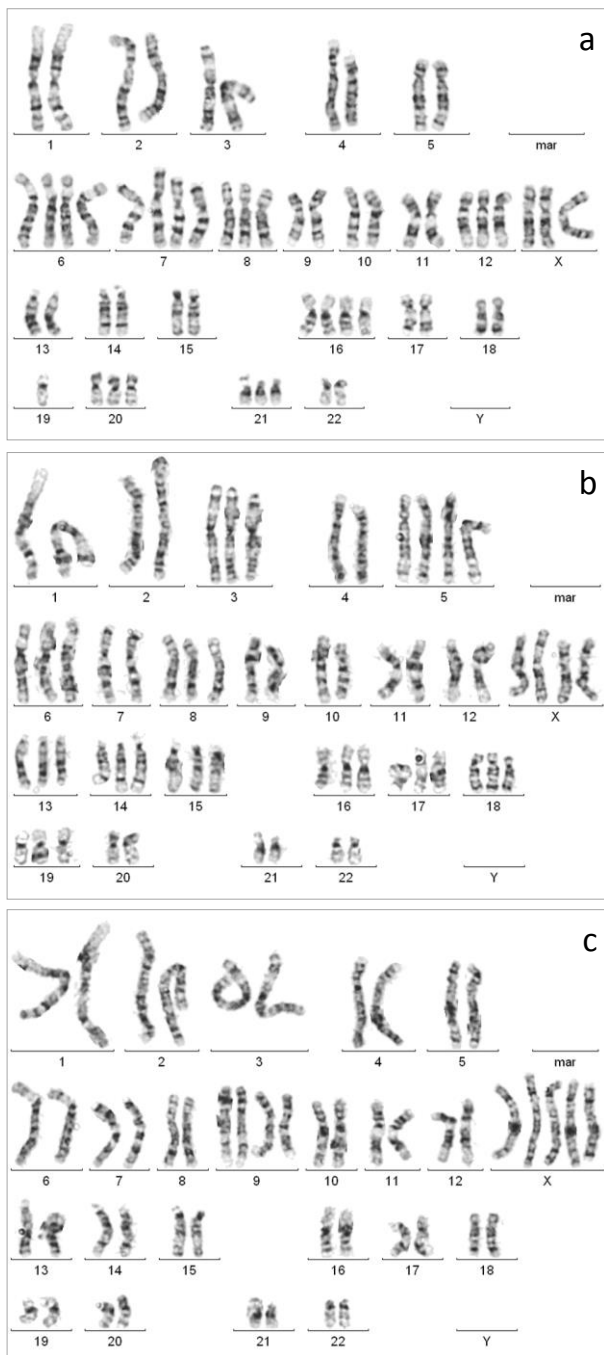
*Kariotip:47,XY,+21[29]/48,XY,+21,+mar[1]r(13)(::p1?2>q1?3::)[1]/der(13)(pter>q?12.11::p11.1>q1?3::q11.1->p1?1.2:)[2]*



*Slika 17.* (a) Kariotip. Crvena strelica označava marker kromosom, plava strelica označava tri kopije kromosoma 21.(b) FISH analiza pokazuje porijeklo prekobrojnog marker kromosoma (označen crvenom strelicom).

**3. ST-012** – ženska ispitanica, 38 godina. Uputna dijagnoza: RIP, mikrocefalija, encefalopatija. Analizom kromosoma utvrđena je hiperdiploidija (Slika 18.) u 6/60 metafaza. MLPA analize subtelomera (P036 i P070) i mikrodelecija (P245 i P297) pokazale su normalan rezultat.

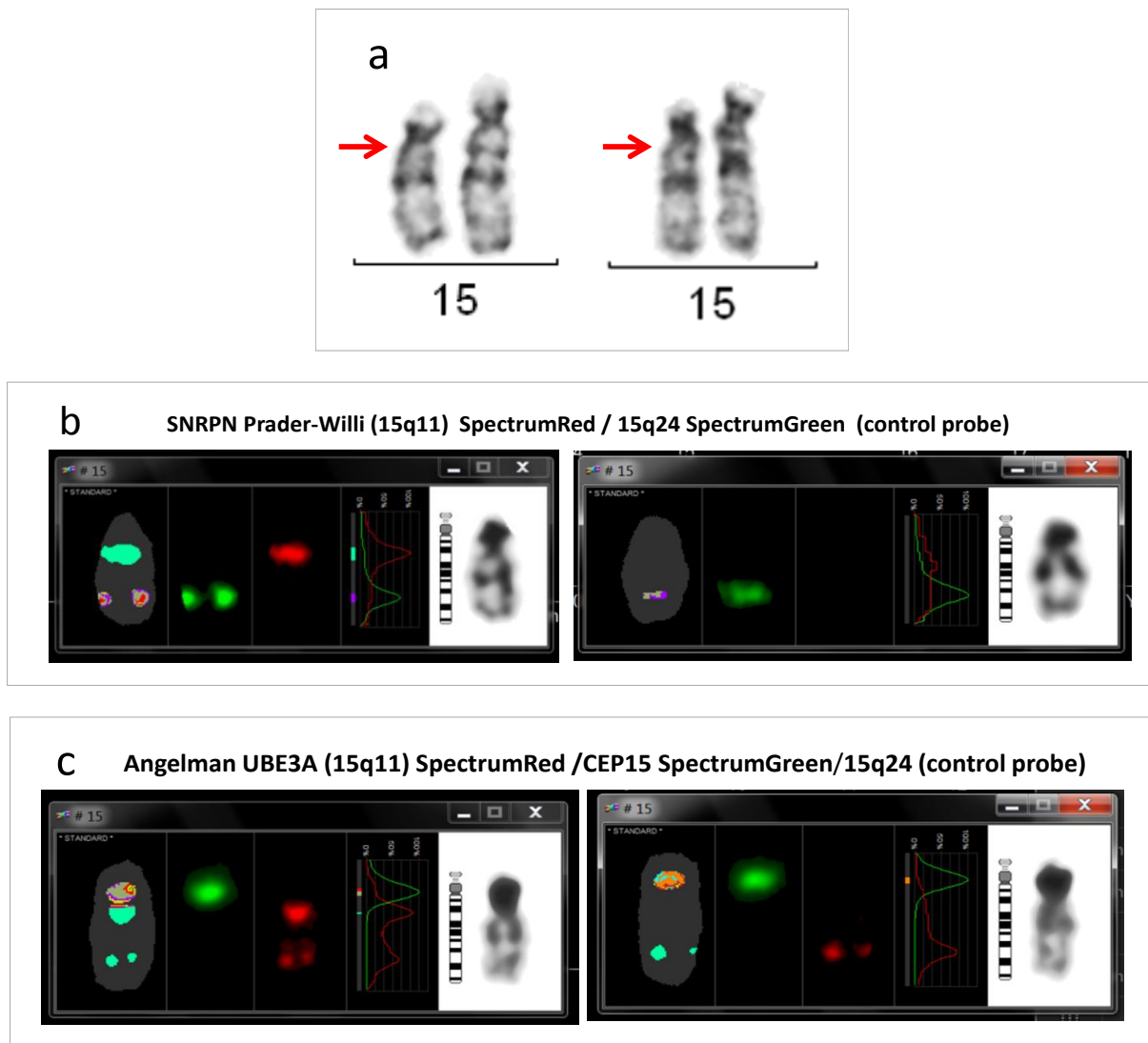
*Kariotip:*51,XXXX,+9,+9/56,XXX,+6,+6,+7,+7,+8,+12,+16,-19,+20,+21/48,XXXX/  
47,XX,+17/60,XXXX,+3,+5,+5,+6,+8,+13,+14,+15,+16,+17,+18,+19/47,XX,+5,+5,+19



Slika 18. Kariotip (a) 56,XXX,+6,+6,+7,+7,+8,+12,+16,-19,+20,+21, (b) 60,XXXX,+3,+5,+5,+6,+8,+13,+14,+15,+16,+17,+18,+19, (c) 51,XXXX,+9,+9.

**4. ST-013** – ženska ispitanica, 38 godina. Uputna dijagnoza: RIP uz kliničku sliku Angelman sindroma. GTG prugama postavljena je indikacija za FISH analizu kromosomske regije 15q11-13 (Slika 19a.). FISH analizom (KBI-45110 Angelman UBE3A (15q11) / 15q24 i KBI-45109 SNRPN Prader-Willi (15q11) / 15q24, Kreatech) potvrđena je delecija 15q11 kromosomske regije (Slika 19b. i 19c).

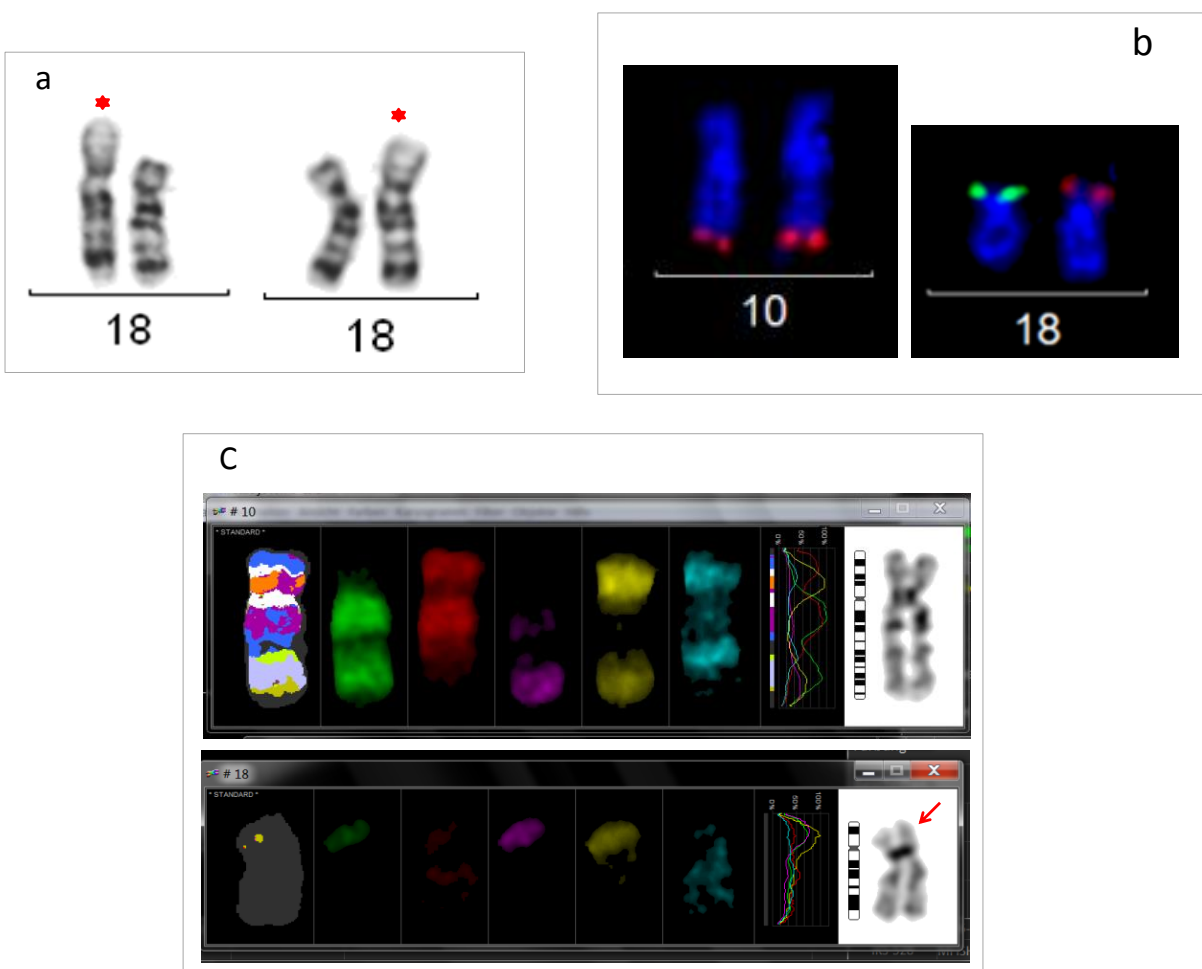
*Kariotip:* 46,XX,ish 15q11.2 (SNRPNx1,UBE3Ax1)



*Slika 19.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 15, crvena strelica označava 15q11 kromosomsku regiju. (b) FISH analiza SNRPN gena. Desno na slici prikazan je kromosom 15. na kojemu je prisutna delecija SNRPN gena. (c) FISH analiza UBE3A gena. Desno na slici prikazan je kromosom 15. na kojemu je prisutna delecija UBE3A gena.

**5. ST-019** – ženska ispitanica, 46 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Analizom kromosoma utvrđena je kromosomska preraspodjela koja zahvaća kromosom 18 (Slika 20a.), te je postavljena indikacija za daljnju FISH analizu. Radi utvrđivanja porijekla dodatnog materijala na kromosomu 18p prvo je učinjena subtelomerna FISH analizom, kojom je utvrđena translokacija dijela 10q kromosomskog segmenta na 18p, uz subtelomernu deleciju 18p (Slika 20b.). Daljnjom FISH analizom (MCB 18 i MCB 10) utvrđene su točke loma i veličina detektirane aberacije (Slika 20c.). Kod ispitanice je utvrđena segmentalna trisomija 10q26.11->qter i segmentalna monosomija 18p11.21->pter

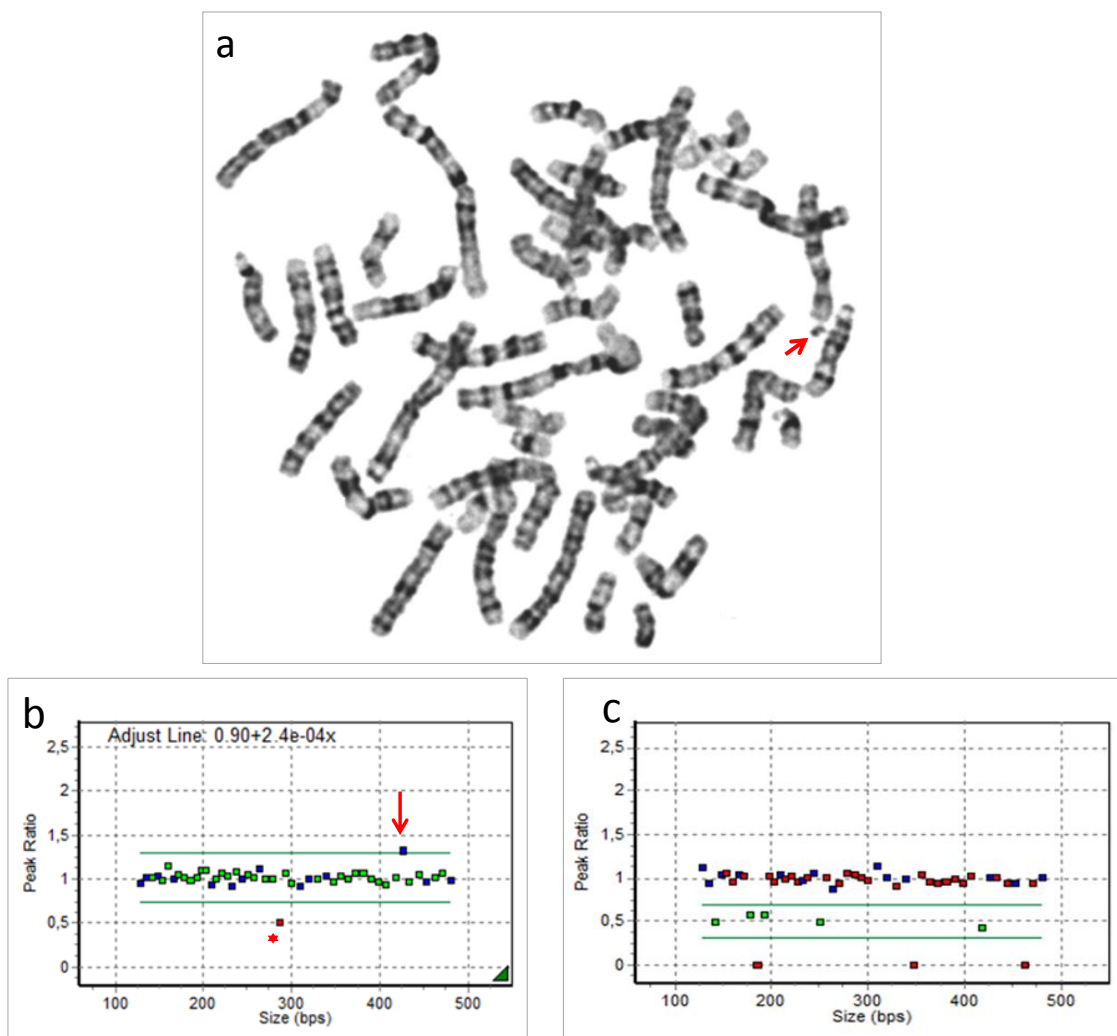
*Kariotip: 46,XY,der(18)t(10;18)(q26.11;p11.21)*



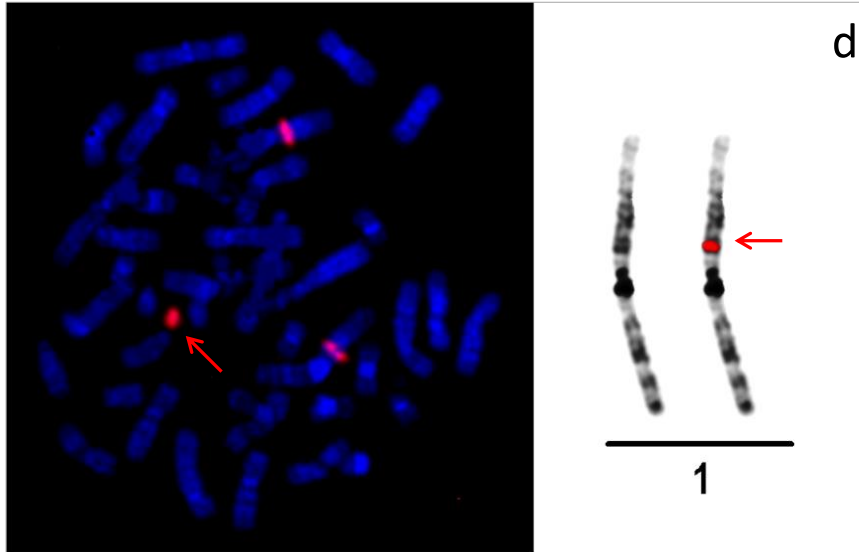
*Slika 20.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 18, crvena zvjezdica označava aberantni kromosom. (b) Rezultati subtelomerne FISH analize pokazuju tri signala za subtelomeru 10q (crveni signali) i jedan signal za subtelomeru 18p (zeleni signal). (c) Normalni profil MCB kromosoma 10 uz prikaz deriviranog kromosoma 18 označenog strelicom.

**6. ST-144** – muški ispitanik, 14 godina. Uputna dijagnoza: RIP, ASD, nerazvijen govor. Analizom kromosoma utvrđen je muški kariotip uz prekobrojni marker kromosom prisutan u 80% metafaza (Slika 21a.). Radi uputne dijagnoze ASD-a i nerazvijenog govora učinjena je MLPA analiza 15q11 kromosomske regije koja je pokazala duplikaciju referentne probe za 1q21 kromosomsku regiju (DPYD gen) (Slika 21b. i c.). Mikrodisekcijom marker kromosoma te reverznim FISH-em potvrđeno je da je mali prekobrojni marker kromosom sSMC(1) duplikacija pruge 1q21 (Slika21d.).

*Kariotip: mos 47,X,+r(1)(::p21.1->p21.3::)[80%]/46,XY[20%]*



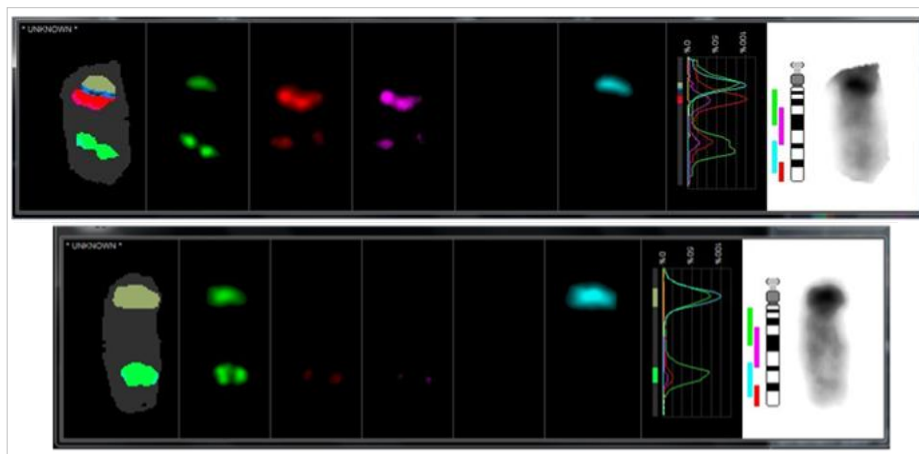
*Slika 21.* (a) Metafaza s prekobrojnim malim marker kromosomom označenim crvenom strelicom. (b) Rezultat MS-MLPA analize. Analize broja kopija; crvenom strelicom označena je proba za DPYD gen, a crvena zvjezdica označava probu za SNRPN exon u1B koja pokazuje varijabilnost u zdravih kontrola. (c) Rezultat MS-MLPA analize. Normalan metilacijski status SNPRN i NDN gena.



Slika 21. (d) FISH analiza nakon mikrodisekcije mapira prekobrojni marker kromosom (označen crvenom strelicom) na 1p21.3p21.2

**7. ST-273** – ženska ispitanica, 37 godina. Uputna dijagnoza: RIP uz kliničku sliku Angelman sindroma. GTG prugama postavljena je indikacija za FISH analizu PWS/AS kromosomske regije 15q11-13. FISH analizom potvrđena je delecija 15q11.2 kromosomske regije (Slika 22.).

*Kariotip:* 46,XX,ish 15q11.2 (SNRPNx1,UBE3Ax1)

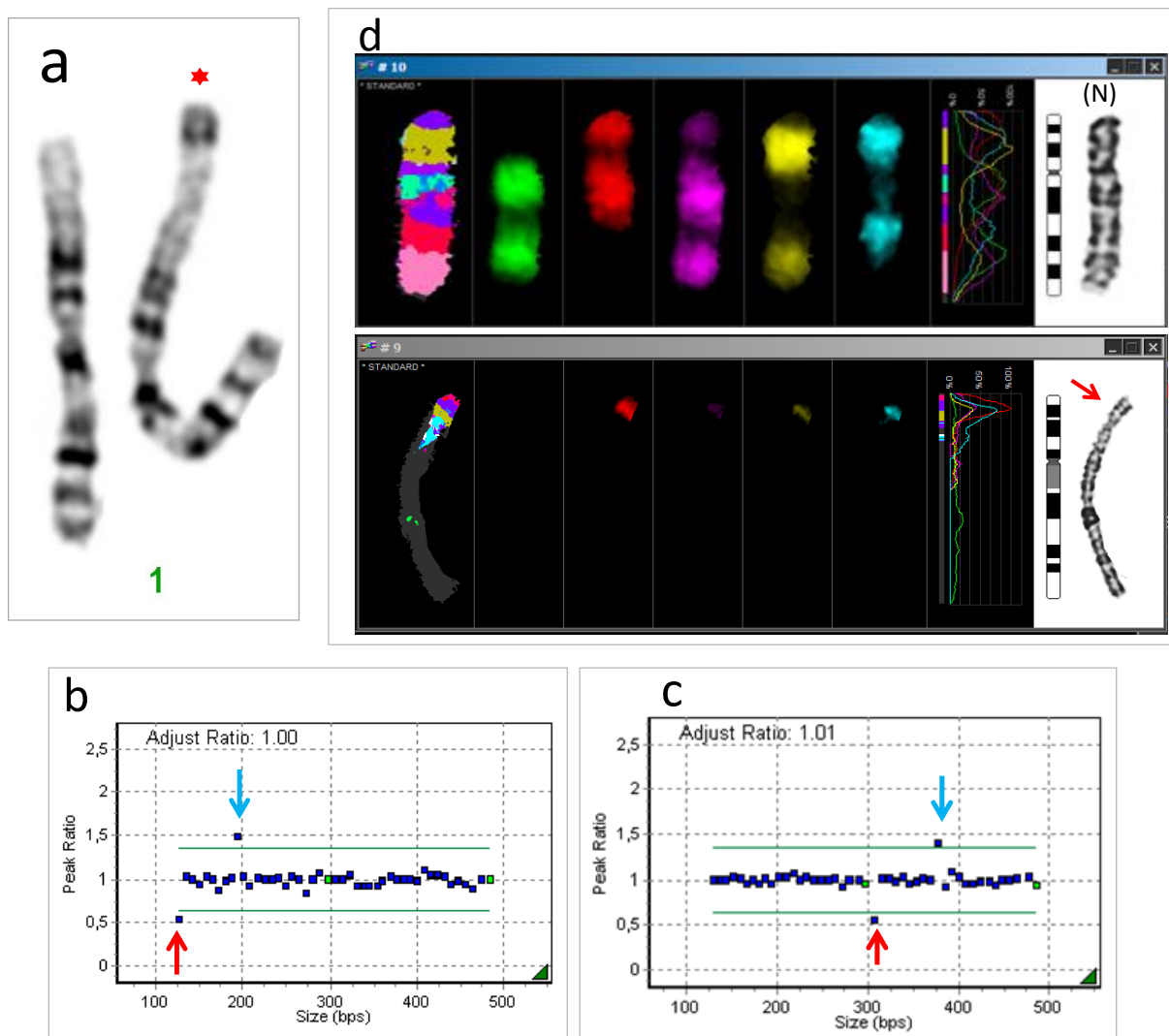


Slika 22. FISH analiza UBE3A i SNRPN gena (Prader-Willi/Angelman Region Probe - LSI D15S10 SpectrumOrange/CEP 15 (D15Z1) SpectrumAqua/PML SpectrumGreen Probe, Vysis i SNRPN/Imprinting Centre: Red Fluorophore 15q Subtelomere Specific Control Probe: Green Fluorophore, Genycell).



**8. ST-225** – muški ispitanik, 40 godina. Uputna dijagnoza. RIP. Analizom kromosoma utvrđena je kromosomska preraspodjela koja zahvaća kromosom 1 (Slika 23a.). Radi utvrđivanja porijekla dodatnog materijala na kromosomu 1q učinjena je MLPA analiza subtelomera (Slika 23b. – 23c.). Veličina aberacije utvrđena je FISH analizom (Slika 23d.). Ispitanik ima segmentalnu trisomiju 10p12.2->pter i segmentalnu monosomiju 1p36.2->pter

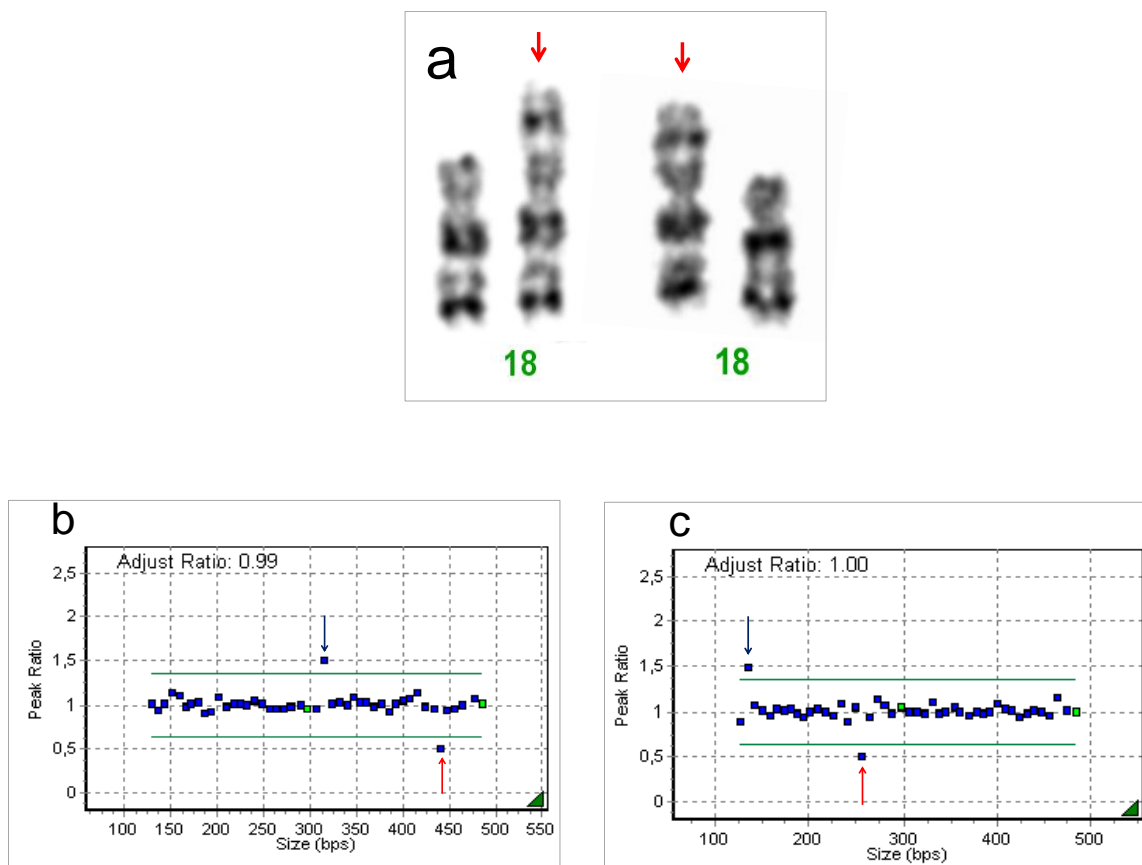
*Kariotip: 46,XY,der(1)t(1;10)(p12.2;p36.2)*



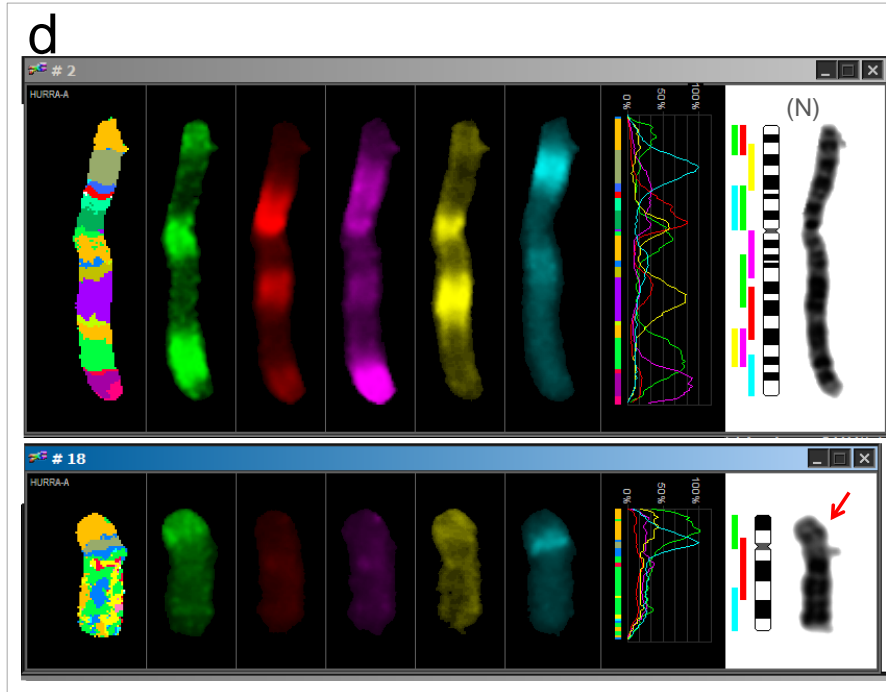
*Slika 23.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 1, crvena zvjezdica označava der kromosom 1. (b) MLPA analiza subtelomera. Rezultat P036 MLPA kita, plava strelica označava probu za subtelomeru 10p, crvena strelica označava probu za subtelomeru 1p. (c) MLPA analiza subtelomera. Rezultat P070 MLPA kita, plava strelica označava probu za subtelomeru 10p, crvena strelica označava probu za subtelomeru 1p. (d) MCB profil. MCB profil normalnog kromosoma 10 (N) uz prikaz translociranog dijela kromosoma 10 na kromosom 1 (označeno strelicom).

**9. CRZ-008** – muški ispitanik, 15 godina. Uputna dijagnoza RIP. Analizom kromosoma utvrđena je kromosomska preraspodjela koja zahvaća kromosom 18 (Slika 24a.). Radi utvrđivanja porijekla dodatnog materijala na kromosomu 18p učinjena je MLPA analiza subtelomera (Slika 24b. – 24c.). Molekularna karakterizacija aberacije učinjena je FISH analizom (Slika 24d.). Array analizom utvrđena je duplikacija 2p25.3p23.1 veličine 31,6 Mb, te delecija 18p11.32p11.31 veličine 4,8 Mb (Slika 25.)

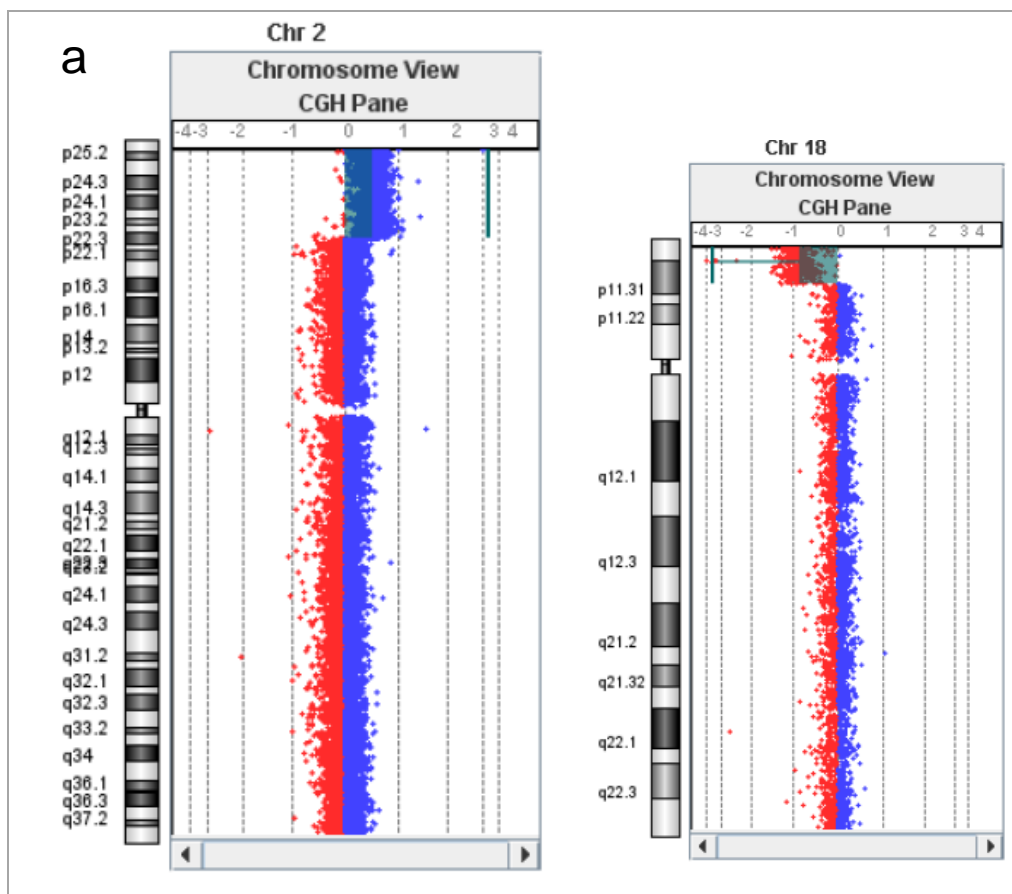
*Kariotip: 46, XY,der(18)t(2;18)(p23;p11.3)*



*Slika 24.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 18, crvena strelica označava aberantni kromosom. (b) MLPA analiza subtelomera. Rezultat P036 MLPA kita, plava strelica označava probu za subtelomeru 2p, crvena strelica označava probu za subtelomeru 18p. (c) MLPA analiza subtelomera. Rezultat rezultat P070 MLPA kita, plava strelica označava probu za subtelomeru 2p, crvena strelica označava probu za subtelomeru 18p.



Slika 24. (d) MCB profil normalnog kromosoma 2 (N) uz prikaz translociranog dijela kromosoma 2 na kromosom 18 (prikazano strelicom).



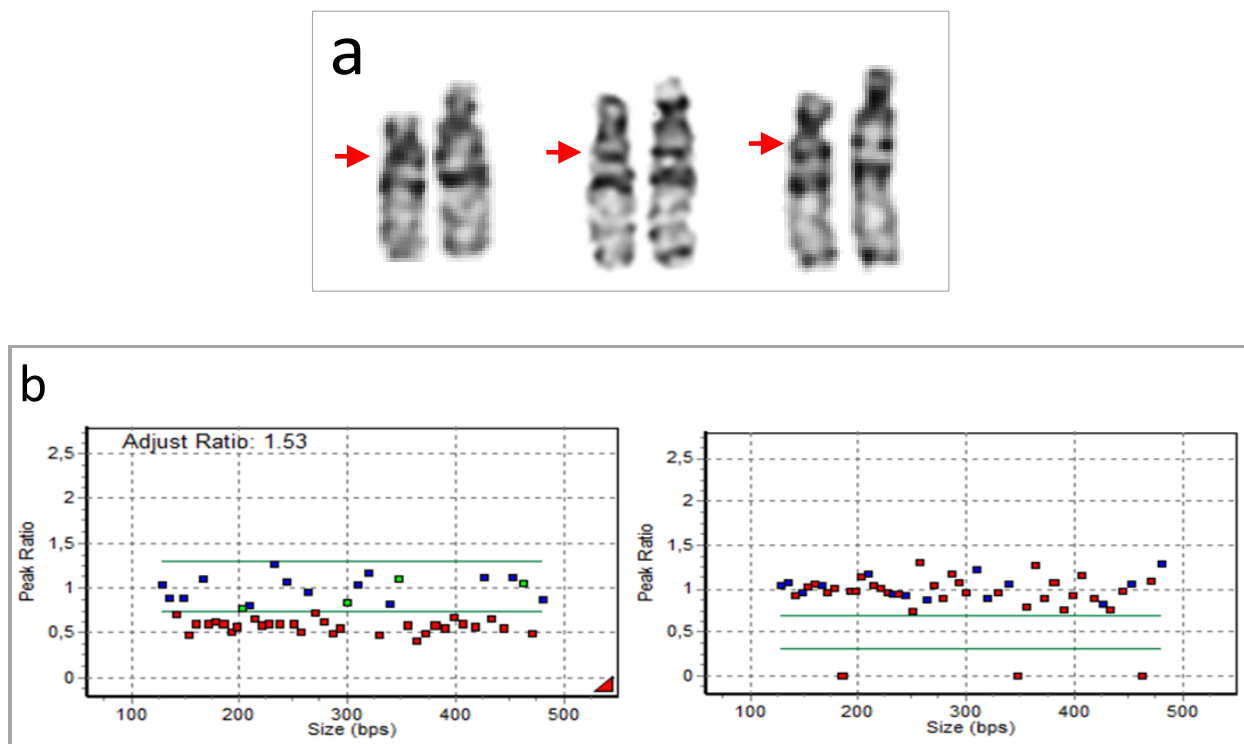
**b**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr2	p25.3 - p23.1	32,444	31,668,129	0.516029	0.000000	FAM110C, SH3YL1, ACP1, FAM150B, TMEM18, LOC339822, SNTG2, TPO, PXDN, MYT1L, LOC730811, TSSC1, TTC15, ADI1, RNASEH1, RPS7, COLEC11, ALLC, SOX11, LOC150622, LOC400940, CMPK2, RSAD2, LOC386597, RNF144A, LOC339788, ID2, KIDINS220, MBOAT2, ASAP2, ITGB1BP1, CPSF3, IAH1, ADAM17, YWHAQ, TAF1B, GRHL1, KLF11, CYS1, RRM2, C2orf48, HPCAL1, ODC1, SNORA80B, NOL10, ATP6V1C2, PDIA6, KCNF1, C2orf50, PQLC3, ROCK2, E2F6, GREB1, NTSR2, LPIN1, TRIB2, FAM84A, NBAS, DDX1, MYCNOS, MYCN, FAM49A, RAD51AP2, VSNL1, SMC6, GEN1, MSGN1, KCNS3, RDH14, NT5C1B, OSR1, FLJ12334, TTC32, WDR35, MATN3, LAPTM4A, SDC1, PUM2, RHOB, HS1BP3, GDF7, C2orf43, APOB, KLHL29, ATAD2B, UBXN2A, MFSD2B, C2orf44, FKBP1B, SF3B14, TP53I3, PFN4, LOC375190, C2orf84, ITS2, NCOA1, C2orf79, CENPO, ADCY3, DNAJC27, EFR3B, POMC, DNMT3A, MIR1301, DTNB, ASXL2, KIF3C, RAB10, FAM59B, HADHA, HADHB, GPR113, EPT1, C2orf39, OTOF, C2orf70, CIB4, KCNK3, C2orf18, CENPA, DPYSL5, MAPRE3, TMEM214, AGBL5, OST4, EMILIN1, KHK, CGREF1, ABHD1, PREB, C2orf53, TCF23, SLC5A6, C2orf28, CAD, SLC30A3, DNAJC5G, TRIM54, UCN, MPV17, GTF3C2, EIF2B4, SNX17, ZNF513, PPM1G, FTHL3, NRBP1, KRTPAP3, IFT172, FNDC4, GCKR, C2orf16, ZNF512, CCDC121, GPN1, SUPT7L, SLC4A1AP, MRPL33, RBKS, LOC100302650, BRE, FOSL2, PLB1, PPP1CB, SPDYA, TRMT61B, WDR43, SNORD92, SNORD53, FAM179A, C2orf71, CLIP4, ALK, YPEL5, LBH, LCLAT1, CAPN13, GALNT14, CAPN14, EHD3, XDH, SRD5A2
chr18	p11.32 - p11.31	108,76	4,933,614	0.000000	-0.846591	ROCK1P1, USP14, THOC1, COLEC12, CETN1, CLUL1, C18orf56, TYMS, ENOSF1, YES1, ADCYAP1, C18orf2, METTL4, NDC80, LOC645158, SMCHD1, EMILIN2, LPIN2, LOC727896, MYOM1, MYL12A, MYL12B, TGIF1, DLGAP1, FLJ35776

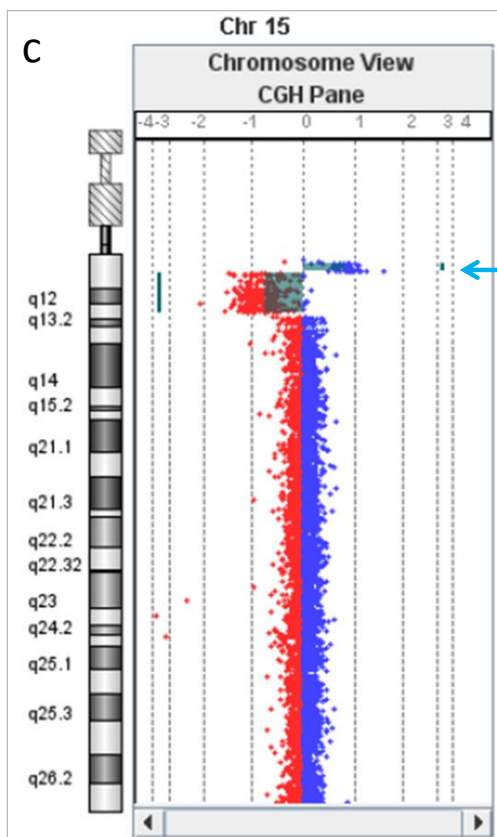
Slika 25. (a) Shematski prikaz arrayCGH rezultata za kromosom 2 i 18. (b) Pozicija i veličina detektiranih aberacija, te popis svih gena zahvaćenih regija kromosoma 2 i 18.

**10. CRZ-023** – ženska ispitanica, 17 godina. Uputna dijagnoza: RIP, nerazvijen govor. G-pruganjem kromosoma postavljena je indikacija za daljinu analizu 15q11 kromosomske regije (Slika 26a.). MLPA analiza pokazala je deleciju nemetiliranih kopije SNPRN i NDN gena (Slika 25b). Array analizom utvrđena je delecija 15q11.2 - q13.1 veličine 5,8 Mb (Slika 26c. i 26d). Postavljena je dijagnoza Prader-Willi sindroma.

*Kariotip: arr15q11.1q11.2(20,481,702-22,558,756)x3,15q11.2q13.1(22,765,628- 28,535,051)x1*



Slika 26. (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 15, crvena strelica označava 15q11.2 kromosomsku regiju. (b) Rezultati MS-MLPA analize. Analiza broja kopija pokazuje deleciju 15q11.2. (b) Rezultati MS-MLPA analize. Metilacijsko profiliranje pokazuje da je prisutna samo metilirana kopija gena.



**d**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr15	q11.2	18,741,716	20,060,120	0.823514	0.000000	GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, LOC646214, CXADRP2, POTE8, NF1P1, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC646396
chr15	11.2 - q13.2	316,992	26,208,646	0.000000	-0.748023	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2, GOLGA8E, MKRN3, MAGEL2, NDN, PWRN2, PWRN1, C15orf2, SNRPN, SNURF, SNORD107, PAR-SN, PAR5, SNORD64, SNORD108, SNORD109B, SNORD109A, SNORD116-1, SNORD116-2, SNORD116-3, SNORD116-9, SNORD116-4, SNORD116-7, SNORD116-5, SNORD116-6, SNORD116-8, SNORD116-10, SNORD116-11, SNORD116-12, SNORD116-13, SNORD116-14, SNORD116-15, SNORD116-16, SNORD116-17, SNORD116-19, SNORD116-18, SNORD116-20, SNORD116-21, SNORD116-22, SNORD116-23, SNORD116-24, SNORD116-25, SNORD116-26, SNORD116-27, SNORD116-28, SNORD116-29, IPW, PAR1, SNORD115-1, SNORD115-2, SNORD115-3, SNORD115-4, SNORD115-5, SNORD115-10, SNORD115-12, SNORD115-9, SNORD115-6, SNORD115-7, SNORD115-8, SNORD115-29, SNORD115-36, SNORD115-11, SNORD115-43, SNORD115-13, SNORD115-14, SNORD115-15, SNORD115-16, SNORD115-17, SNORD115-19, SNORD115-18, SNORD115-20, SNORD115-21, SNORD115-22, PAR4, SNORD115-23, HBII-52-24, SNORD115-25, SNORD115-26, HBII-52-27, HBII-52-28, SNORD115-30, SNORD115-31, SNORD115-32, SNORD115-33, SNORD115-34, SNORD115-35, SNORD115-37, SNORD115-38, SNORD115-39, SNORD115-40, SNORD115-41, SNORD115-42, SNORD115-44, HBII-52-45, HBII-52-46, SNORD115-48, UBE3A, ATP10A, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OCA2, HERC2

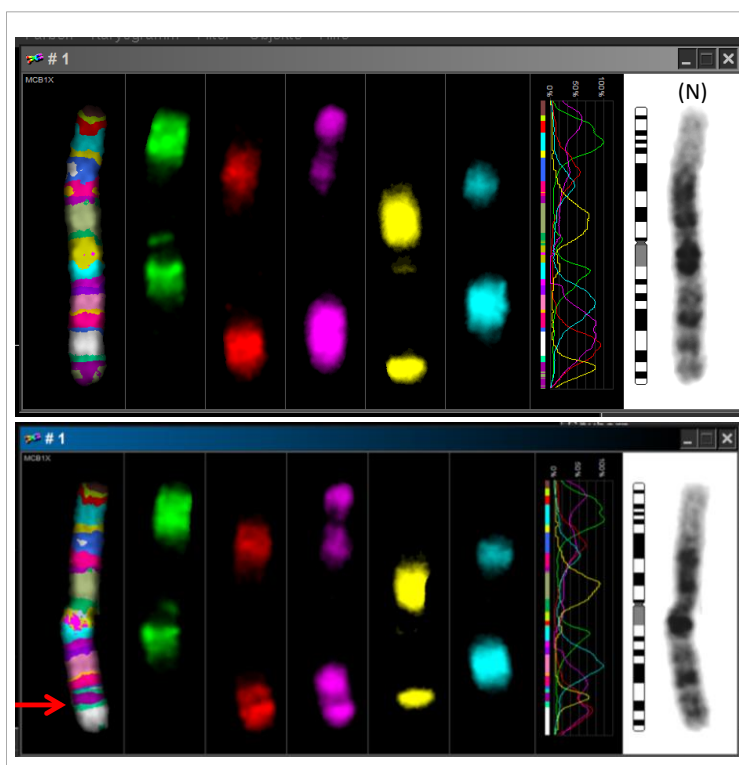
**Slika 26.** (c) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 15. Plava strelica prikazuje duplikaciju CNV 15q11.2 regije. (d) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te ukupan popis gena zahvaćene regije. Plava zvjezdica označava duplikaciju 15q11.2 regije.

**11. CRZ-045** – ženska ispitanica, 16 godina. Uputna dijagnoza: RIP. GTG analizom kromosoma postavljena je indikacija za daljnju analizu kromosoma 1 (Slika 26). MLPA analiza subtelomera (P036, P070) i mikrolelecijskih sindroma (P245, P297) pokazala je uredan nalaz. FISH analizom utvrđeno je da se radi o inserciji kromosomskog segmenta 1q41q43 (Slika 27a., 28a. – 28c.). Array CGH analizom utvrđena je delecija 1q32.2 pruge veličine 5,5 Mb, te duplikacija 1,3 Mb TBL1XR1 gena (3q26.32) (Slika 29a. i 29b.). BAC FISH analizom potvrđena je delecija 1q32.2 pruge i duplikacija TBL1XR1 gena (Slika 30a. – 30c.). Na slici 31. prikazan je mehanizam detektirane kromosomske aberacije uz utvrđene točke loma.

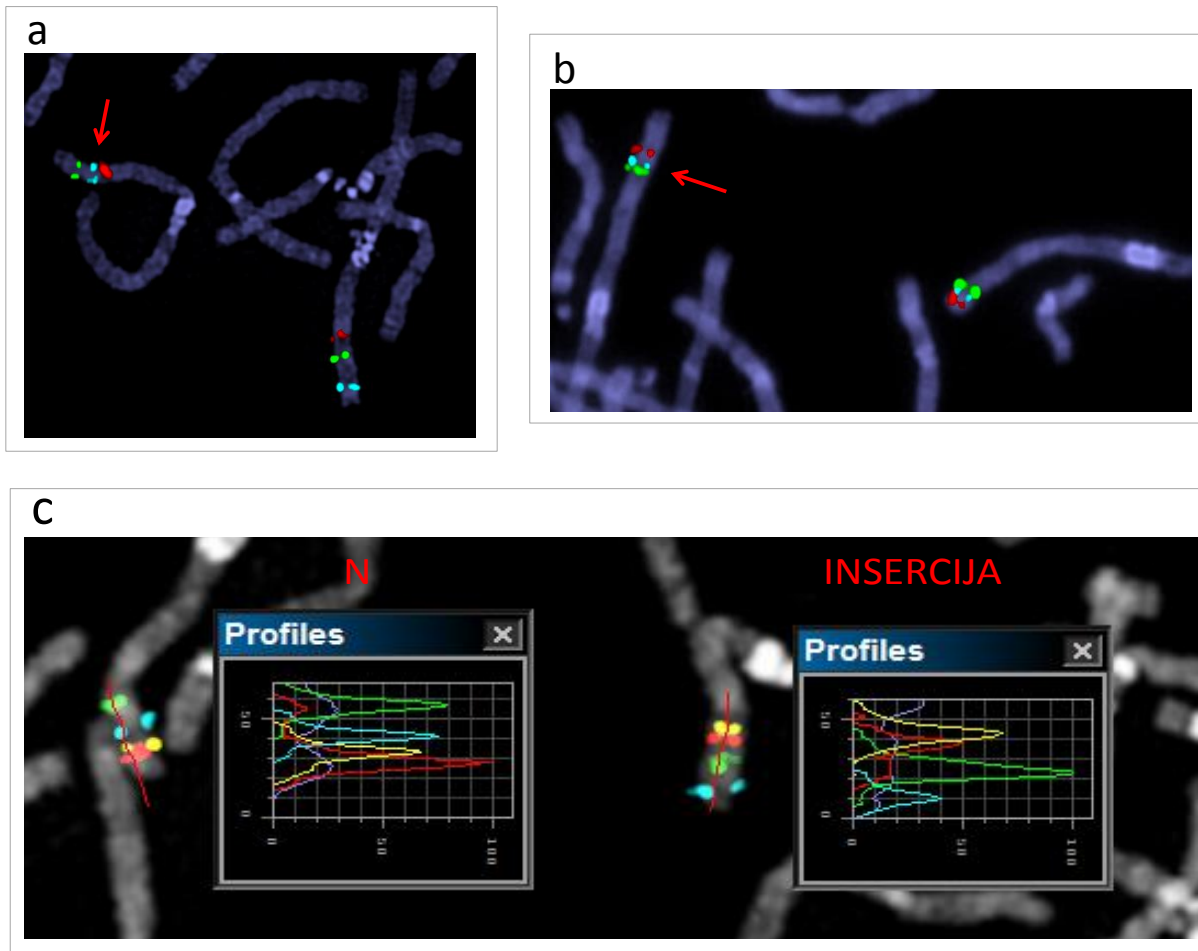
*Kariotip:* 46,XX,der(1)(pter->q32.1::q42.2->q44::q32.3->q42.2::q44->qter)



Slika 26. Parcijalni kariotip. Kromosom 1. Crvena strelica označava

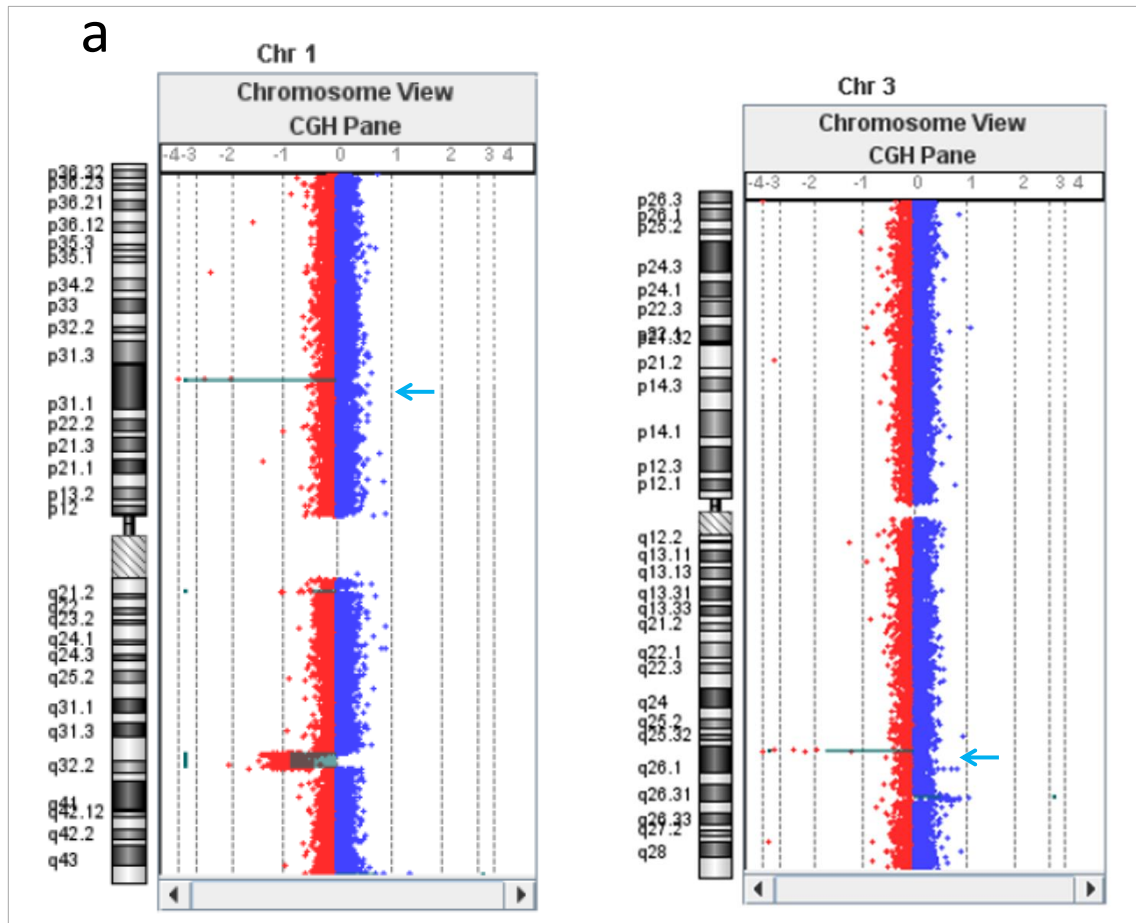


Slika 27. MCB profil kromosoma 1. Strelica označava aberantni kromosom.



Slika 28. (a) BAC FISH analiza (RP11-332J14 (plavi signal)-1q41, RP11-286E7(zeleni signal)-1q32.3, RP11-469A15(crveni signal)-1q32.1). Strelica označava aberantni kromosom. (b) BAC FISH analiza (RP11-80B9 (crveni signal) 1q42.2, RP11-99J16 (plavi signal) 1q43, RP11-332J14 (zeleni signal) 1q41). Strelica označava aberantni kromosom. (c) BAC FISH (RP11-940F7 (crveni signal) 1q42.3, RP11-391H5 (žuti signal) 1q42.2, RP11-100E13 (plavi signal) 1q42.12, RP11-286E7 (zeleni signal) 1q32.3) N – normalan kromosom, INSERCIJA – aberantan kromosom

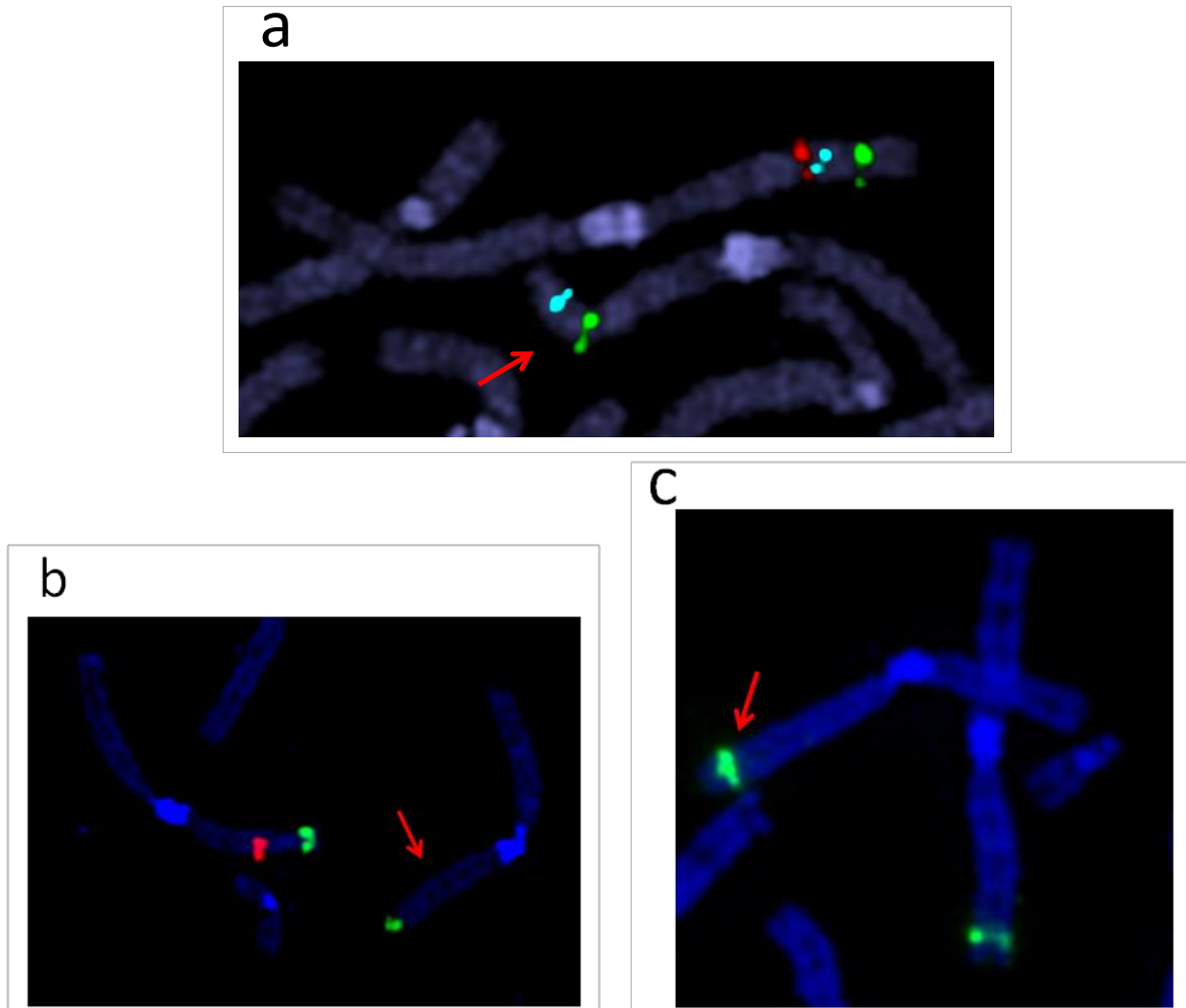




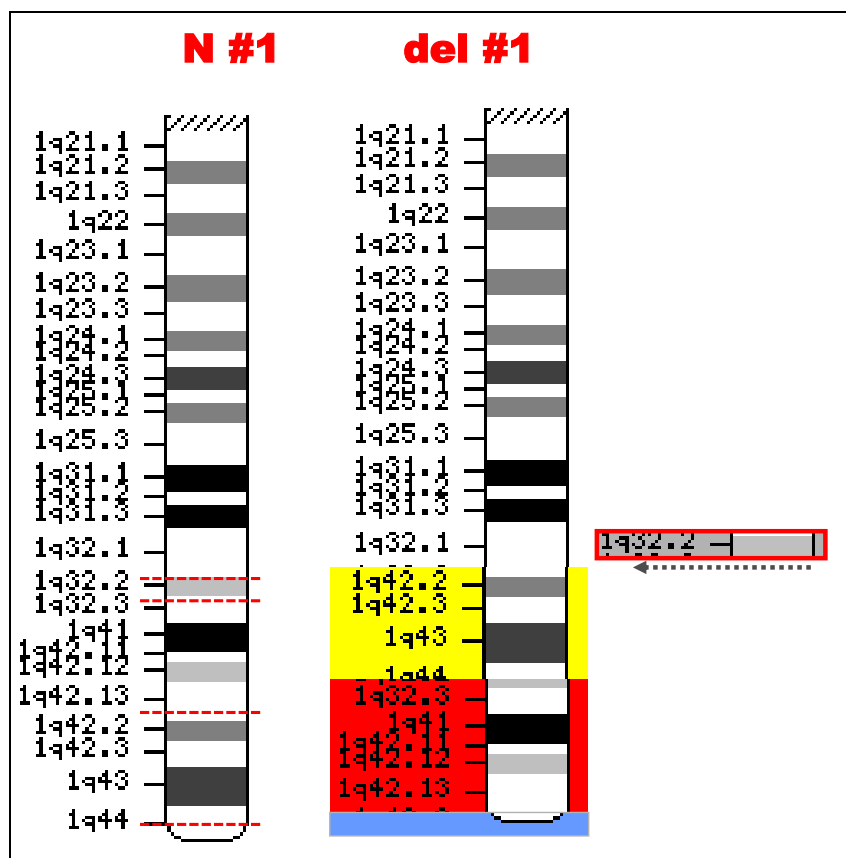
**b**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr1	p31.1	72,541,443	72,568,068	0.000000	-3.399.767 *	
chr1	q32.1 - q32.3	204,356,461	209,907,099	0.000000	-0.839102	AVPR1B, C1orf186, CTSE, SRGAP2, IKBKE, RASSF5, LGTN, DYRK3, MAPKAPK2, IL10, IL19, IL20, IL24, FAIM3, PIGR, FCAMR, C1orf116, YOD1, PFKFB2, C4BPB, C4BPA, CD55, CR2, CR1, CR1L, CD46, MIR29C, MIR29B2, LOC148696, CD34, PLXNA2, LOC642587, MIR205, CAMK1G, LAMB3, G0S2, HSD11B1, TRAF3IP3, C1orf74, IRF6, C1orf107, SYT14, C1orf133, SERTAD4, HHAT, KCNH1, RCOR3, TRAF5, C1orf97, RD3, SLC30A1, NEK2
chr3	q26.1	163,997,228	164,101,835	0.000000	-1.734.697 *	
chr3	q26.32	177,547,177	178,852,470	0.514779	0.000000	TBL1XR1

*Slika 29. (a) Shematski prikaz arrayCGH rezultata za kromosome 1 i 3. Plave strelice označavaju dodatno detektirane duplikacije regija kromosoma bez gena. (d) Pozicija i veličina detektiranih aberacija, te popis svih gena zahvaćenih regija. Plave zvjezdice označavaju duplicirane regije bez gena.*



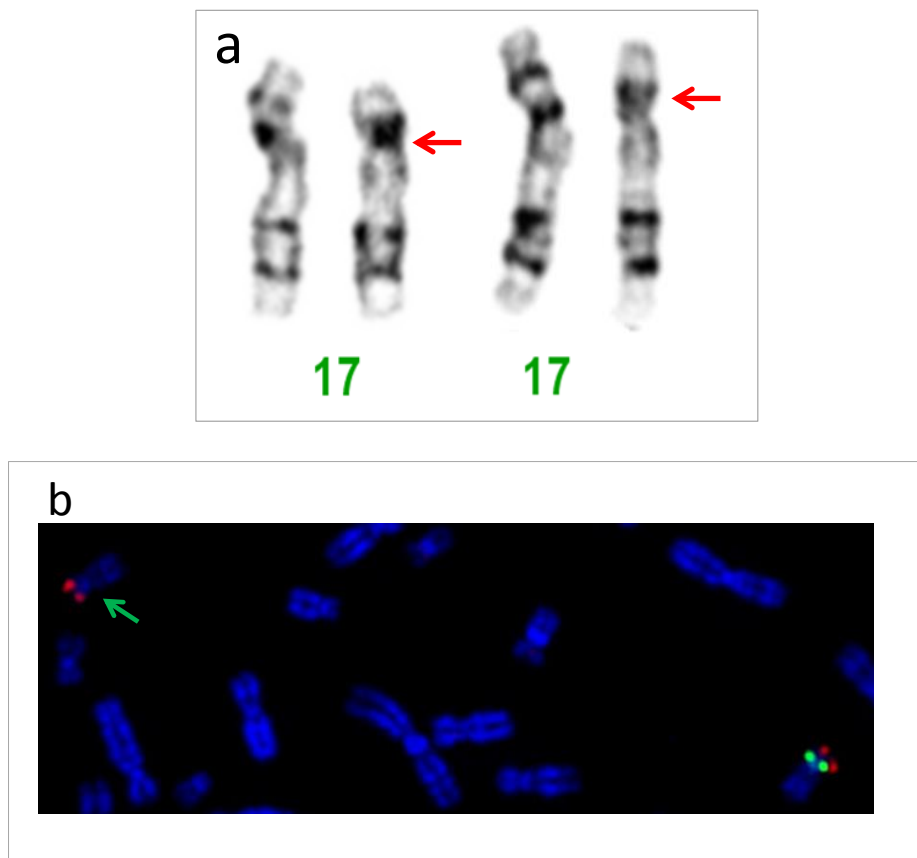
*Slika 30.* (a) BAC FISH analiza kromosoma 1 (RP11-99J16 (zeleni signal) 1q42, RP11-438G15 (plavi signal) 1q41, RP11-534L20 (crveni signal) 1q32.1). Strelica označava aberantni kromosom. (b) FISH analiza kromosoma 1 (PR11-328D5 (crveni signal) 1q32.2 i subtelomera 1q zeleni signal). Strelica označava aberantni kromosom s delecijom 1q32.2. (c) FISH analiza kromosoma 3 (PR11-484D1 zeleni signal) potvrdila je duplikaciju TBL1XR1 gena na kromosomu 3q26.32. Strelica označava aberantni kromosom 3.



Slika 31. Shematski prikaz detektirane kromosomske aberacije. N#1 normalni kromosom; del#1 aberantni kromosom. Na dugom kraku kromosoma 1 došlo je do četiri loma (u prugama 1q32.1, 1q32.3, 1q42.13 i 1q44 prikazane crvenom crtkanom linijom na normalnom kromosomu) s posljedicom delecije čitave pruge 1q32.2 (prikazano sa desne strane der 1kromosoma). Pri tome je došlo do insercije segmenta 1q42.2q44 (označeno žutom bojom) na položaj deletirane pruge 1q32.2, na granici pruga 1q32.2 i 1q32.3 što je dovelo do distalnijeg položaja segmenata 1q32.3-q42.13 (označeno crvenom bojom) i 1q42.2q44. Telomerni segment (distalni dio pruge 1q44 označen plavom bojom) nije zahvaćen preraspodjelom.

**12. CRZ-047** – ženska ispitanica, 22 godine. Uputna dijagnoza: RIP, nerazvijen govor. GTG prugama postavljena je indikacija za daljinu analizu 17p11.2 kromosomske regije (Slika 32a.). FISH analizom potvrđena je delecija 17p11.2p11.2 kromosomske regije (Slika 32b.). Kod ispitanice je postavljena dijagnoza Smith-Magenis mikrodelecijskog sindroma.

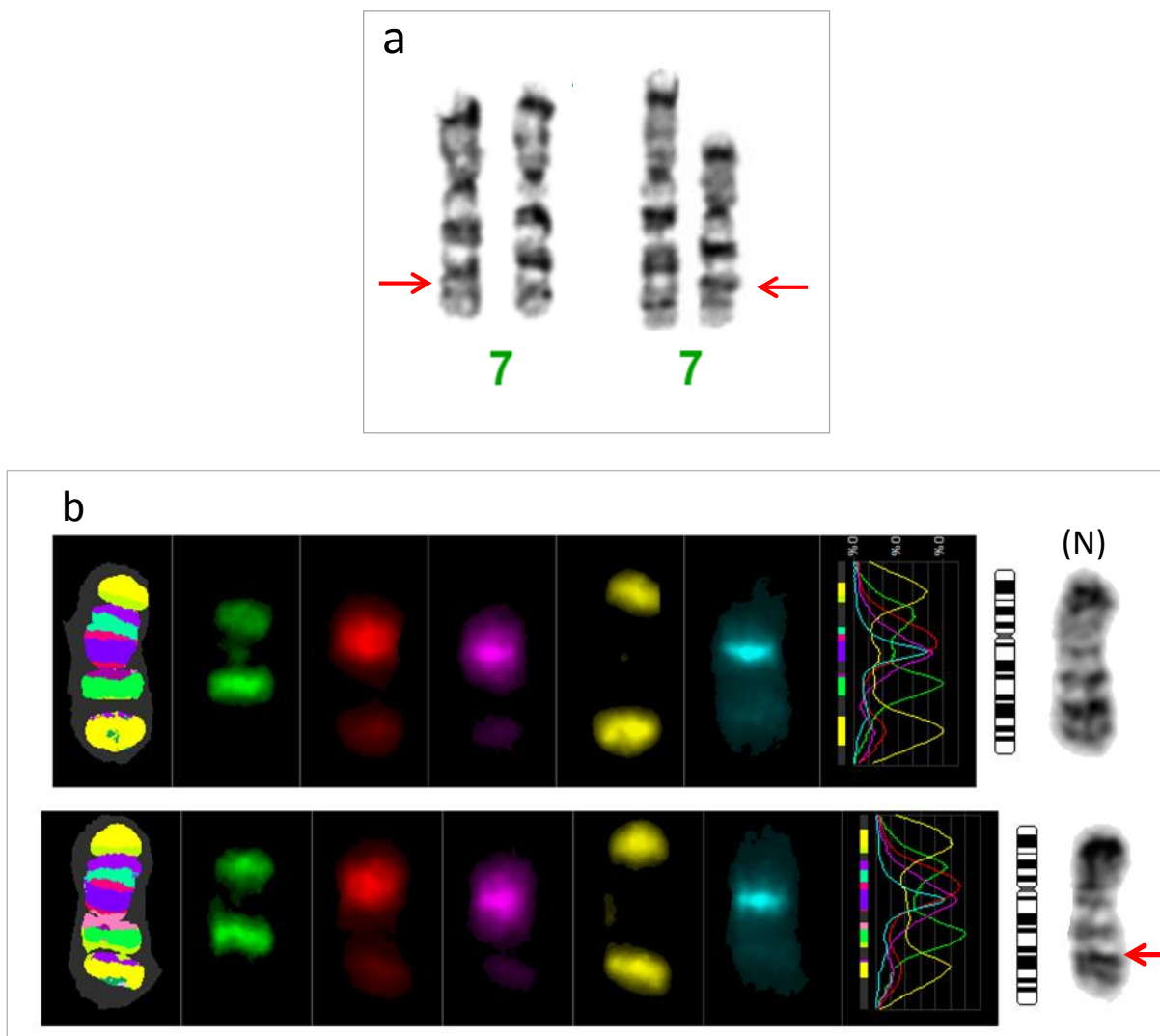
*Kariotip: 46,XX.ish del(17)(p11.2p11.2)(RAI-)*



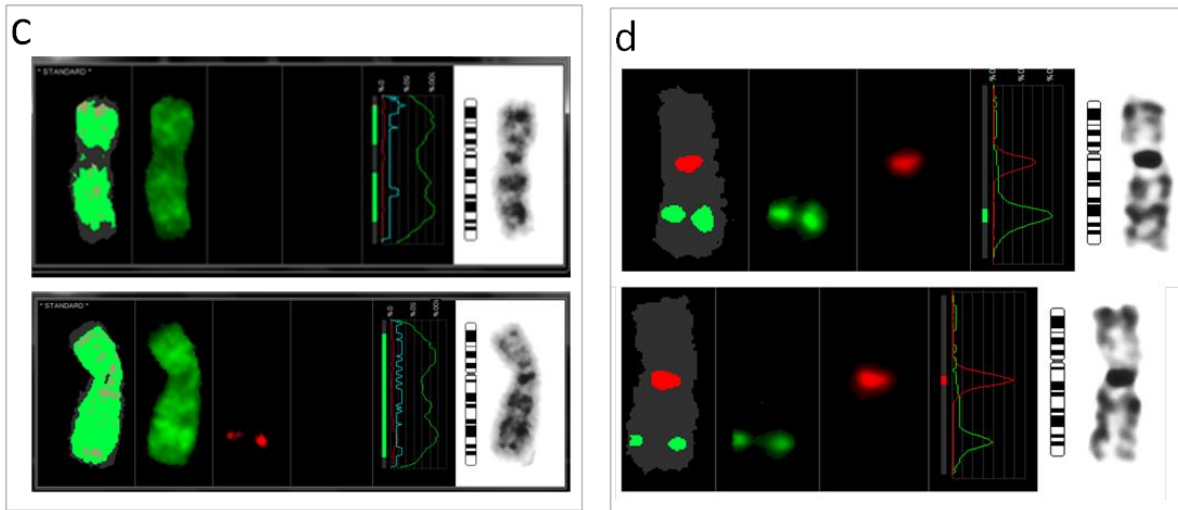
*Slika 32.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 17, crvena strelica označava 17p11.2. (b) FISH analiza (KBI-45101 Miller-Dieker LIS (17p13) SpectrumRed / Smith-Magenis RAI (17p11) SpectrumGreen, Kreatech) zelena strelica pokazuje kromosom s delecijom probe za PAFAH1B1/LIS1 gen.

**13. CRZ-060** – ženska ispitanica, 27 godina. Uputna dijagnoza: RIP, Ductus Bottalli. GTG prugama postavljena je indikacija za FISH analizu kromosoma 7 (Slika 33a.). MLPA analiza subtelomera (P036, P070) i mikrodelecijskih sindroma (P245, P297) pokazala je uredan nalaz. FISH analiza potvrdila je deleciju kromosomskog segmenta 7q31.31-q32.3 (Slika 33b.-33d.).

*Kariotip: 46,XX,del(7)(q31.31q32.3)*



*Slika 33.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 7, crvena zvjezdica označava aberantni kromosom. (b) MCB profil kromosoma 7 - crvena zvjezdica označava poziciju delecije.



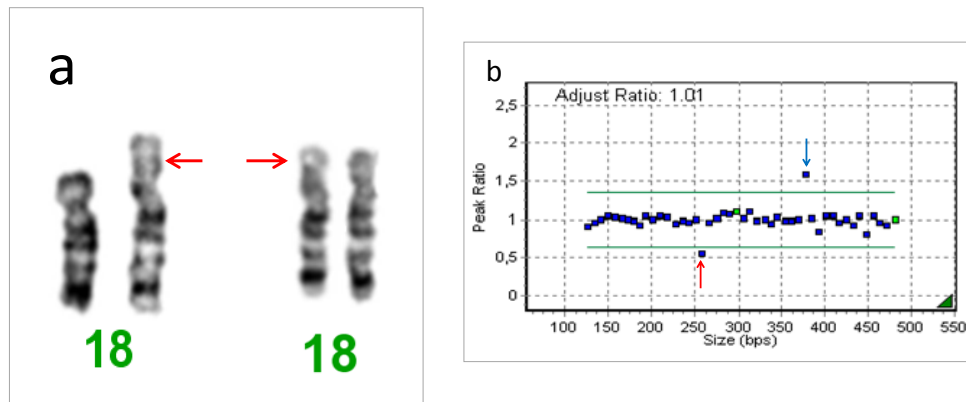
Slika 33. (c) Rezultat BAC FISH (RP11-193I70 (SpectrumGreen), WCP7 (BIO-FITC)) pokazuje prisutnost crvenog signala samo na jednom kromosomu. (d) Rezultat FISH analize upotrebom SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe, ZytoVision.

**14. ST-145** – muški ispitanik, 56 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Analizom kromosoma utvrđeni je mozaični kariotip 46,XX; 46,XY. FISH analizom (cep X i cep Y) potvrđen je mos 47,XXY/47,XYY/45,X/?45,Y/46,XY

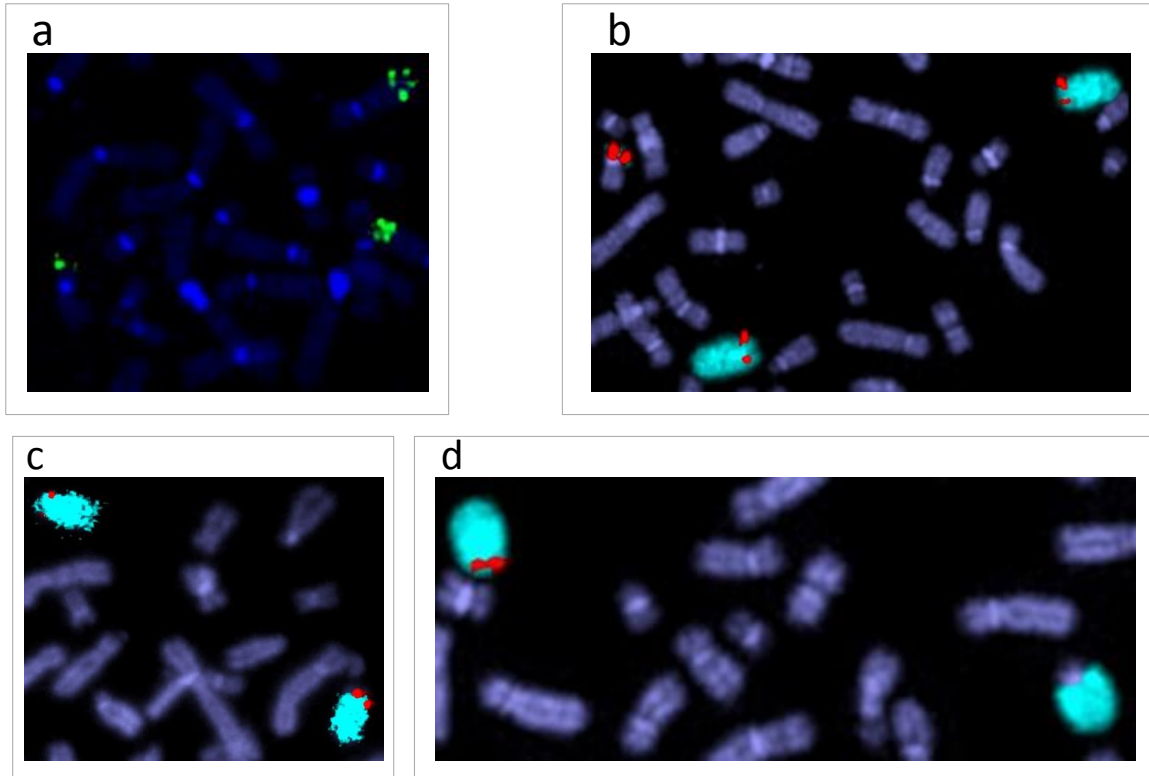
*Kariotip: mos 47,XXY/47,XYY/45,X/?45,Y/46,XY*

**15. CRZ-067** – ženska ispitanica, 33 godine. Uputna dijagnoza; RIP. Analizom kromosoma utvrđena je kromosomska preraspodjela koja zahvaća kromosom 18 (Slika 34a.). Radi utvrđivanja porijekla dodatnog materijala na kromosomu 18 učinjena je MLPA analiza subtelomera (Slika 34b.). FISH analizom utvrđena je veličina aberacije (Slika 35a – 35d.). Ispitnica ima segmentalnu trisomiju 10q24.3->qter i segmentalnu monosomiju 18p11.22->pter

*Kariotip:* 46,XX,der(18)t(10;18)(q24.3;p11.22)



*Slika 34.* (a) Parcijalni kariotip. Kromosom 18; crvena zvjezdica označava aberantni kromosom. (b) MLPA analiza subtelomera. Rezultat P036 MLPA kita, plava strelica označava probu za subtelomeru 10q, crvena strelica označava probu za subtelomeru 18p.



Slika 35. (a) BAC FISH analiza pokazuje duplikaciju probe RP11-56I23 (BIO-FITC). (b) BAC FISH i WCP 10 analiza pokazuju duplikaciju probe RP11-198M6 (DIG-Rhodamin – crveni signali) i segmenta WCP10 probe (DEAC – plava boja). (c) Uredan nalaz BAC FISH i WCP 18 analize (RP11-419J16/DIG-Rhodamin – crveni signal i WCP 18 DEAC – plava boja). (d) BAC FISH i WCP18 analiza pokazuje deleciju probe RP11-835E18 (DIG-Rhodamin – crveni signal) i segmenta WCP18 probe (DEAC – plava boja).



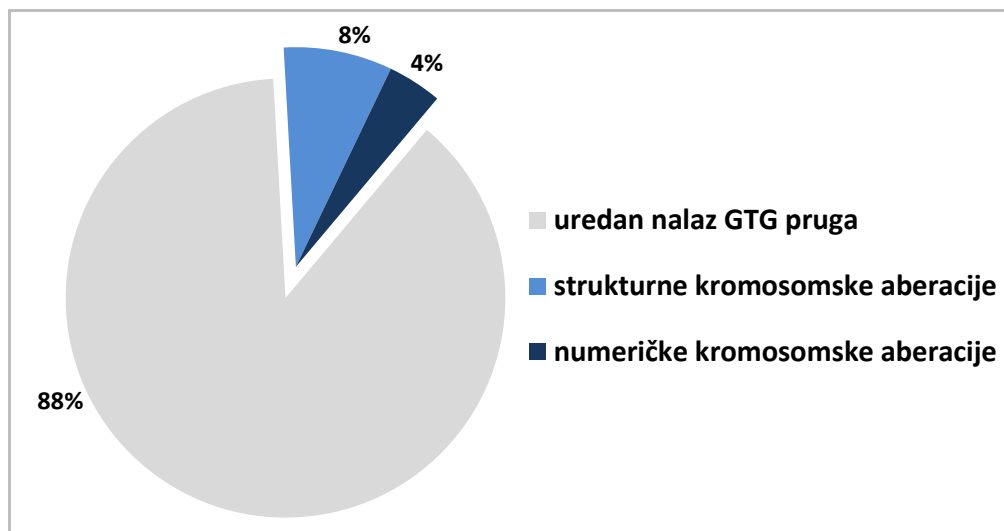
### 5.1.2. Aberacije detektirane GTG prugama kod ispitanika s dijagnozom ASD-a

GTG analiza kromosoma provedena je kod 24 ispitanika s dijagnozom ASD-a. Kod 3 ( ) ispitanika detektirane su kromosomske aberacije.

#### **Numerički i strukturni kromosomski poremećaji otkriveni kod ispitanika s dijagnozom ASD-a**

- 46,XX[58]/46,XX,r(22)(p12q13.3)[42]
- 46,XY,der(16)t(16;21)(p11.2;q11.2)mat
- 46,XX [99]/47,XX,-14,+r(14),+r(14)[1]

Kromosomske aberacije detektirane GTG analizom kod ispitanika s dijagnozom ASD-a bile su numeričke aberacije, 33% (1/3) i strukturne promijene, 67% (2/3) (Slika 78.).

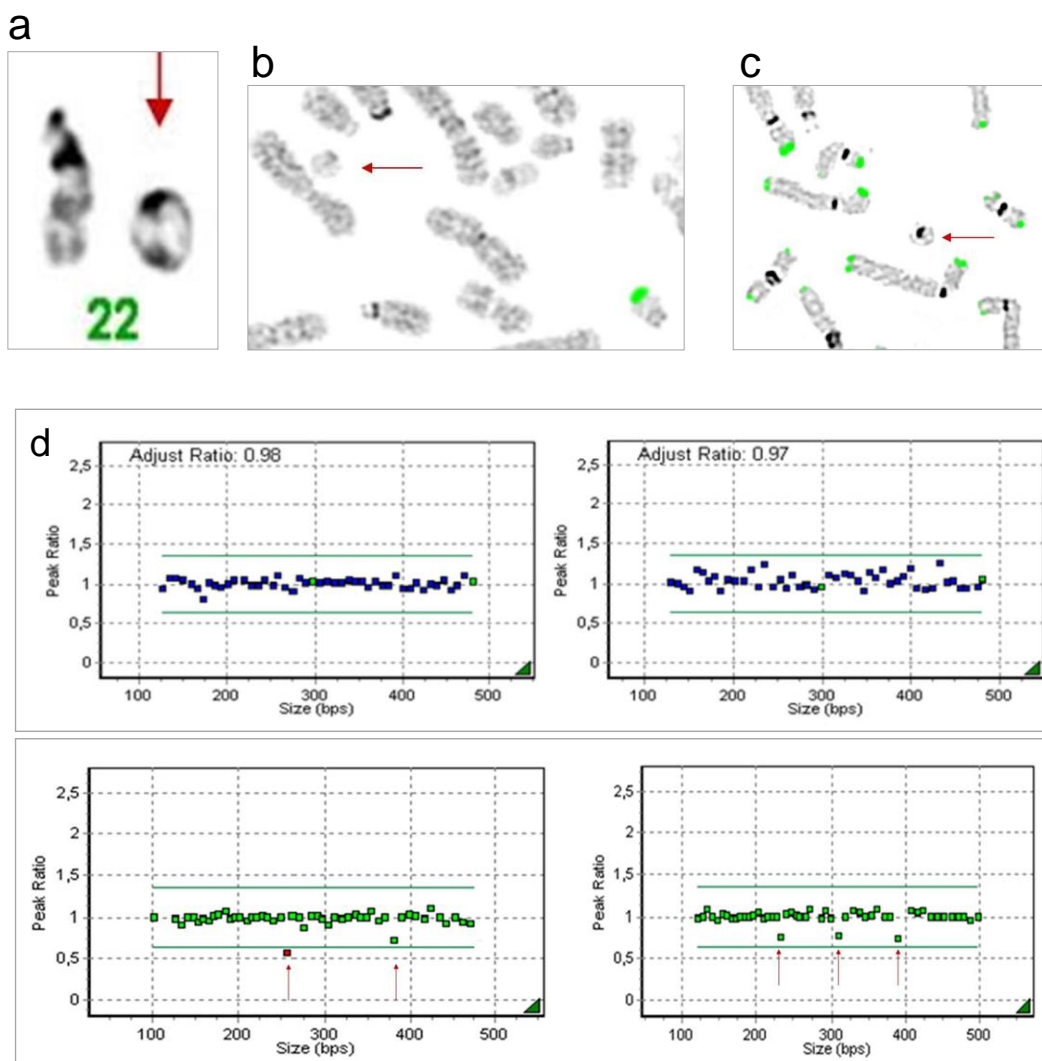


Slika 36. Kromosomske aberacije detektirane kod ispitanika s dijagnozom ASD-a

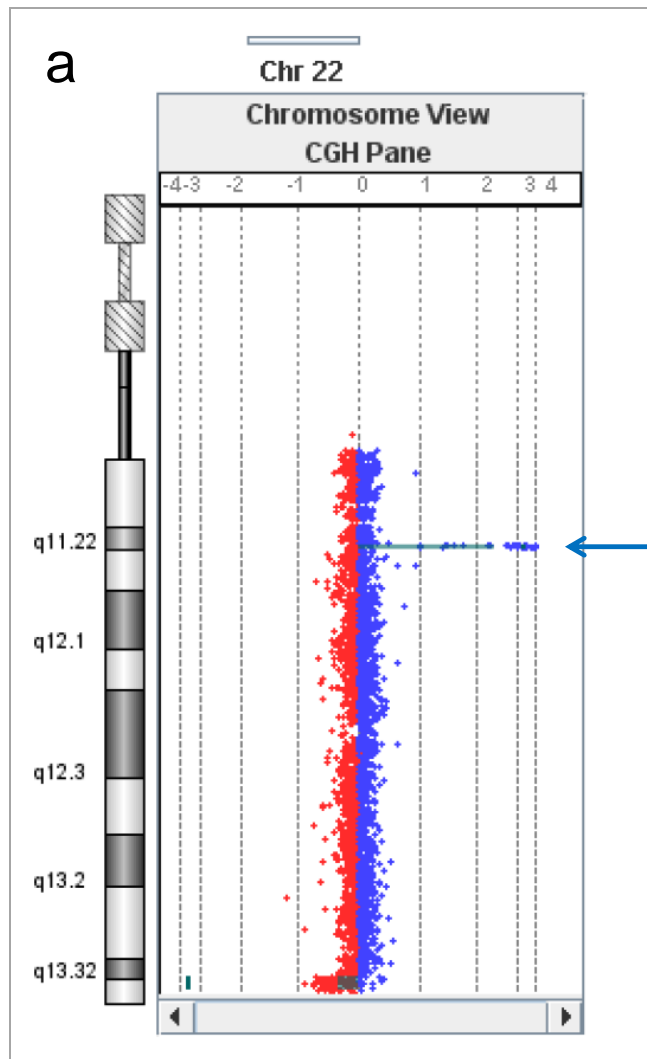
U nastavku poglavlja detaljno je opisan svaki pojedinačni nalaz numeričkih i strukturnih kromosomski poremećaja otkriveni GTG analizom kod ispitanika s dijagnozom ASD-a, te su navedene sve dodatne analize (FISH, MLPA, sekvenciranje ili aCGH) učinjene u svrhu precizne molekularne karakterizacije otkrivenih aberacija.

**1. ERF-012** – ženska ispitanica, 3 godine. Uputna dijagnoza: ASD. Analizom kromosoma nađen je ring kromosom 22 u 42% analiziranih metafaza (Slika 37a.). FISH analizom utvrđena je delecija 22q regije ring kromosoma (Slika 37b. i 37c.). MLPA skrining subtelnim setovima proba pokazao je normalan rezultat, dok su setovi proba za mikrodelecijske sindrome i autistični spektar pokazali deleciju SHANK3 gena (Slika 37d.). ArrayCGH analizom potvrđena je delecija 22q kromosomske regije, te je precizno utvrđena veličina delecije od 0,8 Mb i genski sadržaj (Slika 38.)

*Kariotip:* 46,XX[58]/46,XX,r(22)(p12q13.3)[42]



*Slika 37.* (a) Parcijalni kariotip. Crvena strelica označava ring kromosom 22. (b) FISH analiza subtelnere 22q (ST 22q SpectrumGreen, Kreatech) pokazuje deleciju na ring kromosomu (označen crvenom strelicom). (c) FISH analiza fizičkih telomera (PAN FISH, Dako) pokazuje deleciju na ring kromosomu (označen crvenom strelicom).



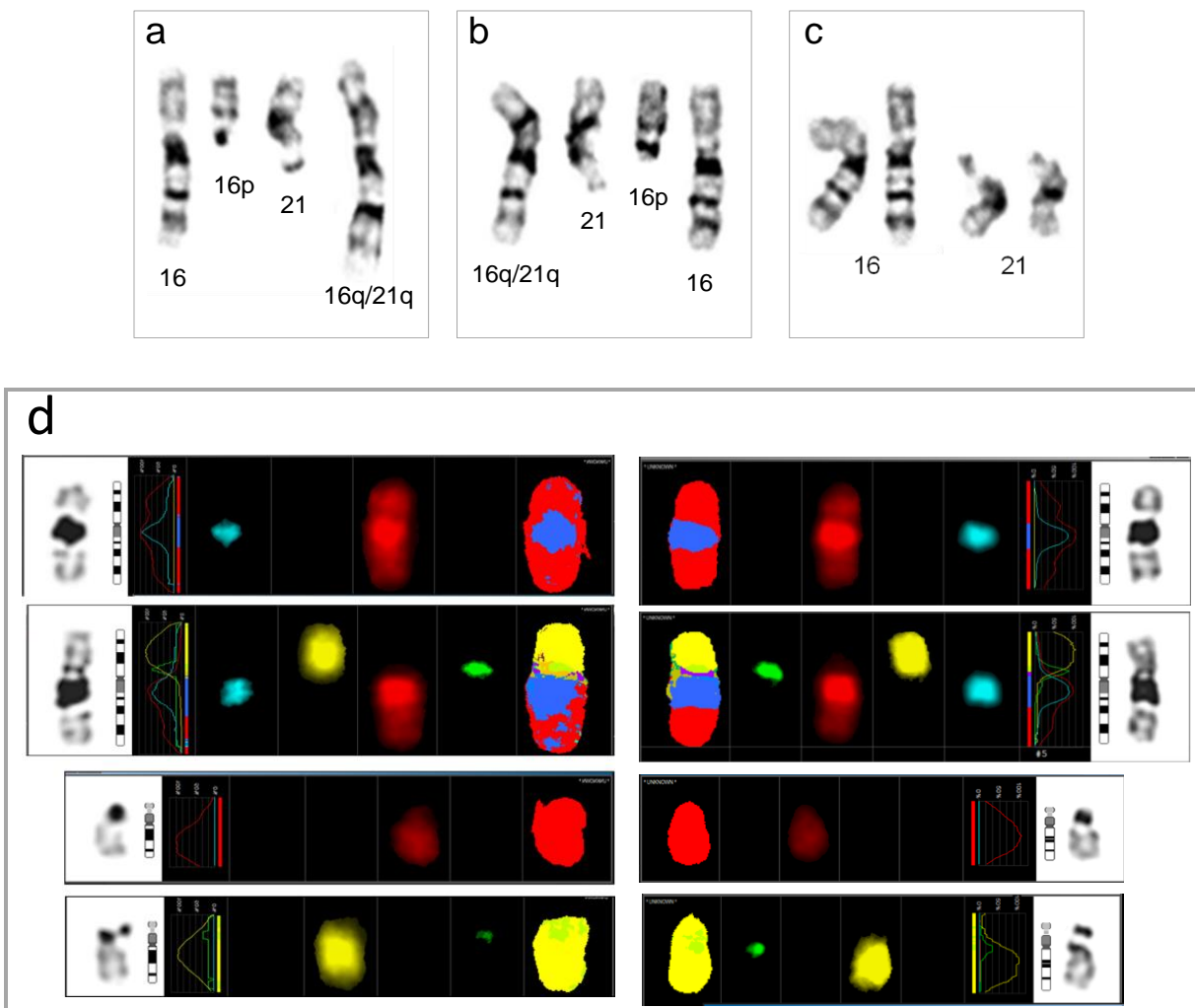
**b**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr22	q11.22	21386562	21520213	2,662485	0	* ALG12, CRELD2, PIM3, IL17REL, TTLL8, MLC1, MOV10L1, PANX2, TRABD, SELO, TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, MAPK11, PLXNB2, FAM116B, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2, NCAPH2, SCO2, TYMP, ODF3B, KLHDC7B, C22orf41, CHKB, CPT1B, LOC100144603, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR
chr22	q11.22	21520273	21575888	2,921657	0	
chr22	q13.33	48687314	49525130	0	-0,3738	

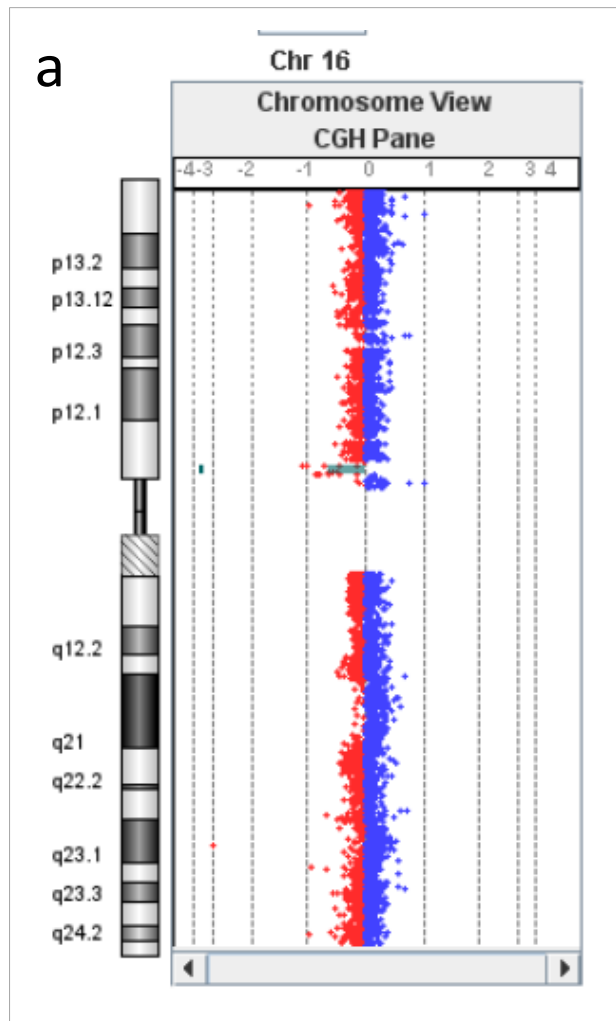
*Slika 38.* (a) Shematski prikaz arrayCGH rezultata za kromosom 22. Plava strelica označava dodatno detektiranu duplikaciju dijela 22q11.22 pruge bez gena. (d) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te ukupan popis gena zahvaćene subtelermerne regije 22q13.33. Plava zvjezdica označava dupliciranu 22q11.22 regiju bez gena.

**2. ERF-021** muški ispitanik, 6 godina. Uputna dijagnoza: ASD (Atipičan autizam), umjereni RIP, Poremećaj razvoja govora i jezika, nespecifičan. Analizom kromosoma utvrđen je kromosomska translokacija koji zahvaća kromosome 16 i 21 (Slika 39a.). Analizom roditelja utvrđeno je da je kromosomska translokacija nasljeđena od majke (Slika 39b. i 39c.). MLPA analiza subtelomera (P036, P070), mikrodelecijskih sindroma (P245, P297) i set proba za autizam (P343) pokazala je uredan nalaz. FISH analiza pokazala je balansirani strukturalni poremećaj (Slika 39d.). ArrayCGH analizom kod ispitanika utvrđena je delecija veličine 1Mb na 16p11.2 za koju su poznate varijacije u broju kopija kod zdravih kontrola (Slika 40a. i 40b.).

*Kariotip: 46,XY,der(16)t(16;21)(p11.2;q11.2)mat*



Slika 39. (a) Parcijalni kariotip ispitanika. (b) Parcijalni kariotip mame. (c) Parcijalni kariotip tate. (d) FISH analiza (WCP 16/DIG-Rhodamin crveni signal; CEP16/DEAC plavi signal; WCP21/BIO-Cy5 žuti signal; cep 21/SpectrumGreen zeleni signal) Lijeva strana slike prikazuje parcijalni kariotip mame, desna strana slike prikazuje parcijalni kariotip ispitanika.



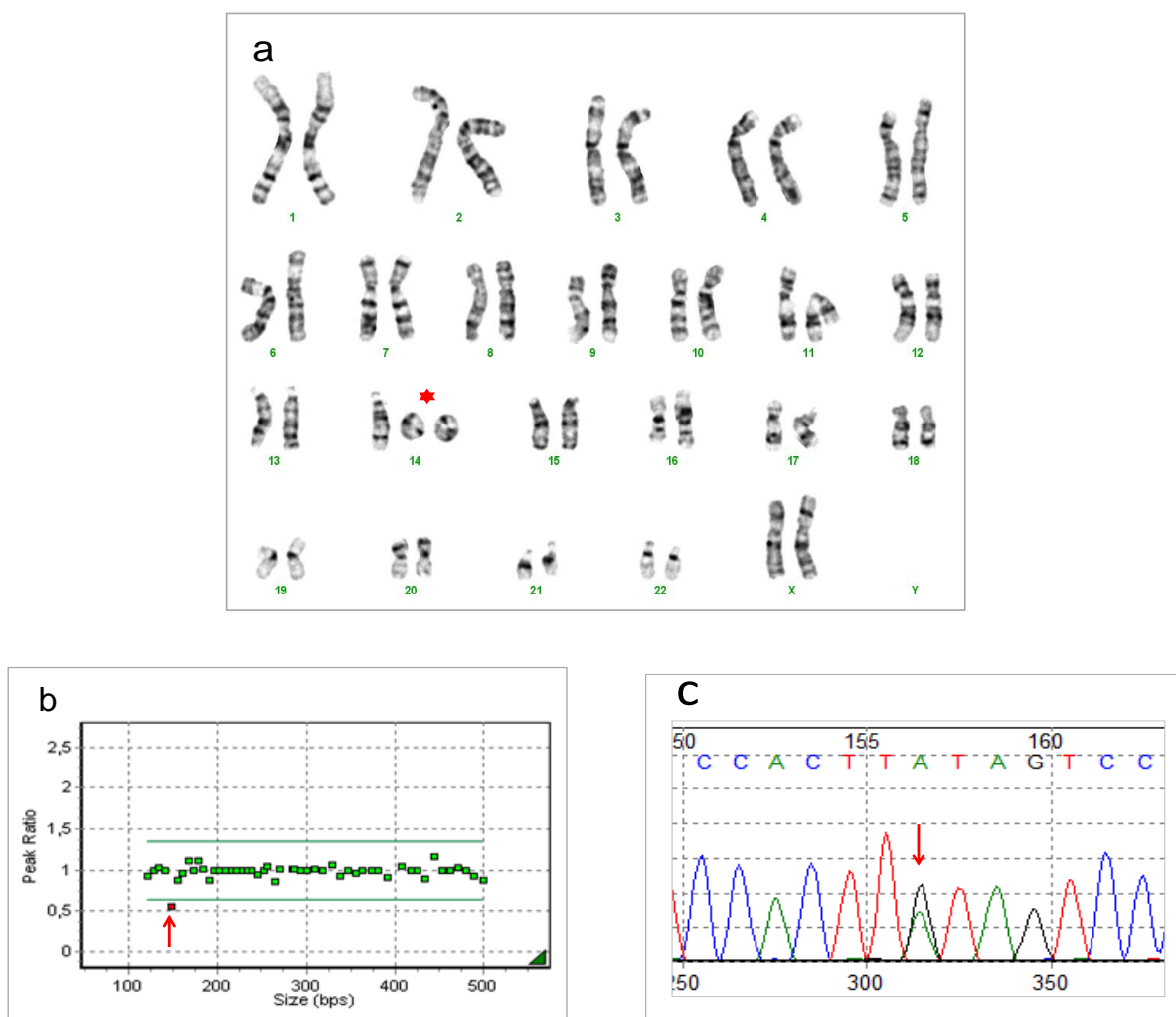
**b**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr16	p11.2	32481309	33507556	0.000000	-0.674974	LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P

Slika 40. (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 16. (b) Pozicija i veličina detektirane delecije, te popis gena zahvaćene regije 16p11.2

**3. ERF-022** – ženska ispitanica, 5 godina, Uputna dijagnoza: ASD, umjereni RIP, Poremećaj hiperaktivnosti povezan s RIP-om i stereotipnim pokretima. Analizom kromosoma utvrđen je ženski kariotip u većini analiziranih stanica, s izuzetkom jedne s dva ring kromosoma 14. (Slika 41a.). Daljnjom FISH analizom nije bilo moguće potvrditi ring kromosom 14. Sveukupno je analizirano 100 metafaza. MLPA analiza subtelomera (P036 i P070) i mikrodelecijskih sindroma (P245 i P297) pokazala je uredan nalaz. Radi uputne dijagnoze ASD-a učinjena je MLPA analiza setom proba za autizam koja je pokazala deleciju egzona 9(7) GABRB3 gena (Slika 41b.). Sekvenciranjem dijela egzona 9(7) GABRB3 gena unutar kojeg se nalazi deletirana MLPA proba utvrđena je mutacijska promjena A>AG (19348A>AG) (Slika 41c.).

*Kariotip:46,XX [99]/47,XX,-14,+r(14),+r(14) [1]*

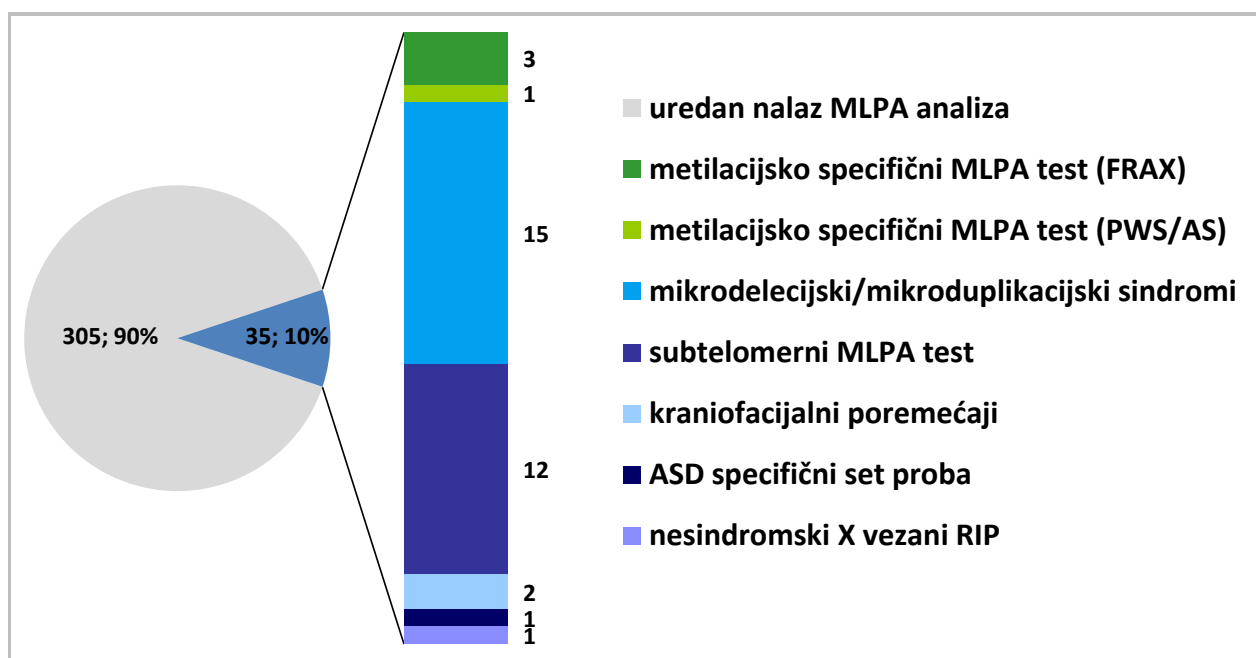


*Slika 41.* (a) Kariogram. Crvena zvjezdica označava ring kromosome 14. (b) MLPA analiza P343 seta proba pokazala je deleciju egzona 9(7) GABRB3 gena (označeno crvenom strelicom). (c) Sekvenciranjem dijela egzona 9(7) GABRB3 gena detektirana je mutacijska promjena A>AG (označena crvenom strelicom) unutar sekvece MLPA probe.

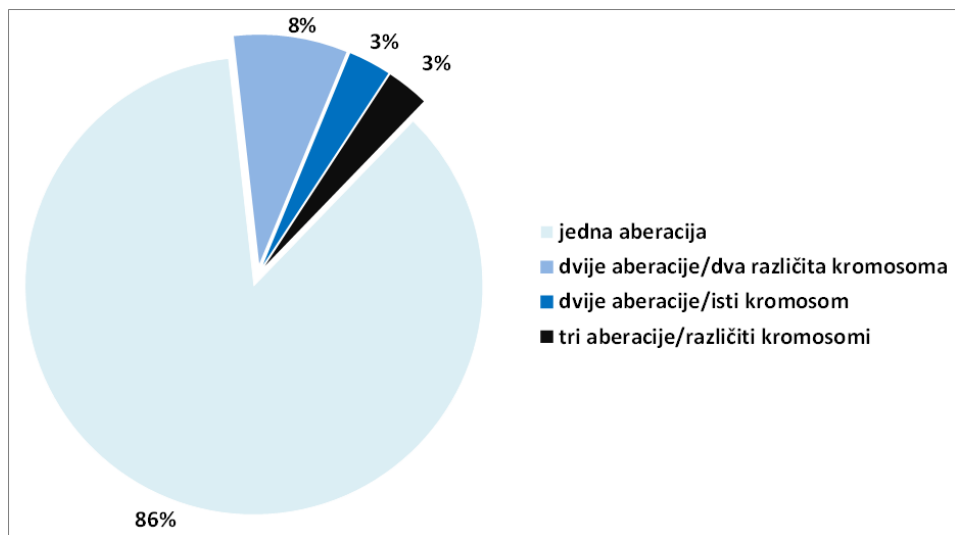
## 5.2. Aberacije detektirane MLPA analizom

### 5.2.1. Aberacije detektirane MLPA analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP i urednim nalazom GTG analize

MLPA analiza provedena je kod 340 ispitanika s dijagnozom RIP-a uz prethodno uredan nalaz GTG analize. MLPA analizom otkriveno je 39 kromosomskih aberacija kod ukupno 10,3% ispitanika s dijagnozom RIP-a (35/340) (Slika 42a.). U 86% slučajeva (30/35) otkrivena je jedna kromosomska aberacija. U 8% slučajeva (3/35) detektirane su dvije aberacije koje zahvaćaju dva različita kromosoma. U 3% slučajeva (1/35) detektirane dvije kromosomske aberacije istog kromosomskog segmenta (delecija dijela gena i promjene metilacijskog statusa). U 3% slučajeva (1/35) detektirane su tri aberacije istog kromosoma, ali različitih kromosomskih segmenata. Grafički prikaz rezultata nalazi se na slici 42b.



Slika 42a. Rezultati MLPA analize kod ispitanika s dijagnozom RIP-a. Na slici je prikazan broj ispitanika dijagnosticiran po pojedinim MLPA setovima proba.



Slika 42b. Grafički prikaz rezultata MLPA analize po broju aberacija detektiranih kod ispitanika s aberantnim MLPA nalazom. Ukupno je otkriveno 39 kromosomskih aberacija kod 35 ispitanika.

Popis aberacije detektiranih MLPA analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP i urednim nalazom GTG analize.

***Mikrodelecijski sindromi – detektirana je delecija 17 gena, te duplikacija 6 gena i duplikacija jedne kromosomske regije***

- delecija CD160 gena (gen unutar kromosomske regije TAR sindroma)
- delecija CLDN5 i GP1BB gena (DiGeorge sindrom)
- delecija CRR9 gena (Cri-du-chat sindrom)
- delecija CRR9 i TERT gena (Cri-du-chat sindrom)
- delecija DMD gena (Duchenne mišičina distrofija)
- delecija ELN i LIMK1 gena (Williams sindrom)
- delecija LLGL1, LPRC48 i RAI1 gena (Smith-Magenis sindrom)
- delecija NDN, SNPRN i UBE3A gena (Prader-Willi-Angelman sindrom)
- delecija SEMA7A gena (15q24 mikrodelecijski sindrom)
- delecija SNAP29 gena (DiGeorge sindrom)
- duplikacija 1q21.1 regije (1q21.1 mikroduplikacijski sindrom)
- duplikacija 1q21.1 regije (1q21.1 mikroduplikacijski sindrom)
- duplikacija CHRNA7 gena (gen unutar 15q13 mikrodelecijskog sindroma)
- duplikacija CLDN5, GP1BB i SNAP29 gena (22q11.21 mikroduplikacijski sindrom)
- duplikacija SNAP29 gena/duplikacija CHRNA7 gena (gen unutar kromosomske regije DiGeorg sindroma/gen unutar 15q13 mikrodelecijskog sindroma)



**Kraniofacijalni poremećaji – detektirana je 1 delecija i 2 duplikacije**

- duplikacija FGFR3 gena (4p16.3)/duplikacija egzona 3, 4 i 7 RUNX2 gena (6p21)
- delecija egzona 1 MSX2 gena

**Telomere – detektirano je 8 delecija i 4 duplikacije**

- delecija 1p36
- delecija 3p26.3
- delecija 4q35
- delecija 8q24.3
- delecija 13q34
- delecija 19q13
- delecija 21q22.3
- delecija SYBL1 gena
- duplikacija 5p\*
- duplikacija 15q11
- duplikacija 17p13.3
- duplikacija 22q13.33

**FRAX – detektirane su 4 kromosomske aberacije (3 metilacijske promjene i 1 delecija)**

- metilacija promotora FMR1 gena\*
- metilacija promotora FMR1 gena
- delecija egzona 1 FMR1 gena/metilacija promotora FMR1 gena

**MRX – nesindromski – detektirane su duplikacije 3 gena**

- duplikacija RPS6KA3 (Xp22.12), ARX (Xp21.3) i GDI1 (Xq28) gena

**Prader Wili/Angelman sindrom – detektirana je 1 kromosomska aberacija**

- Angelman sindrom (UPD)

**ASD – delecija 1 egzona gena**

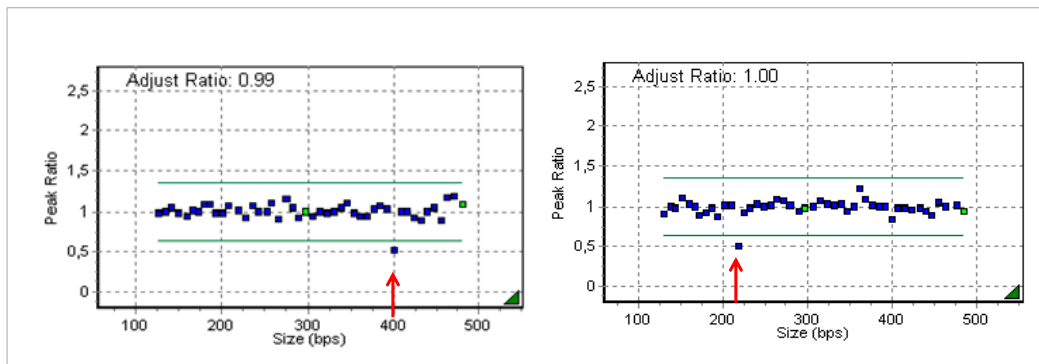
- delecija egzona 9(7) GABRB3 gena

---

\* ispitanika ST-106 (dvije kromosomske aberacije)

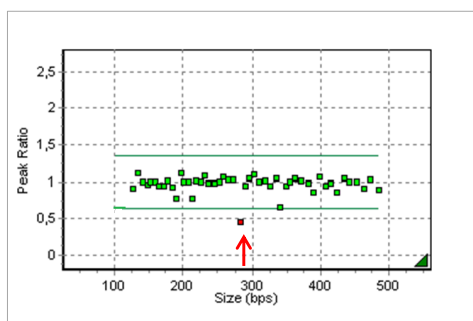
U nastavku poglavlja detaljno je opisan svaki pojedinačni aberantni nalaz MLPA analize kod ispitanika s dijagnozom RIP-a uz prethodno uredan nalaz GTG analize. U slučajevima gdje je bila potrebna precizna molekularne karakterizacije otkrivenih aberacija provedene su dodatne analize (FISH, MLPA, sekvenciranje ili aCGH) koje su prikazane kod svakog pojedinačnog slučaja.

**1. ST-002** – ženska ispitanica, 34 godine. Uputna dijagnoza: RIP, encefalopatija, mikrocefalija. Kultura limfocita nije rasla u 3 navrata. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je delecija 13q34 kromosomskog segmenta koja je potvrđena P070 setom proba (Slika 43.).



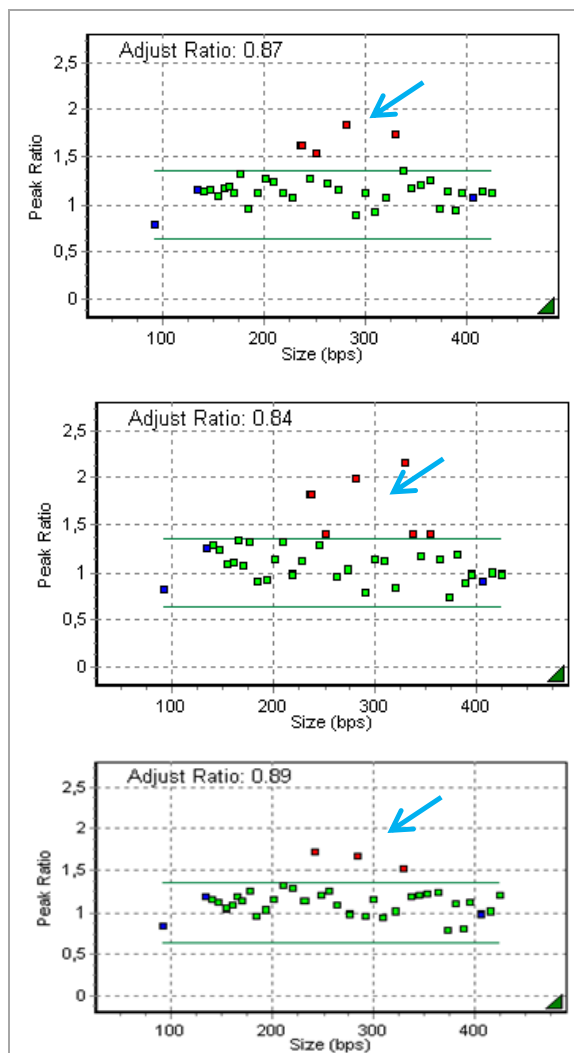
Slika 43. MLPA analiza subtelomera. Lijevo je prikazan rezultat P036 MLPA seta proba, na desnoj strani prikazan je rezultat P070 MLPA seta proba. Crvena strelica označava MLPA probu za 13q34.

**2. ST-175** – ženska ispitanica, 52 godine. Uputna dijagnoza. RIP. Uredan nalaz GTG pruga. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba (P245) utvrđena je delecija CRR9 gena i postavljena dijagnoza Cri du Chat sindroma (Slika 44.).



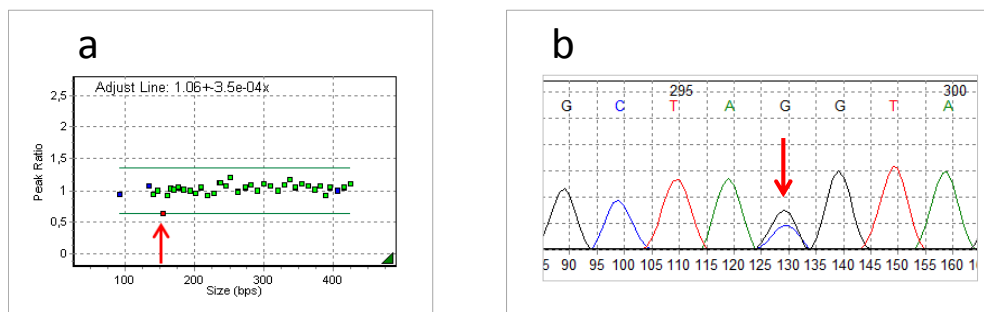
Slika 44. MLPA mikrodelecijski set proba P245. Crvena strelica označava probu za CRR9 gen.

**3. ST-001** – ženska ispitanica, 26 godina. Uputna dijagnoza; RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analizom seta proba za craniofacijalne poremećaje utvrđena je duplikacija FGFR3 gena i duplikacija egzona 3, 4 i 7 RUNX2 gena (u tri različita ponovljena eksperimenta) (Slika 45.). Array CGH analizom nije utvrđena duplikacija navedenih genskih regija. Sekvenciranjem FGFR3 i RUNX2 gena nisu pronađene mutacije.



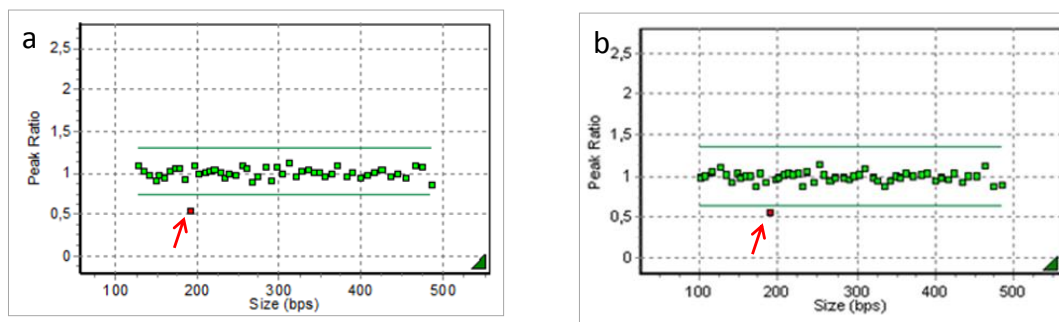
Slika 45. MLPA analiza P080 seta proba. Plava strelica označava probe za FGFR3 gena i egzona 3, 4 i 7 RUNX2 gena.

**4. ST-018** – muški ispitanik, 35 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize G-pruga. MLPA analizom setom proba za kraniofacijalne poremećaje utvrđena je delecija egzona 1 MSX2 gena (Slika 46a.). Sekvenciranjem dijela egzona 1 MSX2 gena utvrđena je mutacijska promjena na jednom lancu C>CG na 13. po redu nuklotidu MLPA probe (19348A>AG) (Slika 46b.).



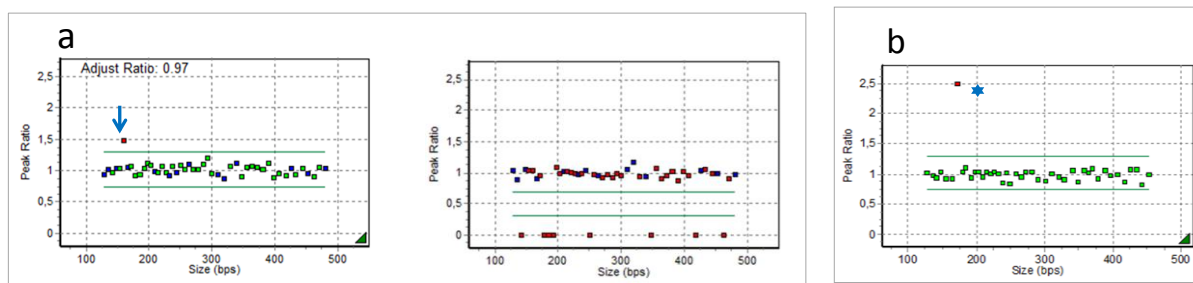
Slika 46. (a) MLPA analiza P080 seta proba. Crvena strelica označava probu za MSX2 gen. (b) Sekvenciranjem egzona 1 MSX2 gena utvrđena je mutacijska promjena C>CG označena crvenom strelicom.

**5. ST-015** – muški ispitanik, 20 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize G-pruga. MLPA analizom za mikrodelecijske sindrome (P245) detektirana je delecija SEMA7A gena u dva odvojena eksperimenta (Slika 47.). ArrayCGH analizom nije utvrđena delecija SEMA7A gena. Sekvenciranjem SEMA7A gena nisu utvrđene mutacijske promjene.



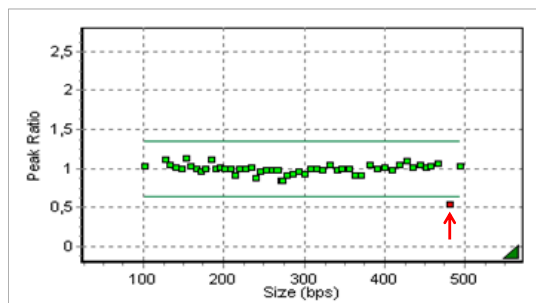
Slika 47. MLPA mikrodelecijski set proba (P245). Proba za SEMA7A gen označena je crvenom strelicom (a) prvi eksperiment i (b) drugi eksperiment.

**6. ST-008** muški ispitanik, 42 godine, Uputna dijagnoza: RIP uz kliničku sliku Angelman sindroma. Uredan nalaz analize GTG pruga. Radi uputne dijagnoze napravljena je MS-MLPA analiza koja je pokazala duplikaciju egzona 7 UBE3A gena, te aberantni metilacijski profil PW/AS kromosomske regije. Prema rezultatima metilacijskog profiliranja obje genske kopije su metilirane (Slika 48a.). Dodatna analiza UBE3A gena zasebnim setom proba (P336) pokazala je normalan rezultat (Slika 48b.). Ispitanik ima uniparentnu disomiju kromosoma 15 i postavljenu dijagnozu Angelman sindroma.



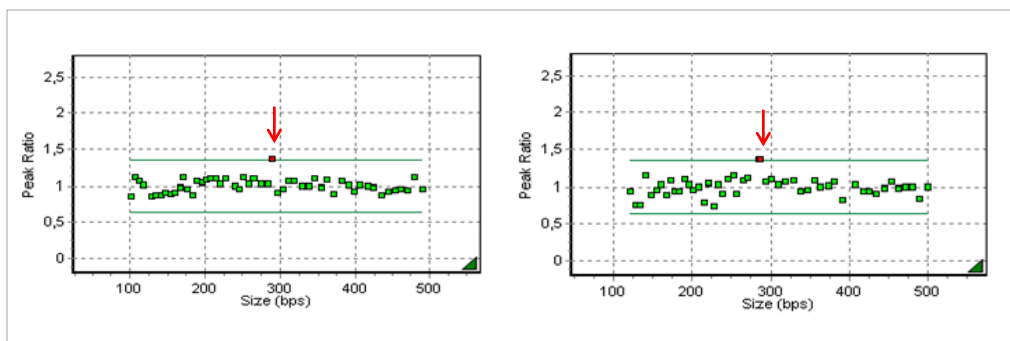
*Slika 48.* (a) MS-MLPA analiza broja kopija (lijeva strana slike) pokazuje duplikaciju egzona 7 UBE3A gena (plava strelica), metilacijsko profiliranje (desna strana slike) pokazuje dvije nemetilirane kopije SNPRN i NDN gena. (b) MLPA analiza UBE3A gena. Plava zvjezdica označava MTHFR 677C>T variantu (A222V mutacija).

**7. ST-199** – ženska ispitanica, 41 godina. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba (P245) utvrđena je delecija egzona 12 SATB2 gena (Slika 49.). Sekvenciranjem egzona 12 SATB2 gena nisu utvrđene mutacijske promijen.



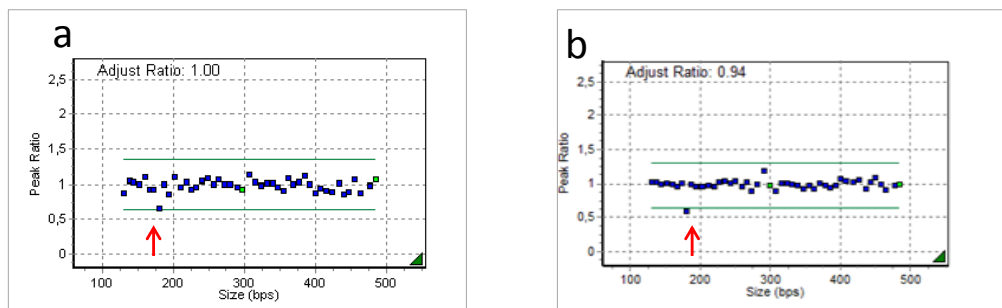
*Slika 49.* MLPA mikrodelecijski set proba P245. Crvena strelica označava probu za egzon 12 SATB2 gena.

**8. ST-090** – muški ispitanik, 56 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analizom za mikrodelecijske sindrome (P297) detektirana je duplikacija CHRNA7 gena, koja je potvrđena MLPA analizom P343 setom proba (Slika 50.)



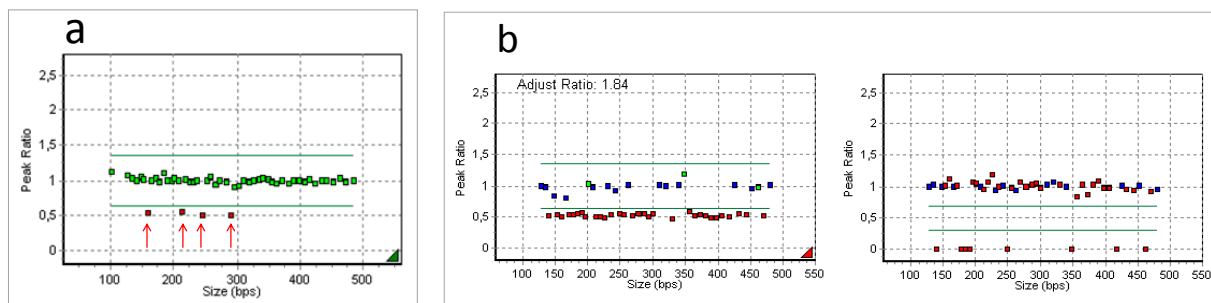
*Slika 50.* MLPA mikrodelecijski set proba (lijeva strana slike) i MLPA analiza setom proba za autizam (desna strana slike). Crvene strelice označavaju probe za CHRNA7 gen.

**9. ST-171** – ženska ispitanica, 45 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. Subtelomernom analizom P070 setom proba u dva odvojena eksperimenta utvrđena je delecija 8q24.3 (Slika 51a. i 51b.). Analizom P036 setom proba dobiven je normalan nalaz.



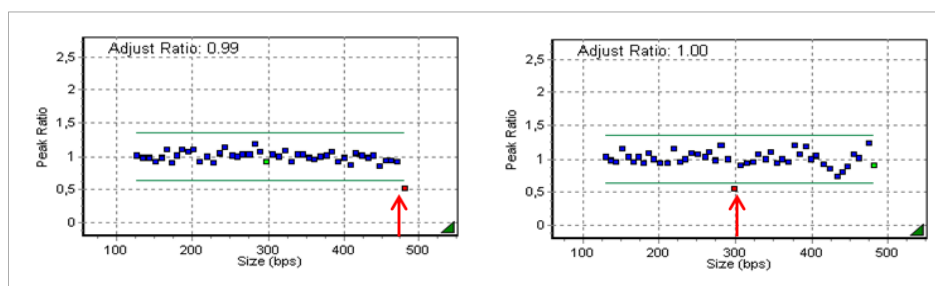
*Slika 51.* Subtelomerna MLPA analiza P070 setom proba. (a) prvi eksperiment (b) drugi eksperiment. Crvena strelica označava MLPA probu za 8q24.3.

**10. ST-062** – ženska ispitanica, 27 godina. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom za mikrodelecijske sindrome (P245) detektirana je delecija NDN, SNPRN i UBE3A gena (Slika 52a.). MS-MLPA analizom potvrđena je delecija nemetilirane kopije navedenih gena (Slika 52b.). Kod ispitanice je postavljena dijagnoza Angelman sindroma.



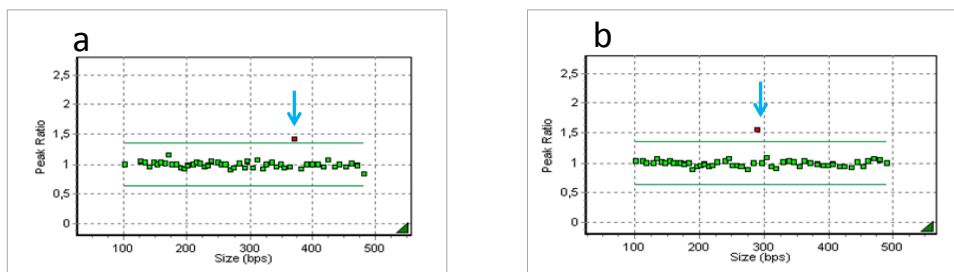
Slika 52. (a) MLPA mikrodelecijski set proba (P245). Delecija NDN, SNPRN i UBE3A gena označena crvenim strelicama. (b) MS-MLPA analiza. Lijeva strana slike prikazuje analizu broja kopija, desna strana metilacijsko profiliranje. Deletirane su metilirane kopije NDN, SNPRN i UBE3A gena.

**11. ST-095** – muški ispitanik, 54 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je delecija SYBL1 gena koja je potvrđena P070 MLPA setom proba (Slika 53.).

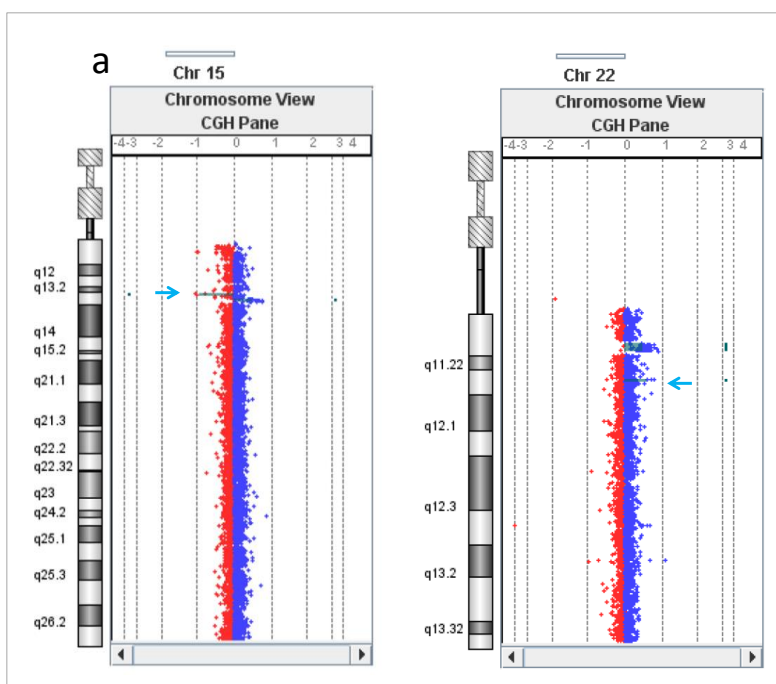


Slika 53. MLPA analiza subtelomera. Lijevo je prikazan rezultat P036 MLPA seta proba, na desno strani prikazan je rezultat P070 MLPA seta proba. Crvena strelica označava MLPA probu za SYBL1 gen

**12. ST-070** – ženska ispitanica, 38 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG pruga. MLPA analizom za mikrodelecijske sindrome utvrđena je duplikacija SNAP29 gena (P245), te duplikacija CHRNA7 gena (P297) (Slika 54a. i 54b.). ArrayCGH analizom potvrđena je duplikacija CHRNA7 gena, te je utvrđena duplikacija veličine 43 Kb na 22q11.23 koja uključuje i SNAP29 gen (55a. i 55b.).



Slika 54. (a) MLPA mikrodelecijski set proba (P245) plava strelica označava probu za SNAP29 gena. (b) MLPA mikrodelecijski set proba (P297) plava strelica označava probu za CHRNA7 gena.

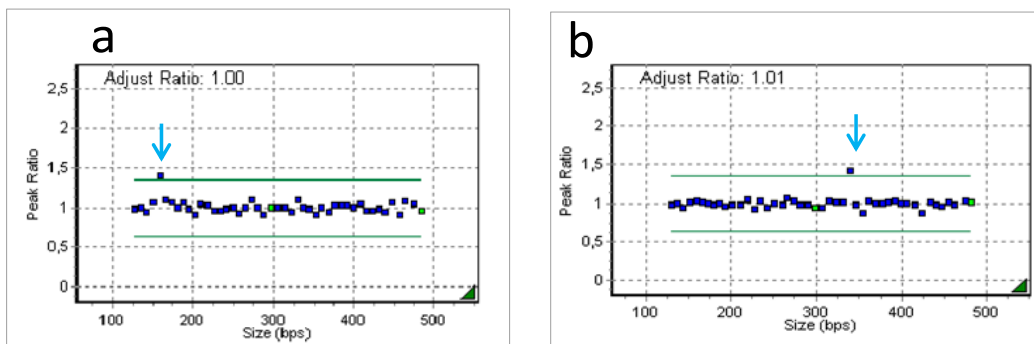


Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr15	q13.2	28731195	28758881	0	-0,936062	★
chr15	q13.3	29809025	30298155	0,501326	0	CHRNA7
chr22	q11.21	19049112	19794119	0,499715	0	ZNF74, SCARF2, KLHL22, MED15, POM121L4P, TMEM191A, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, FLJ39582, MGC16703, P2RX6, SLC7A4, P2RX6P, LOC400891
chr22	q11.23	22677959	22720254	0,610635	0	★ LOC391322, GSTT1, GSTT2

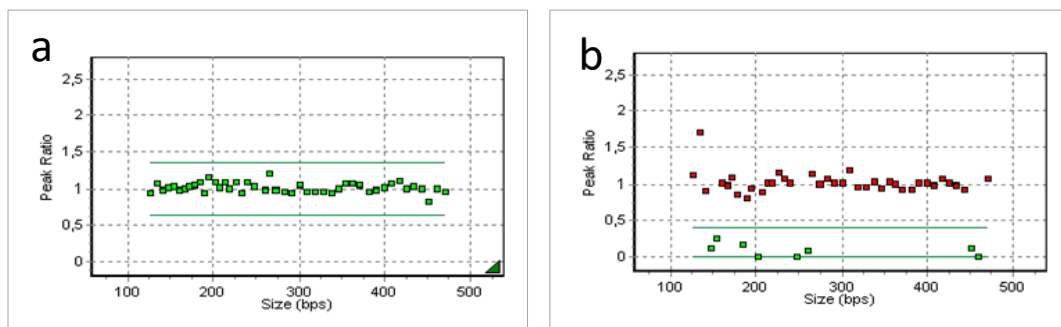
Slika 55. (a) Shematski prikaz arrayCGH rezultata za kromosome 15 i 22. Plava strelica označava dodatno otkrivene aberacije. (b) Pozicija i veličina detektiranih aberacija, te popis svih gena zahvaćenih regija. Plava zvjezdica označava dodatno otkrivene aberacije.



**13. ST-106** – muški ispitanik, 13 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je duplikacija 5p koja je potvrđena P070 MLPA setom proba (Slika 56a. i 56b.). MLPA analizom setom proba za FRAX utvrđena je metilacija FMR1 gena te je postavljena dijagnoza Fragilnog X sindroma (Slika 57a. i 57b.).

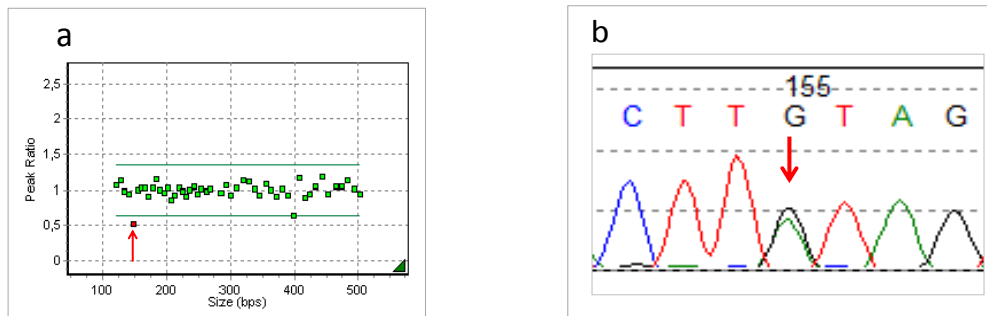


Slika 56. (a) MLPA analiza subtelomera (P036 set proba). Plava strelica označava probu za 5p. (b) MLPA analiza subtelomerna (P070 set proba). Plava strelica označava probu za 5p.



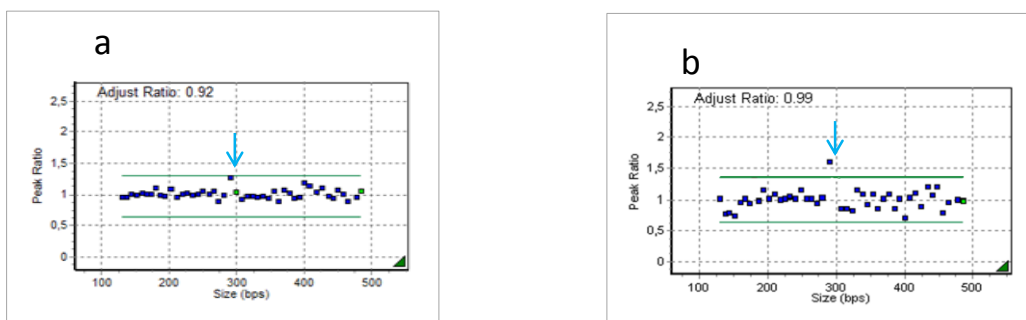
Slika 57. MS-MLPA analiza. (a) Normalan rezultat analize broja kopija. (b) Metilacija promotora FMR1 gena.

**14. ST-141** – muški ispitanik, 33 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analiza setom proba za ASD pokazala je deleciju egzona 9(7) GABRB3 gena (Slika 58a.). Sekvenciranjem dijela egzona 9(7) GABRB3 gena unutar kojeg se nalazi deletirana MLPA proba utvrđena je mutacijska promjena A>AG (Slika 64b.).



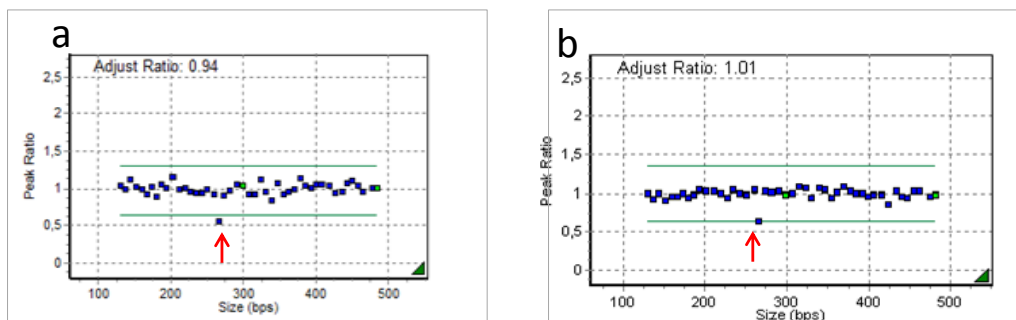
*Slika 58.* (a) MLPA analiza setom proba za ASD. Crvena strelica označava probu za GABRB3 gen.(b) Sekvenciranjem dijela egzona 9(7) GABRB3 gena detektirana je mutacijska promjena A>AG (označena crvenom strelicom) unutar sekvece MLPA probe.

**15. ST-153** – muški ispitanik, 37 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. Subtelomernom analizom P070 setom proba u dva odvojena eksperimenta utvrđena je duplikacija 22q13.33 (Slika 59a. i 59b.). Analizom P036 setom proba dobiven je normala nalaz.



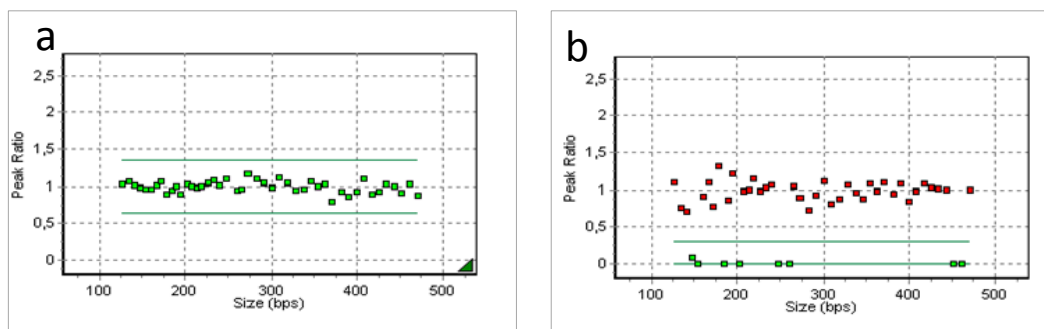
*Slika 59.* Subtelomerna MLPA analiza P070 setom proba. (a) prvi eksperiment (b) drugi eksperiment. Plava strelica označava MLPA probu za 22q13.33.

**16. ST-177** – ženska ispitanica, 61 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. Subtelomernom analizom P070 setom proba u dva odvojena eksperimenta utvrđena je delecija 19q13 (Slika 60a. i 60b.). Analizom P036 setom proba dobiven je normalan nalaz. Sekvenciranje dijela CHMP2A gena (19q13) nisu nađene mutacijske promjene.



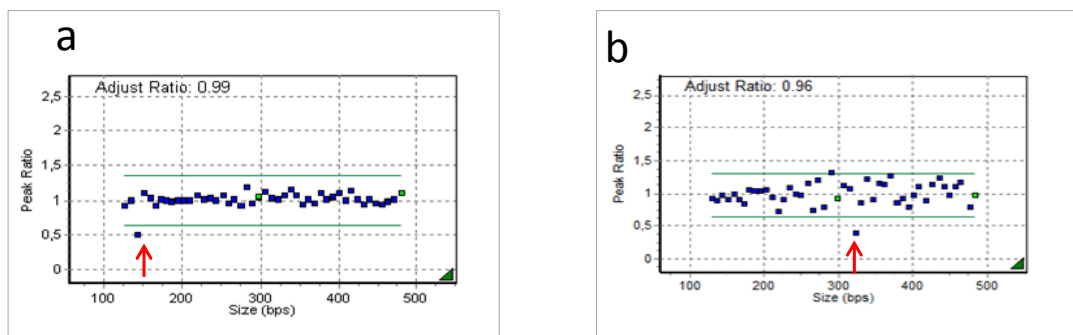
Slika 60. Subtelomerna MLPA analiza P070 setom proba. (a) prvi eksperiment (b) drugi eksperiment. Crvena strelica označava MLPA probu za 19q13.

**17. ST-178** – muški ispitanik, 54 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MS-MLPA analizom setom proba za FRAX utvrđena je metilacija FMR1 gena te je postavljena dijagnoza Fragilnog X sindroma (Slika 61a. i 61b.).



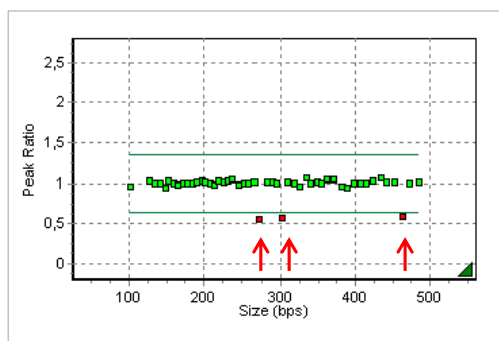
Slika 61. MS-MLPA analiza FMR1 i AFF2 gena. (a) Normalan rezultat analize broja kopija. (b) Metilacija FMR1 gena.

**18. ST-194** – muški ispitanik, 62 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je delecija 3p26.3 koja je potvrđena P070 MLPA setom proba (Slika 62a. i 62b.).



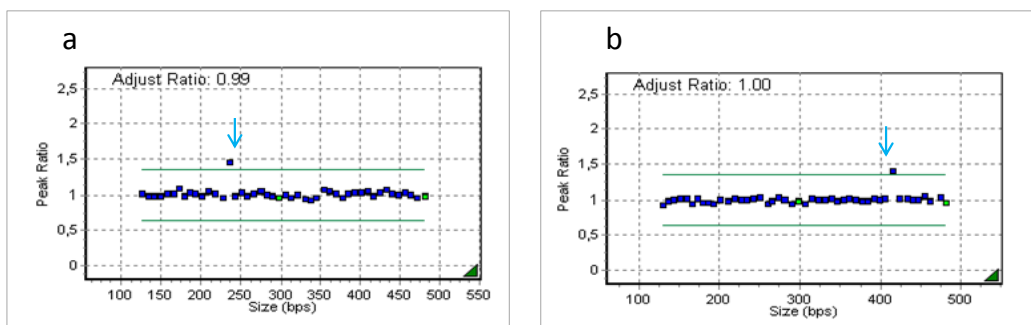
*Slika 62.* (a) Subtelomerna MLPA analiza P036 seta proba. Crvena strelica označava probu za 3p. (b) Subtelomerna MLPA analiza P070 seta proba. Crvena strelica označava probu za 3p.

**19. ST-200** – ženska ispitanica, 58 godina. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba (P245) utvrđena je delecija LLGL1, LPRC48 i RAI1 gena i postavljena dijagnoza Smith-Magenis sindroma (Slika 63.).



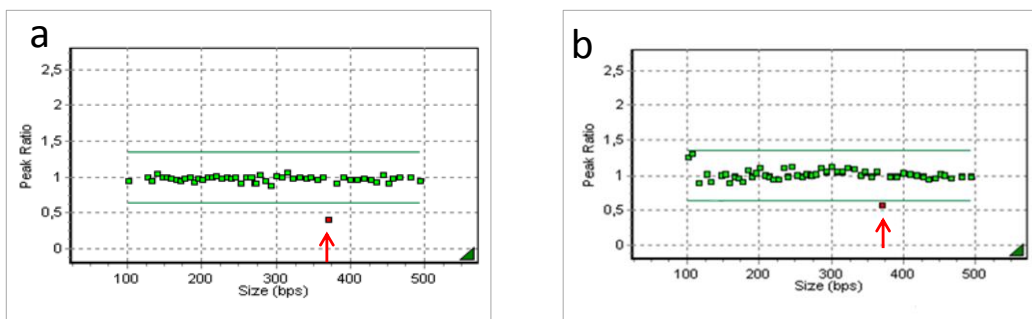
*Slika 63.* MLPA mikrodelecijski set proba P245. Crvene strelice označavaju probe za LLGL1, LPRC48 i RAI1 gene.

**20. CRZ-057** – muški ispitanik, 22 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je duplikacija 15q11 koja je potvrđena P070 MLPA setom proba (Slika 64a. i 64b.).



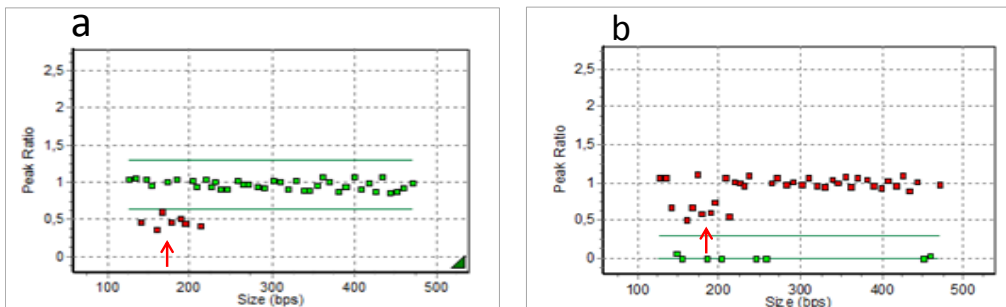
Slika 64. (a) Subtelomerna MLPA analiza P036 seta proba. Plava strelica označava probu za 15q11. (b) Subtelomerna MLPA analiza P070 seta proba. Plava strelica označava probu za 15q11.

**21. ST-229** – muški ispitanik, 49 godine. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P245, u dva odvojena eksperimenta utvrđena je delecija SNAP29 gena (Slika 65a. i 65b.). Sekvenciranjem dijela egzona 3 SNAP29 gena nisu utvrđene mutacijske promjene.



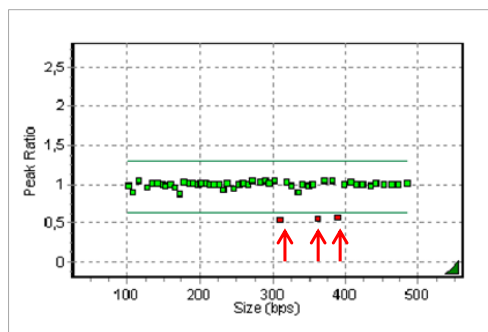
Slika 65. MLPA mikrodelecijski set proba P245.(a) prva analiza. (b) druga analiza. Crvena strelica označava probu za SNAP29 gen.

**22. CRZ-017** – muški ispitanik, 21 godinu. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG pruga. MS-MLPA analizom setom proba za FRAX utvrđena je delecija egzona 1 FMR1 gena (Slika 66a. i 66b.) Kod ispitanika je postavljena dijagnoza FRAX sindroma.



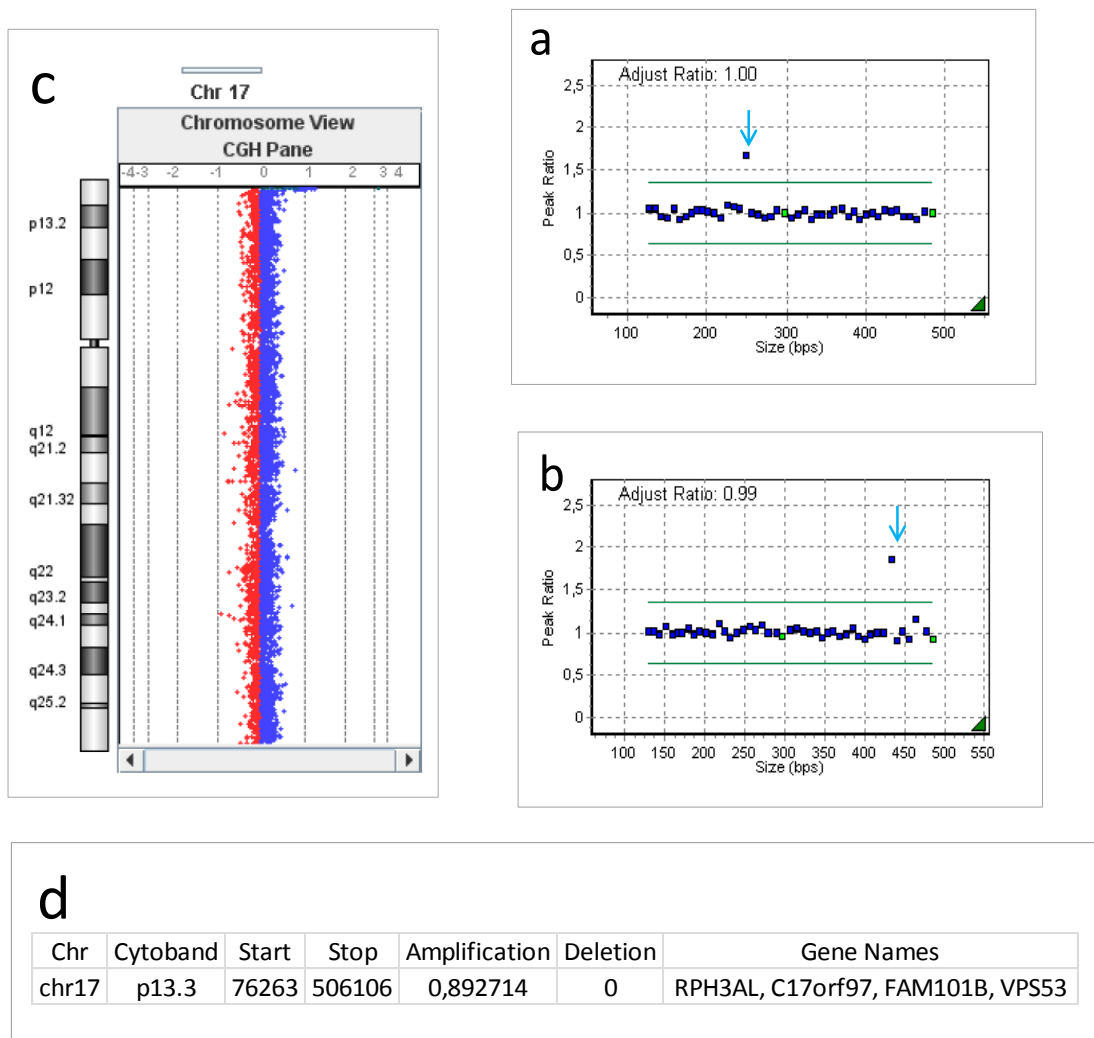
Slika 66. MS-MLPA analiza FMR1 i AFF2 gena. (a) analiza broja kopija pokazuje deleciju egzona 1 FMR1 gena. (b) metilacijsko profiliranje pokazuje prisutnost metiliranog FMR1 gena. Crvene strelice označavaju probe za CRR9 i TERT gene.

**23. ST-320** – muški ispitanik, 51 godina. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrolelecijskog seta proba (P245) utvrđena je delecija ELN i LIMK1 gena i postavljena dijagnoza Williams–Beuren sindroma (Slika 67.).



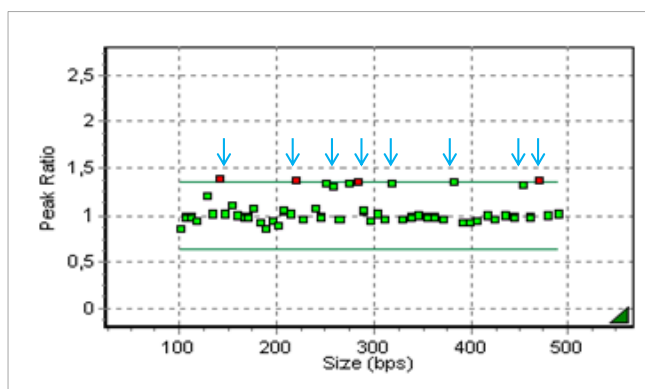
Slika 67. MLPA mikrolelecijski set proba P245.

**24. ST-228** – ženska ispitanica, 34 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG pruga. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je duplikacija 17p koja je potvrđena P070 MLPA setom proba (Slika 68a. i 68b.). ArrayCGH analizom utvrđena je duplikacija 17p13.3 veličine 432 Kb (Slika 68c. i 68d.).



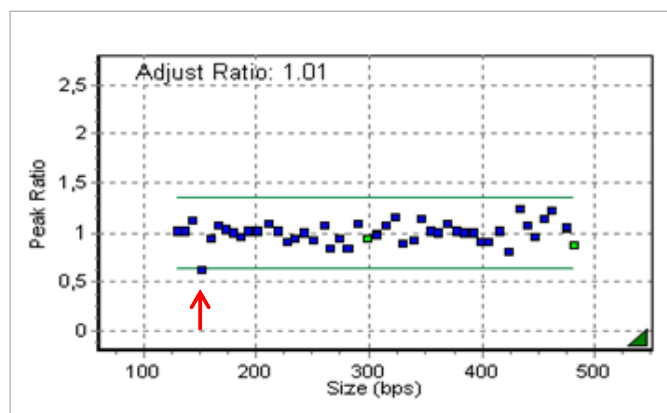
*Slika 68.* (a) Subtelomerna MLPA analiza P036 seta proba. Plava strelica označava probu za 17p. (b) Subtelomerna MLPA analiza P070 seta proba. Plava strelica označava probu za 17p. (c) Shematski prikaz array CGH rezultata za kromosome 17. (d) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te popis svih gena u zahvaćenoj regiji.

**25. ST-335** – muški ispitanik, 60 godina. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P297 utvrđena je duplikacija 1q21.1 regije (HFE2, PEX11B, PEX11B, CD160, PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8 geni) (Slika 69). Array analizom potvrđena je duplikacija 1q21.1-q21.3 regije veličine 6,1 Mb. Duplikacija 1q21 je definirani mikroduplikacijski sindrom.



*Slika 69.* MLPA mikrodelecijski set proba P297. Plave strelice označavaju probe za HFE2, PEX11B, PEX11B, CD160, PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8 gene.

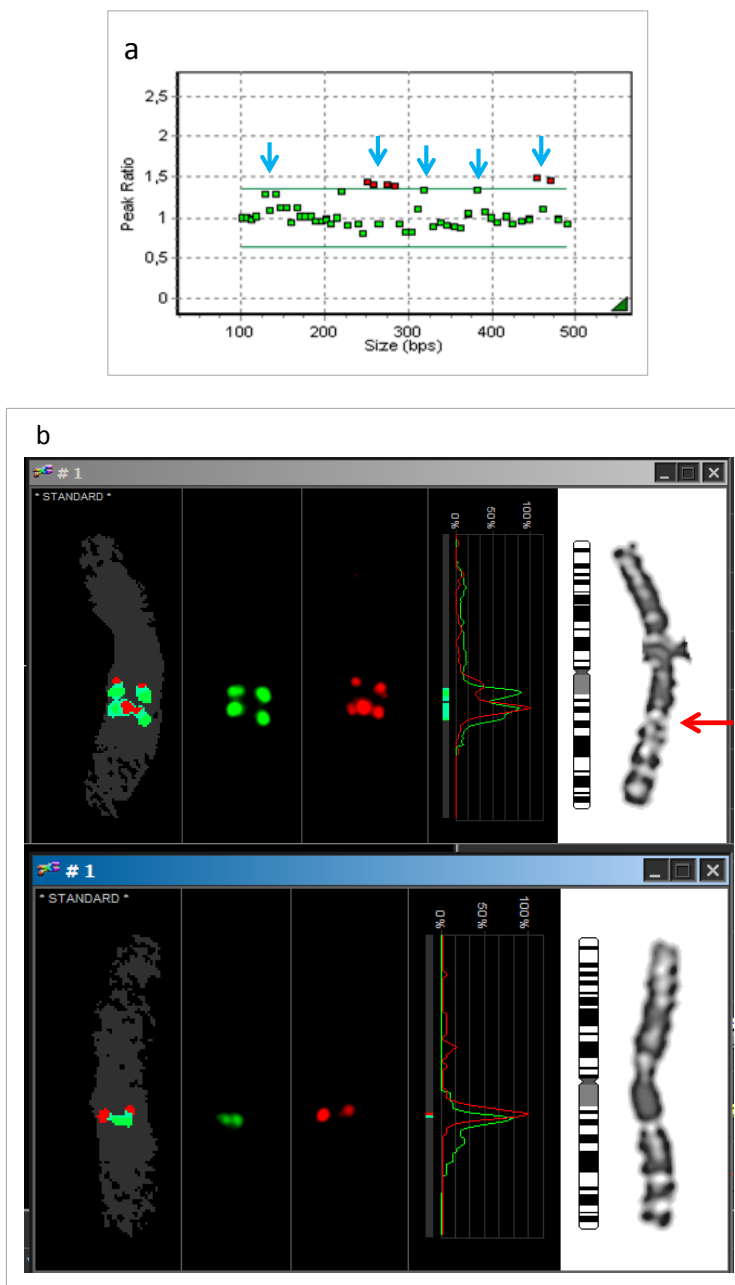
**26. ST-334** – muški ispitanik, 55 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Subtelomernom analizom P070 setom proba u dva odvojena eksperimenta utvrđena je delecija 4q35 (Slika 70). Analizom P036 setom proba dobiven je normalan nalaz.



*Slika 70.* Subtelomerna MLPA analiza P070 seta proba. Crvena strelica označava probu za 4q35.

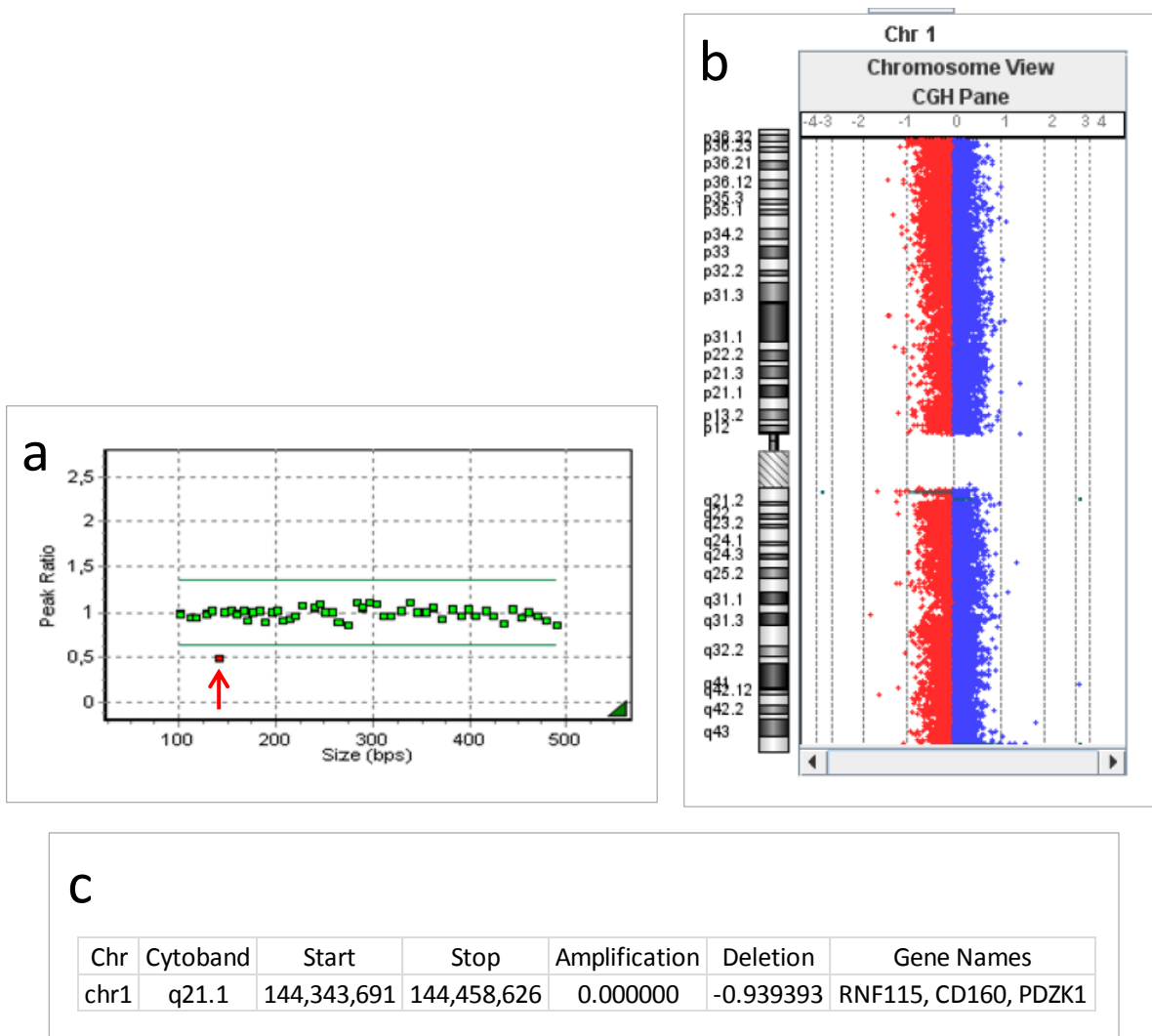


**27. ST-258** – muški ispitanik, 55 godina. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P297 utvrđena je duplikacija 1q21.1 regije (HFE2, PEX11B, PEX11B, CD160, PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8 geni) (Slika 71a). FISH analizom potvrđena je duplikacija 1q21.1-q21.3 regije (Slika 71b). Duplikacija 1q21 je definirani mikroduplikacijski sindrom.



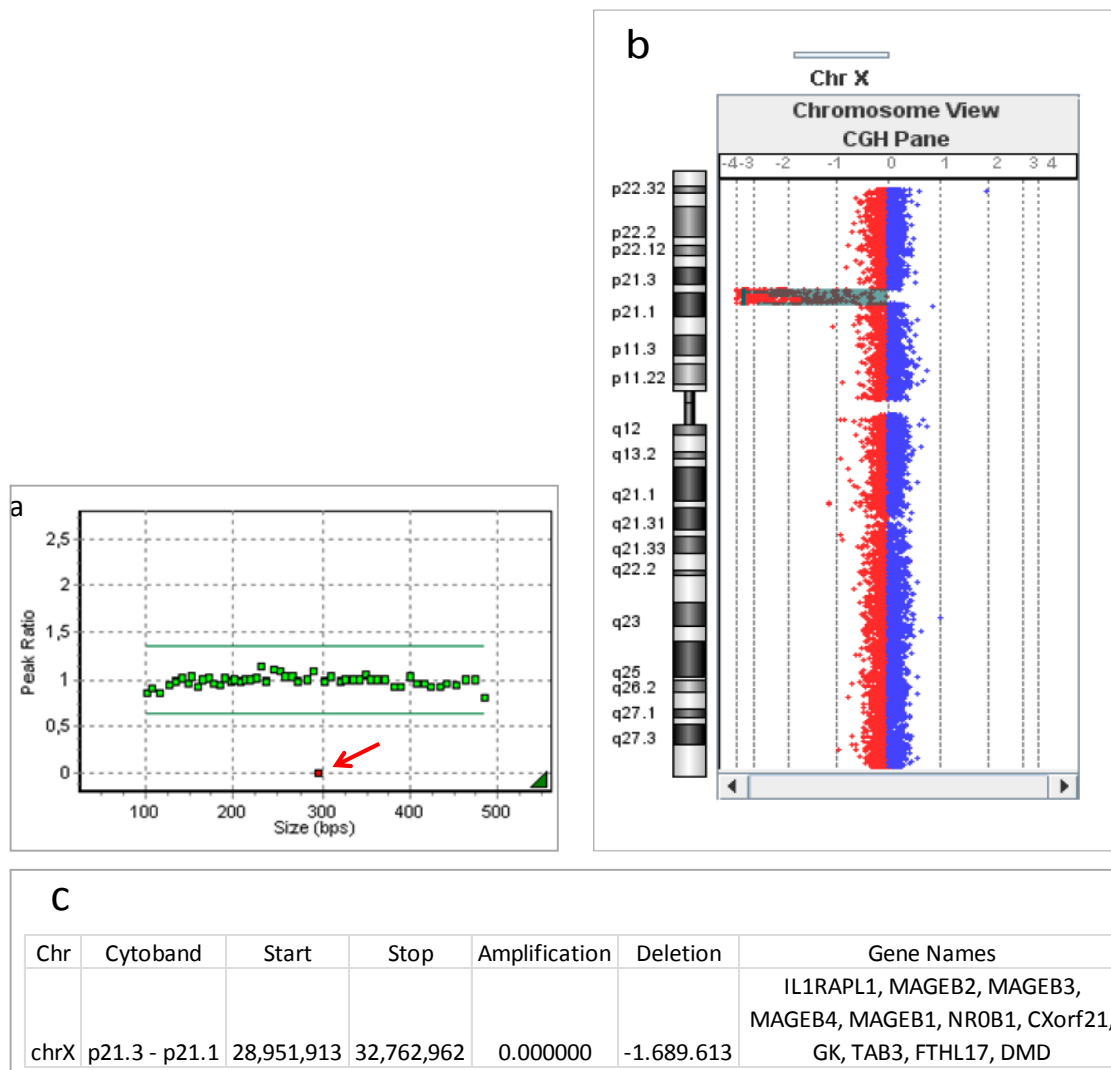
Slika 71. (a) MLPA mikrodelecijski set proba P297. Plave strelice označavaju probe za HFE2, PEX11B, PEX11B, CD160, PRKAB2, FMO5, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8 gene. (b) BAC FISH analiza (RP11-315I20 – crveni signal, RP11-44P6 – zeleni signal) potvrdila je duplikacija 1q21.1-q21.3 regije. Duplikacija je označena crvenom strelicom.

**28. ST-260** – ženska ispitanica, 26 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize G-pruga. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P297 utvrđena je delecija CD160 gena (Slika 72a.). Array analizom utvrđena je delecija 1q21.1 veličine 114 Kb, te potvrđena je delecija CD160 gena (Slika 72b. i 72c.).



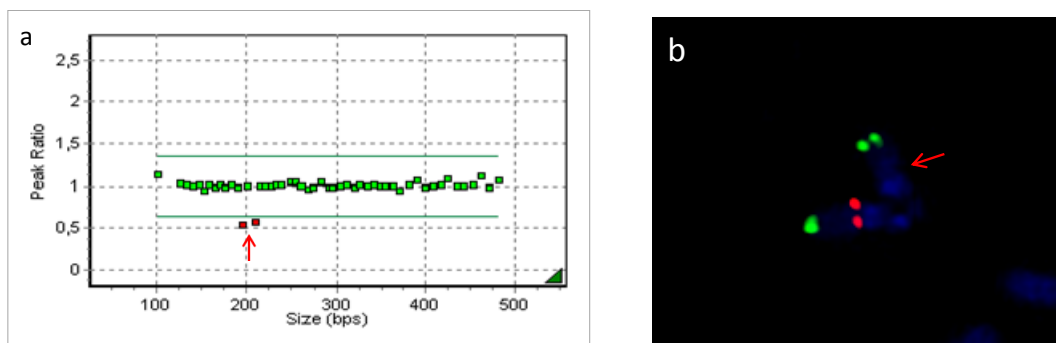
Slika 72. (a) MLPA mikrodelecijski set proba P297. Crvena strelica označava probu za SNAP29 gen. (b) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 1. (c) Pozicija i veličina detektirane aberacija, te kompletan popis gena zahvaćenih regija.

**29. CRZ-001** – muški ispitanik, 9 godina. Uputna dijagnoza: RIP, DMD. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P245 utvrđena je delecija DMD gena (Slika 73a.). Array CGH analizom detektirana je delecija Xp21.3p21.1 veličine 3,8 Mb koja uz DMD gen uključuje gene povezan s X veznim RIP-om (Slika 73b. i 73c.). Kod ispitanika je dijagnosticirana Duchenne mišićna distrofija vezana uz Xp21 mikrodelecijski sindrom.



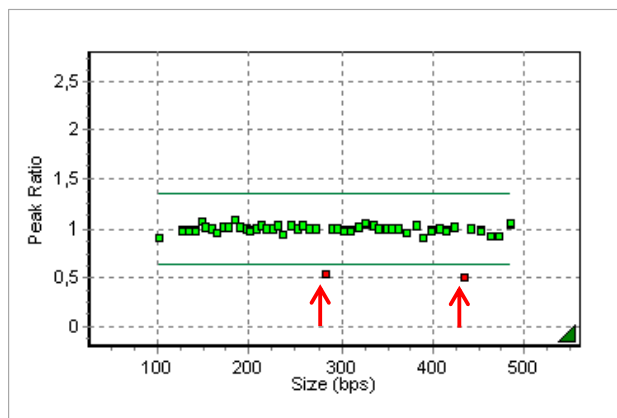
Slika 73. (a) MLPA analiza mikrodelecijskog seta proba P245. Crvena strelica označava probu za DMD gen. (b) Shematski prikaz array rezultata za kromosom X. (c) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćenih regija.

**30. CRZ-051** – ženska ispitanica, 21 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P245 utvrđena je delecija CLDN5 i GP1BB gena (DiGeorge sindrom kritična regija) (Slika 74a.). FISH analizom potvrđena je delecija 22q11 (Slika 74b.) i postavljena dijagnoza DiGeorge sindroma.



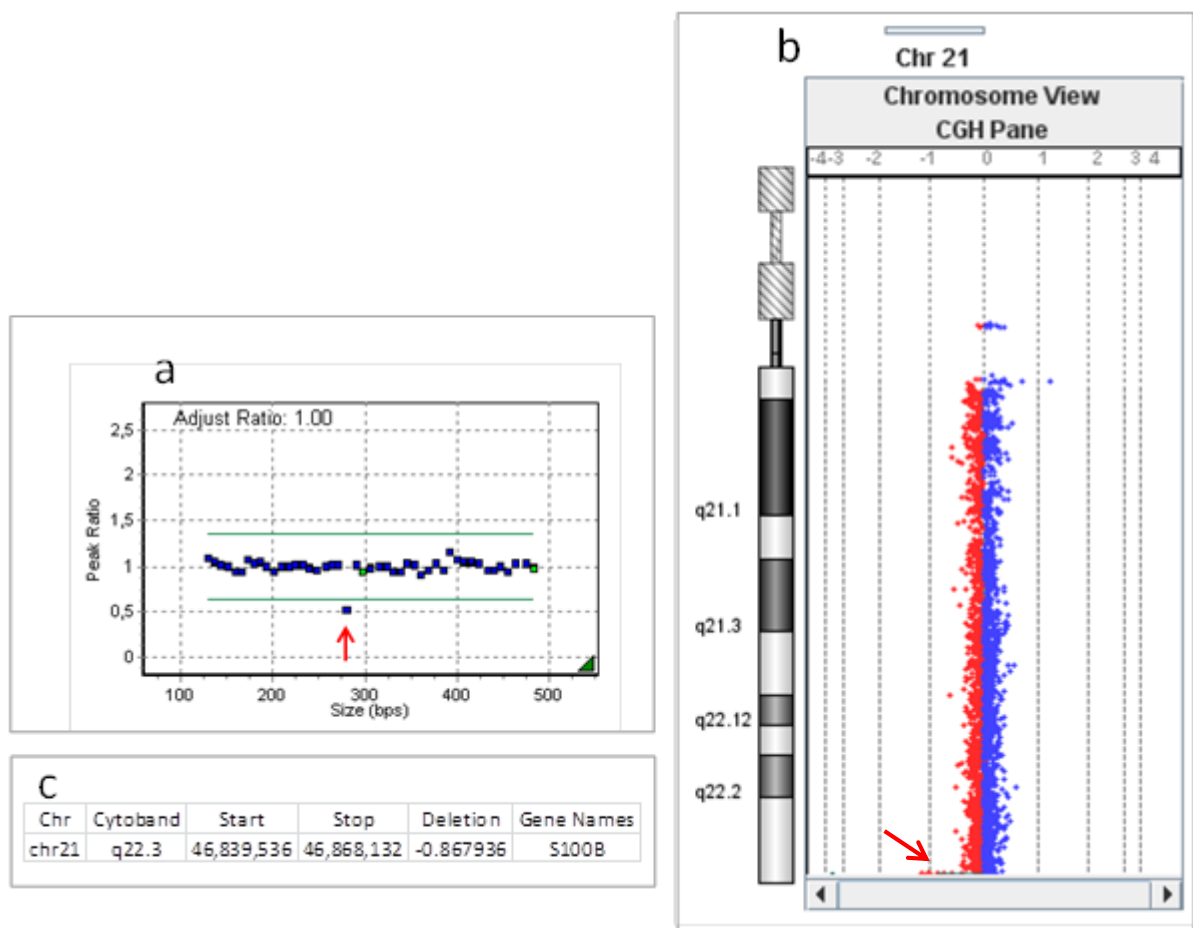
Slika 74. (a) MLPA analiza mikrodelecijskog seta proba P245. Crvena strelica označava probe za CLDN5 i GP1BB gene. (b) FISH analiza (DiGeorge Region Probe - LSI TUPLE1 (HIRA) crveni signal/TelVysion 22q zeleni signal, Abbott) pokazuje deleciju 21q11 regije (kromosom označen crvenom strelicom).

**31. ST-221** – ženska ispitanica, 44 godine. Uputna dijagnoza: RIP. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba (P245) utvrđena je delecija CRR9 i TERT gena i postavljena dijagnoza Cri du Chat sindroma (Slika 75.).



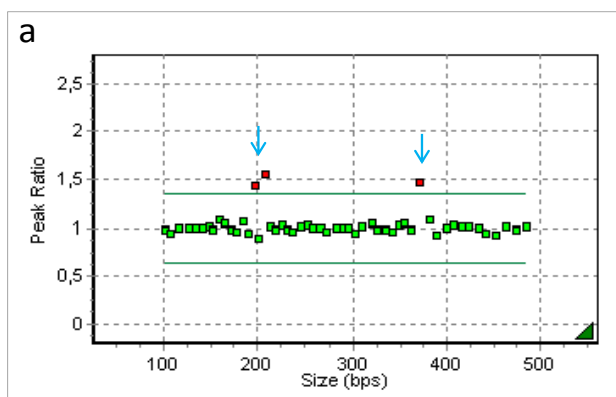
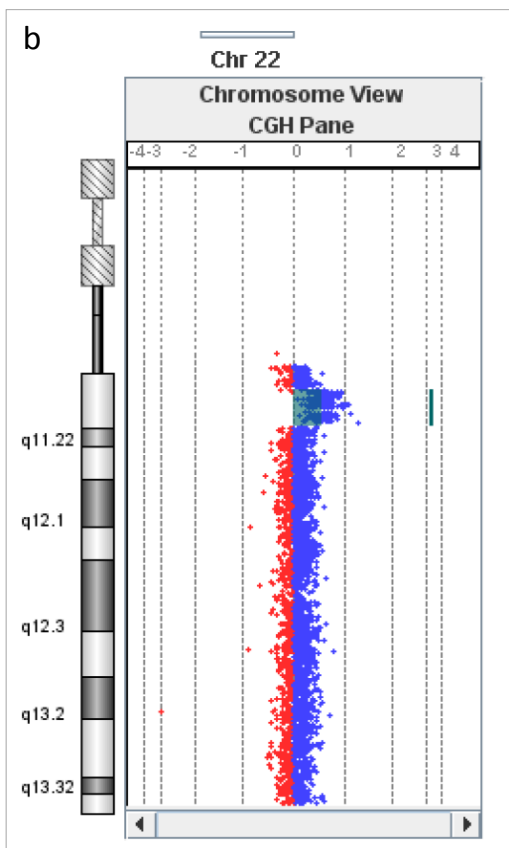
Slika 75. MLPA mikrodelecijski set proba P245.

**32. CRZ-018** – muški ispitanik, 15 godina. Uputna dijagnoza: RIP, nerazvijen govor. Uredan nalaz GTG pruga. Subtelomernom MLPA analizom P070 setom proba utvrđena je delecija 21q22.3 (Slika 76a.). Subtelomerna MLPA analiza P036 setom proba pokazala je uredan nalaz. Array analizom detektirana je delecija 21q22.3 veličine 28 Kb koja obuhvaća S100B gen (Slika 76b. i 76c.).



*Slika 76.* (a) Subtelomerna MLPA analiza P070 seta proba. Crvena strelica označava probu za 21q22.3 (b). Shematski prikaz ArrayCGH rezultata za kromosom 21. (c) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te popis svih gena zahvaćene regije.

**33. CRZ-026** – muški ispitanik, 21 godinu. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize. MLPA analizom mikrodelecijskog seta proba P245 utvrđena je duplikacija CLDN5, GP1BB i SNAP29 gena (DiGeorge sindrom kritična regija) (Slika 77a). Array analizom detektirana je duplikacija 22q11.21 veličine 2,8 Mb koja kojom su obuhvaćeni CLDN5, GP1BB i SNAP29 geni (Slika 77b i Slika 77c).

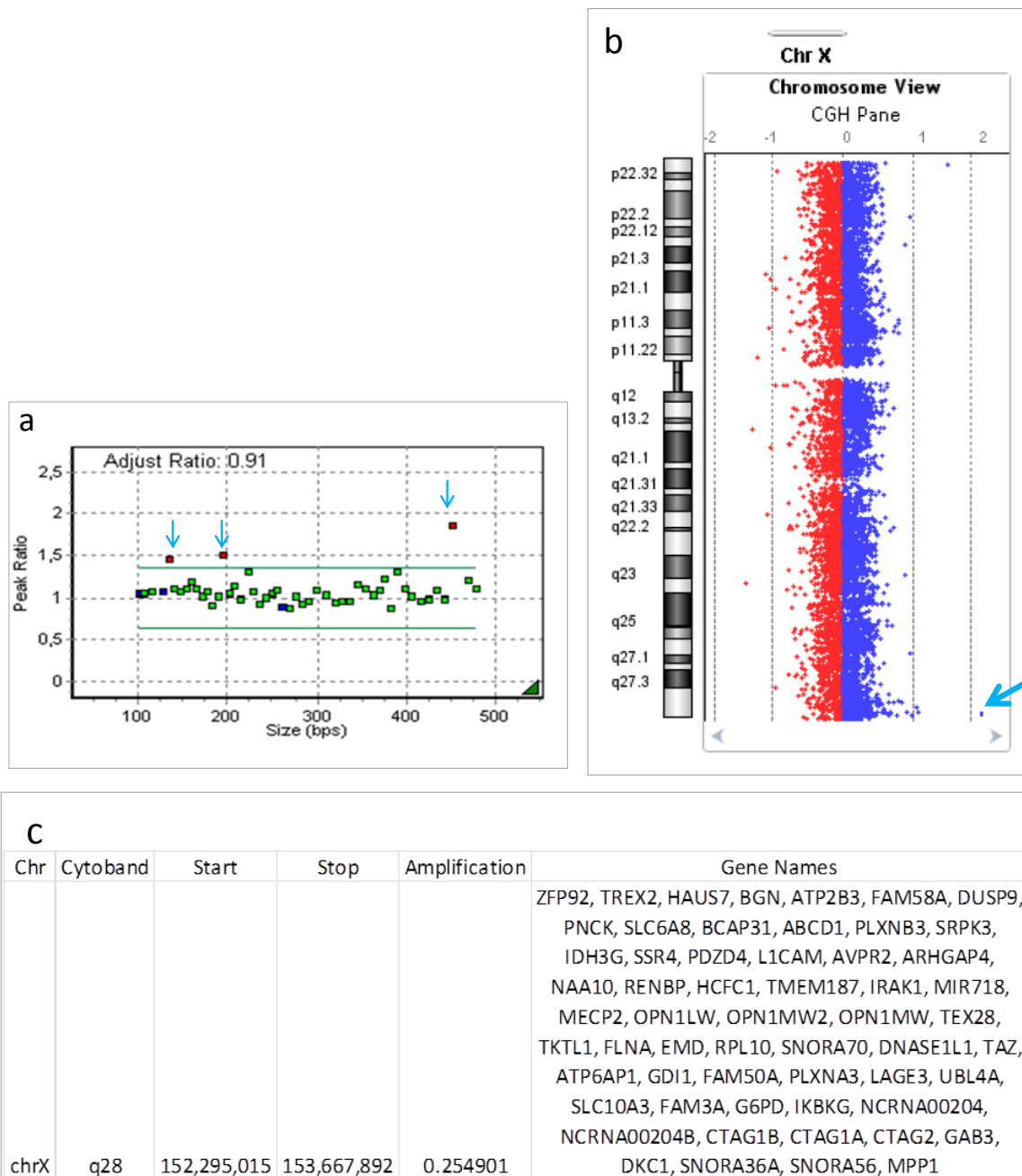


**C**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Gene Names
chr22	q11.21	17,289,044	20,128,755	0.550634	PRODH, DGCR5, DGCR9, DGCR10, DGCR2, DGCR11, DGCR14, TSSK2, GSC2, SLC25A1, CLTCL1, HIRA, MRPL40, C22orf39, UFD1L, CDC45, CLDN5, LOC150185, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, C22orf29, TXNRD2, COMT, ARVCF, C22orf25, MIR185, DGCR8, MIR1306, TRMT2A, RANBP1, ZDHHC8, LOC150197, RTN4R, MIR1286, DGCR6L, PI4KAP1, RIMBP3, ZNF74, SCARF2, KLHL22, MED15, POM121L4P, TMEM191A, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, FLJ39582, MGC16703, P2RX6, SLC7A4, P2RX6P, LOC400891, POM121L8P, RIMBP3C, RIMBP3B, HIC2

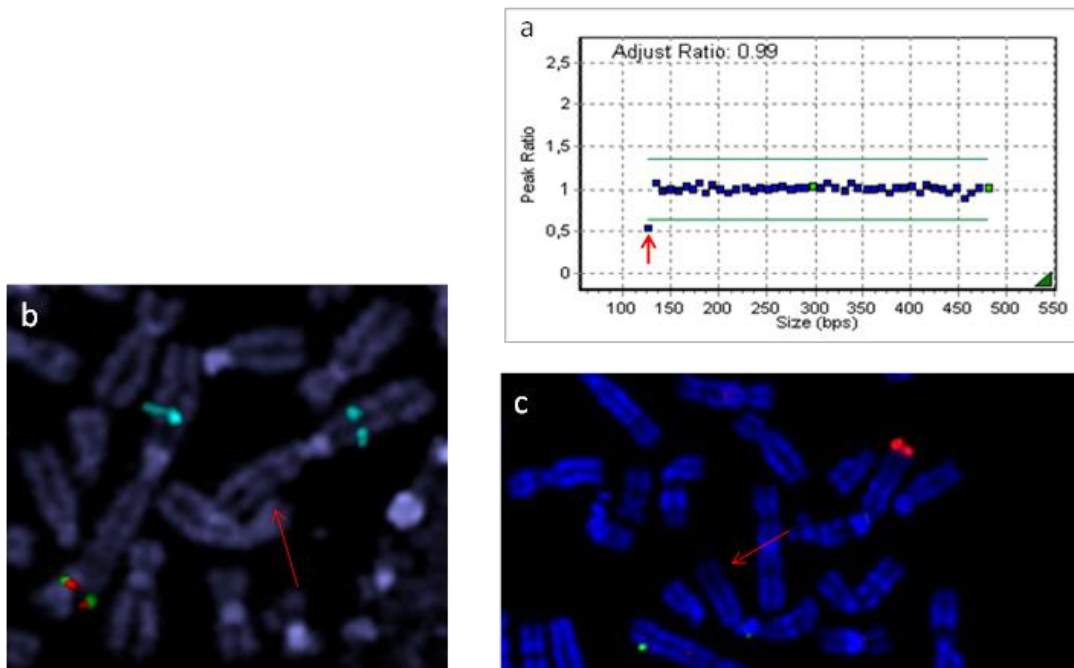
Slika 77. (a) MLPA analiza mikrodelecijskog seta proba P245. Plave strelice označavaju probu za CLDN5, GP1BB i SNAP29 gene. (b) Shematski prikaz ArrayCGH rezultata za kromosom 22. (c) Pozicija i veličina detektirane aberacija, te popis svih gena zahvaćene regije.

**34. CRZ-055** – muški ispitanik, 14 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG pruga. MLPA analiza setom proba za nesindromski X vezani RIP (P106) pokazala je duplikaciju ARX, GDI1 i RPS6KA3 gena (Slika 78a). ArrayCGH analizom detektirana je duplikacija Xq28 veličine 1,37 Mb koja obuhvaća GDI1 gen (Slika 78b. i 78c.)



*Slika 78.* (a) MLPA analiza P106 seta proba. Plave strelice označavaju probe za ARX, GDI1 i RPS6KA3 gene. (b) Shematski prikaz ArrayCGH rezultata za kromosom X. (c) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te popis svih gena zahvaćene regije.

**35. CRZ-080** – ženska ispitanica, 30 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz analize GTG analize. MLPA analizom subtelomera P036 setom proba detektirana je delecija 1p36 (Slika 85a.). FISH analizom potvrđena je subtelomerna delecija 1p36 (Slika 79b. i 79c.) i postavljena dijagnoza 1p36 mikrodelecijskog sindroma.



Slika 79. (a) Subtelomerna MLPA analiza P036 seta proba. Crvena strelica označava probu za 1p36. (b) FISH analiza (LSI p58 (1p36) (crveni signal)/TelVysion 1p (zeleni signal)/LSI 1q25 (plavi signal), Abbott) crvena strelica označava del1p36. (c) FISH analiza (ST 1pter (crveni signal), Kreotech) crvena strelica označava del1p.



### 5.2.1. Aberacije detektirane MLPA analizom kod ispitanika s dijagnozom ASD i urednim nalazom GTG analize

MLPA analiza subtelomera, mikrodelecijskih/mikroduplicacijskih sindroma, te kromosomskih regija specifičnih za ASD provedena je kod 21 ispitanika s dijagnozom ASD-a. Analizom nisu pronađene kromosomske aberacije. Kod jednog ispitanika utvrđena je kromosomska aberacija GTG analizom, te je MLPA analizom utvrđena dodatna aberacija (ispitanica ERF-022 – nalaz naveden na stranici 78.).

### 5.2.2. MLPA analiza ispitanika s aberacijama utvrđenim GTG analizom

MLPA analiza proveden ja kod ukupno 11 ispitanika s aberacijama utvrđenim GTG analizom. U tablici 12 prikazan je broj ispitanika i tip aberacija detektiranih GTG analizom kod kojih je provedena daljnja MLPA obrada.

Tablica 12. Ispitanici s aberacijama utvrđenim GTG analizom kod kojih izvršena daljnja MLPA analiza

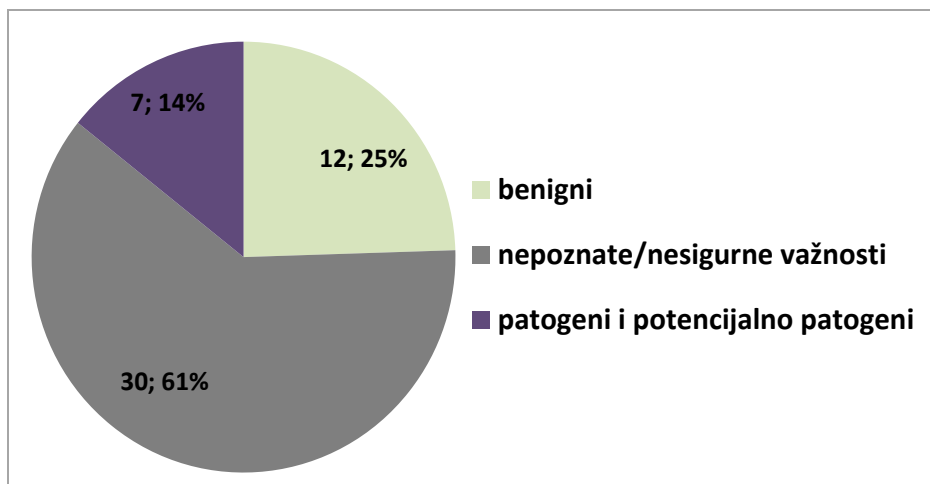
Tip aberacije	Ispitanici	Uputna dijagnoza	Ukupno
nebalansirane translokacije	ST-225, CRZ-008, CRZ-067	RIP	3
balansirana translokacija	ERF-021	ASD	1
daljnja analiza određenih kromosoma/kromosomskih regija	CRZ-045 (# 1) CRZ-060 (# 7)	RIP	3
marker kromosom	ST-144 (80%)	RIP/ASD	1
hiperdiploidija	ST-012 (6%)	RIP	1
ring kromosom	ERF-022/ring 14x2 (1%) ERF-012/ring 22 (42%)	ASD	2

### 5.3. Aberacije detektirane aCGH analizom

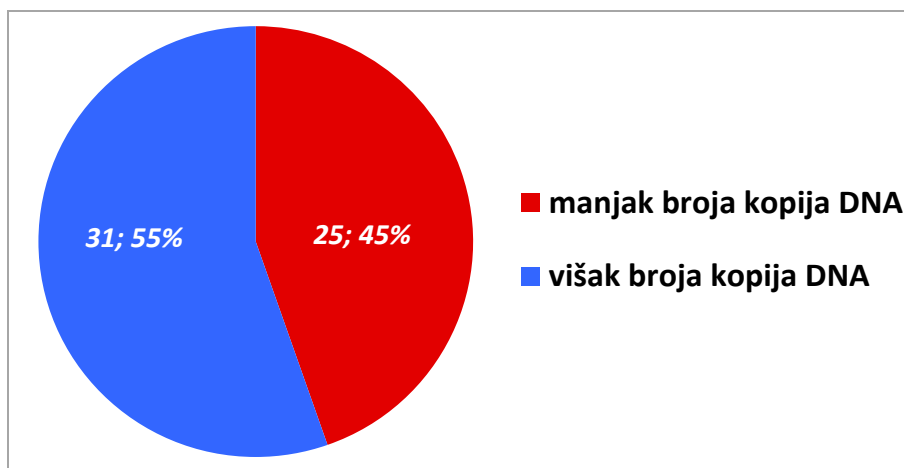
Popis aberacija (višak ili manjak broja kopija DNA) detektiranih array analizom kod ispitanika s normalnim nalazom GTG, FISH i MLPA analiza prikazan je u tablici 13 u prologu (Prilog 15). U tablici su navedeni OMIM geni iz regija koje su kategorizirane kao patogene, potencijalno patogene i nepoznate/nesigurne važnosti. Prema OMIM bazi mutacijske promjene u genima koji su prikazani zelenom bojom u tablici 12. uzrokuju poznate/opisane sindrome. Ispitanici iz grupe dijagnosticirane za RIP označeni su ST i CRZ oznakama, dok su ispitanici dijagnosticirani za ASD označeni ERF oznakama uz pripadajući broj.

#### 5.3.1. Aberacije detektirane aCGH analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP uz uredan nalaz GTG, MLPA i FISH analiza.

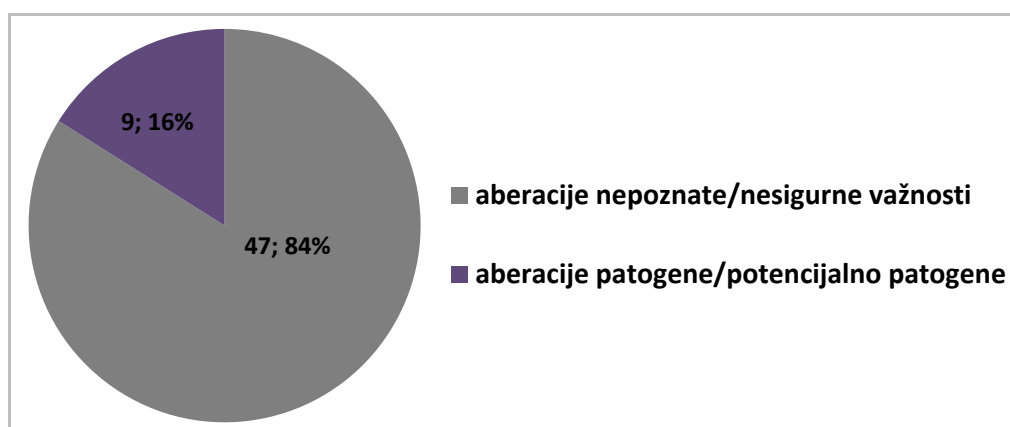
aCGH analiza provedena je kod 49 ispitanika s dijagnozom RIP-a uz uredan nalaz GTG, FISH i MLPA analiza. Nakon bioinformatičke analize i selekcije kod 12 (25%) ispitanika utvrđene su benigne aberacije, kod 30 (61%) ispitanika utvrđene promjena u broju kopija DNA kromosomskih segmenata klasificiranih kao nepoznate/nesigurne važnosti, dok su kod 7 (14%) ispitanika utvrđene patogene, potencijalno patogene aberacije (Slika 80.). Ukupno je utvrđeno 56 aberacija klasificiranih u kategorije patogene, potencijalno patogene i nepoznate/nesigurne važnosti (Slika 81.). Prosječna veličina manjka iznosila je 704,8 Kb (21,5Kb – 5,3Mb). Veličina viška u prosijeku je iznosila 427,9 Kb (34,4Kb – 2,7Mb). Na slici 82. prikazan je odnos patogenih/potencijalno patogenih aberacija u odnosu na aberacije nepoznate/nesigurne važnosti.



Slika 80. Klasifikacija CNV-ova kod ispitanika s dijagnozom RIP-a kod kojih je provedena aCGH analiza. Ukupno je analizirano 49 ispitanika. Kod 12 ispitanika (25%) utvrđene su isključivo benigne aberacije, kod 30 ispitanika (61%) utvrđene su aberacije klasificiranih kao nepoznate/nesigurne važnosti i kod 7 ispitanika (14%) utvrđene su patogene i potencijalno patogene aberacije.



Slika 81. Odnos aberacija detektiranih aCGH analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP-a uz uredan nalaz GTG, MLPA i FISH analiza. Utvrđeno je 56 aberacija kategoriziranih kao patogene, potencijalno patogene i nepoznate/nesigurne važnosti od kojih je 25 (45%) manjkova (delecije) i 31 (55%) viškova (duplikacije).



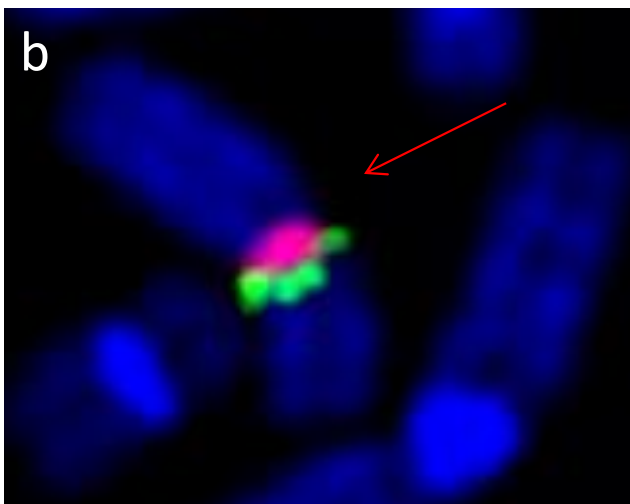
Slika 82. Odnos patogenih/potencijalno patogenih i aberacija nepoznate/nesigurne važnosti.

U nastavku poglavlja detaljno su prikazani pojedini nalazi kod ispitanika (ukupno 7) kod kojih su detektirane patogene i potencijalno patogene kromosomske aberacije uz prethodno uredan nalaz GTG, FISH i MLPA analiza. Uz array nalaz u slučajevima kada je bila učinjena precizne molekularne karakterizacije otkrivenih aberacija navedeni su rezultati dodatno provedenih analiza.

**1. ST-108** – muški ispitanik, 23 godine. Uputna dijagnoza: RIP, autistično ponašanje. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297, ASD: P343 i X vezani RIP: P106). Array analizom detektirana je mikroduplicacija Xp11.23 veličine 1,3 Mb i mikrodelecija 22q11.21 veličine 129 Kb (Slika 83.). Mikroduplicacija Xp11.22p11.23 opisana je uz RIP, zaostajanje u razvoju govora, promjene EEG-a (80). Delecija 22q11.21 obuhvaća dio gena (DGCR6, PRODH, DGCR5, DGCR9, DGCR10, DGCR2, DGCR11) regije odgovorne za DiGeorge sindrom.

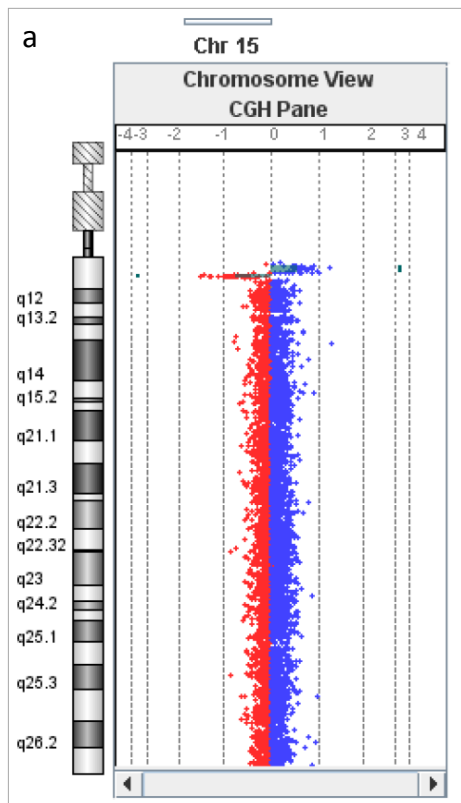
**a**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr22	q11.21	17,274,835	17,422,043	0.000000	-0.574924	DGCR6, PRODH, DGCR5, DGCR9, DGCR10, DGCR2, DGCR11
chrX	p11.23	48,193,484	49,514,011	0.317278	0.000000	SLC38A5, FTSJ1, PORCN, EBP, TBC1D25, RBM3, WDR13, WAS, SUV39H1, GLOD5, GATA1, HDAC6, ERAS, PCSK1N, TIMM17B, PQBP1, SLC35A2, PIM2, OTUD5, KCND1, GRIPAP1, TFE3, CCDC120, PRAF2, WDR45, GPKOW, MAGIX, PLP2, PRICKLE3, SYP, CACNA1F, CCDC22, FOXP3, PPP1R3F, GAGE10, GAGE12J, GAGE13, GAGE2E, GAGE8, GAGE2D, GAGE2A, GAGE2C, GAGE4, GAGE5, GAGE12I, GAGE7, GAGE12F, GAGE2B, GAGE12D, GAGE12E, GAGE12C, GAGE12H, GAGE12G, GAGE12B, GAGE6, GAGE1, PAGE1, PAGE4



*Slika 83.* (a) Pozicija i veličina detektiranih aberacija, te kompletan popis gena zahvaćenih regija. (b) BAC FISH analiza RP11-58H17 (crveni signal) i centromera X (crveni signal). Crvena strelica označava dupX.

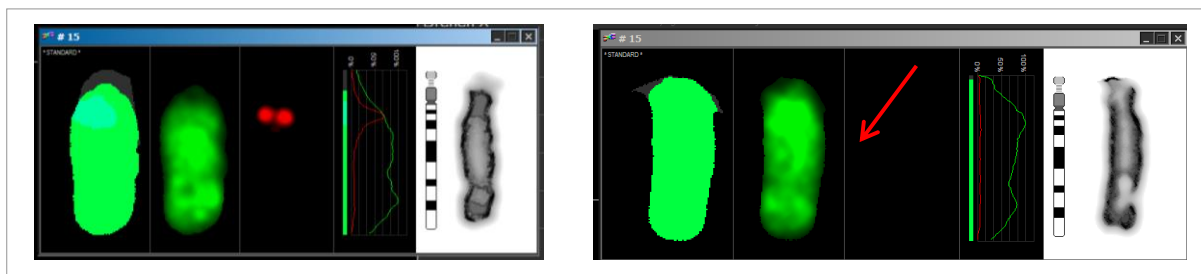
**2. CRZ-002** – muški ispitanik, 5 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrolelecije: P245 i P297). Array analizom detektirana je mikrolelecija 15q11.2 regije veličine 414 Kb koja uključuje NIPA1 i NIPA2 gene koji nisu sa imprintom (Slika 88a. i 88b.). FISH analizom potvrđena je delcija (Slika 84.). Postavljena je dijagnoza 15q11 mikrolelecijskog sindroma (80).



Slika 88. (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 15. Plava strelica prikazuje duplikaciju CNV 15q11.2 regije. (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije. Plava zvjezdica označava duplikaciju 15q11.2 regije.

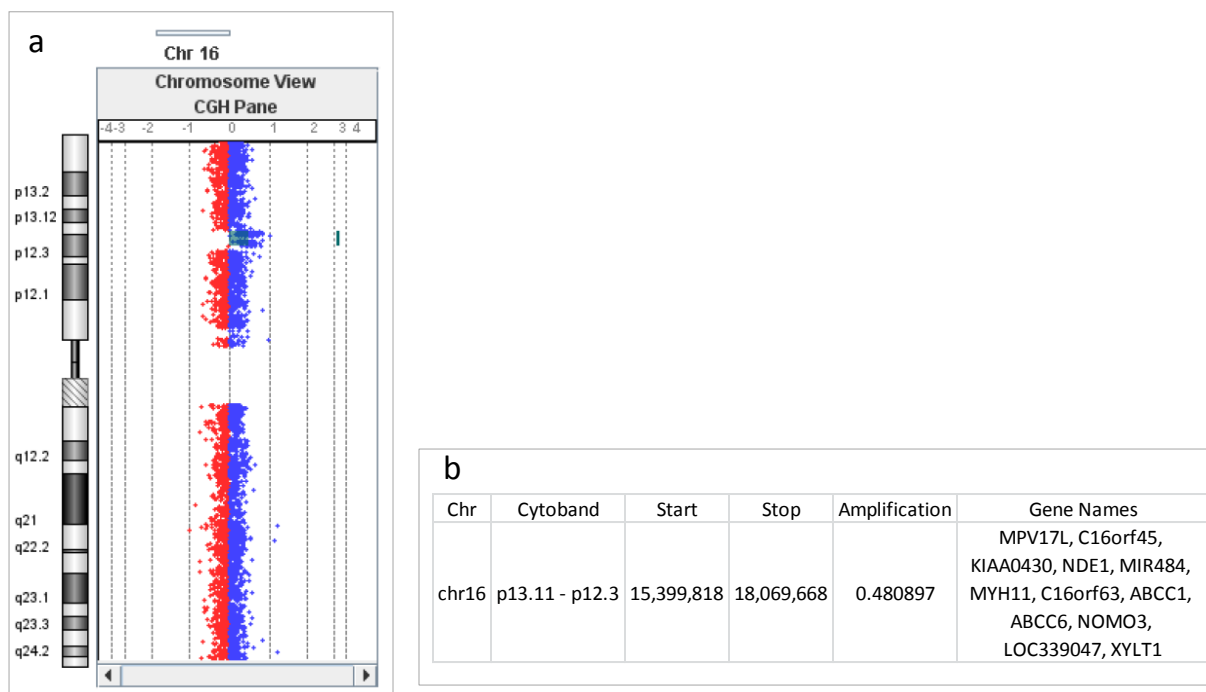
**b**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
★ chr15	q11.2	18,692,865	20,060,120	0.563959	0.000000	GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, LOC646214, CXADRP2, POTE8, NF1P1, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC646396
chr15	q11.2	20,316,992	20,731,389	0.000000	-0.748791	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1

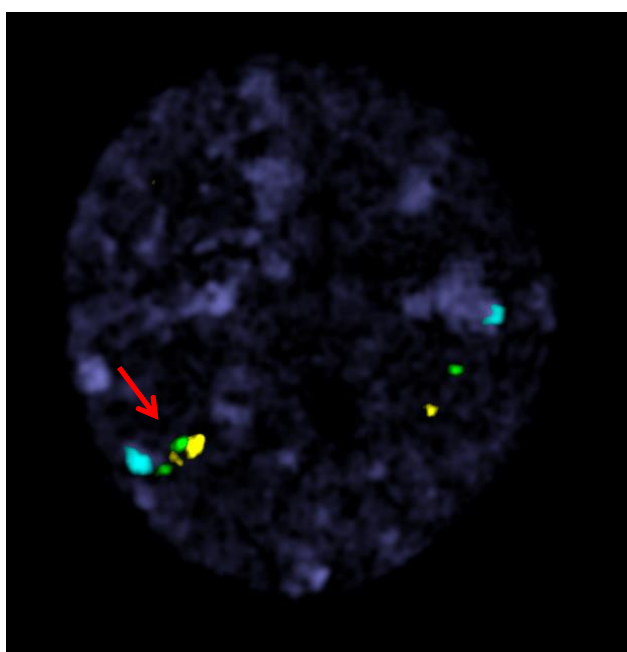


Slika 84. BAC FISH analiza (PR11-80H14, crveni signal i WCP15, zeleni signal). Delecija je označena strelicom.

**3. CRZ-043** – ženska ispitanica, 10 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297). Array analizom detektirana je mikrodulikacija 16p13.11-p12.3 veličine 2,7 Mb (Slika 85a. - 85b.). FISH analizom potvrđena je direktna duplikacija (Slika 86). Postavljena dijagnoza 16p13 mikroduplicacijskog sindroma (82).

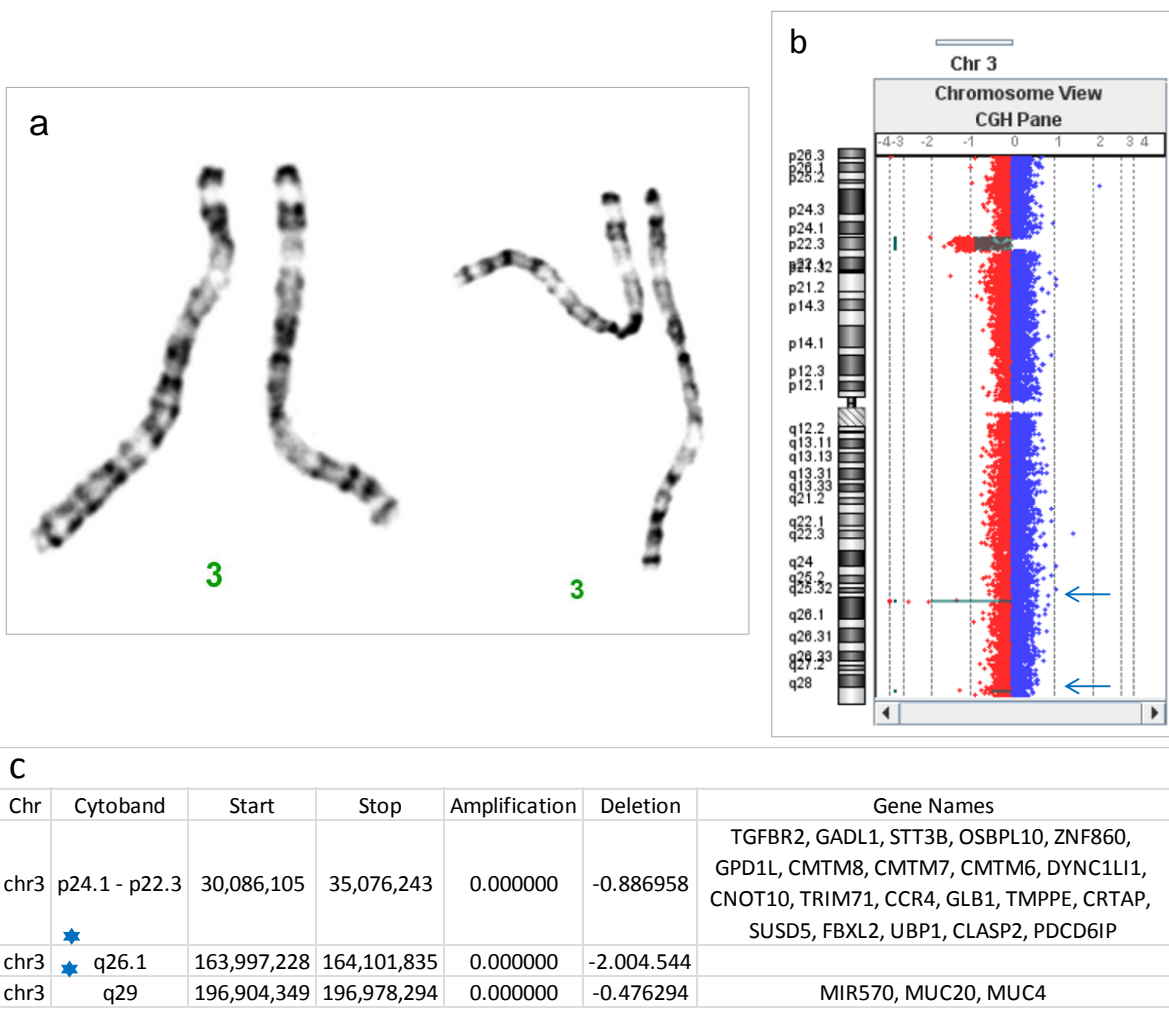


*Slika 85.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 16. (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije

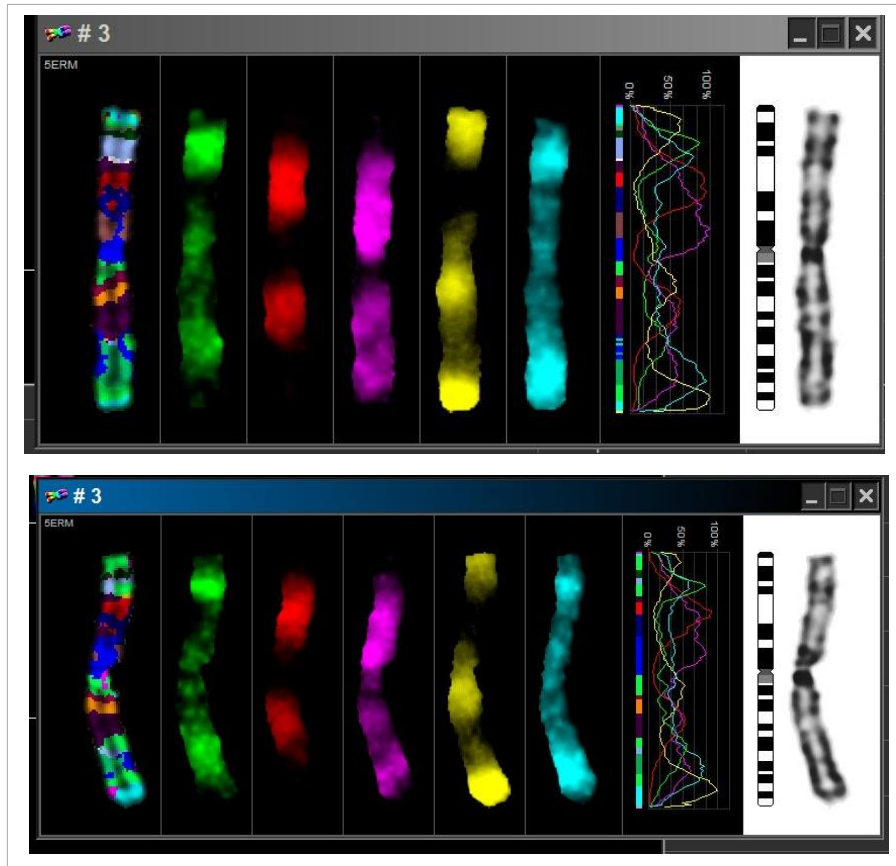


*Slika 86.* Interfazni BAC FISH. RP11-114I21 (BIO-Cy5 – žuti signal); RP11-288I13 (SpectrumGreen – zeleni signal) i cep16 (SpectrumAqua – plavi signal). Strelica označava direktnu duplikaciju 16p13.11-p12.3.

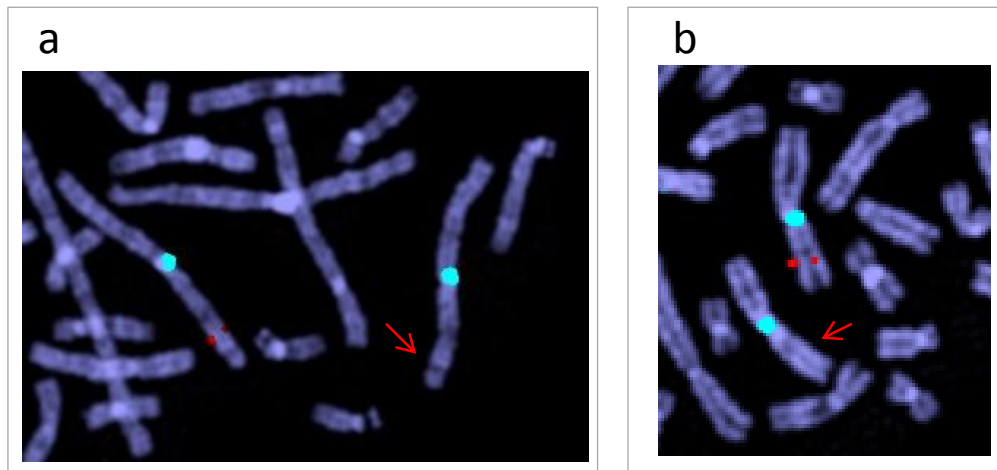
**4. CRZ-004** – ženska ispitanica, 9 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize (Slika 87a.) i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije P245). Array analizom detektirana je mikrodelecija kromosoma 3p24.1-p22.3 veličine 4 Mb (Slika 87b. i 87c.). FISH analizom potvrđena je mikrodelecija 3p24.1-p22.3 (Slika 88. i Slika 89.). U pregledanoj literaturi još nije opisan slučaj delecije 3p24.1-p22.3 (83).



*Slika 87.* (a) Parcijalni kariotip kromosoma 3. (b) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 3. Plave strelice prikazuje dodatno detektirane delecije. (d) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije. Plava zvjezdica označava dodatno deletirane regije (3q26.1 regije bez gena i 3q29 regija s genima koji ne pridonose fenotipu mikrodelecijskog sindroma).



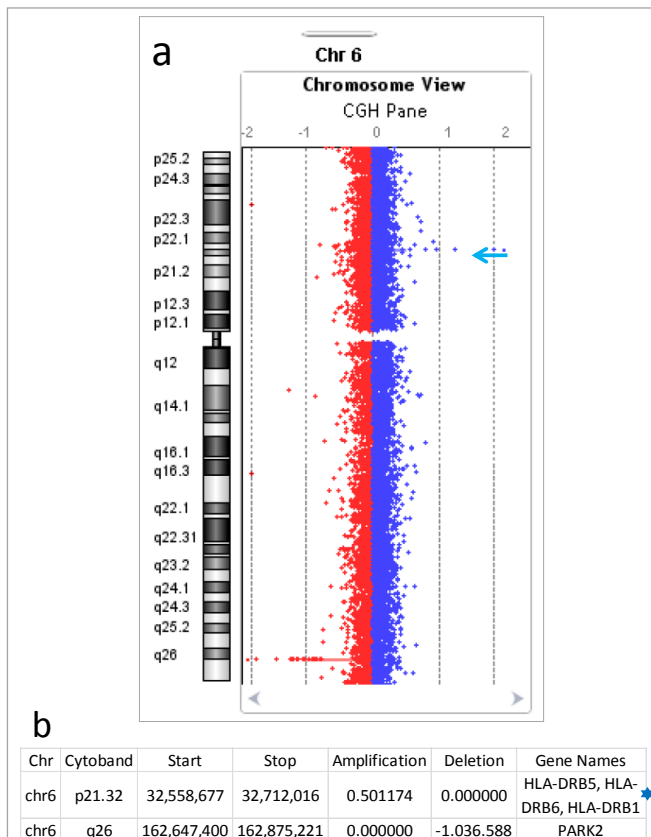
Slika 88. MCB profil kromosoma 3.



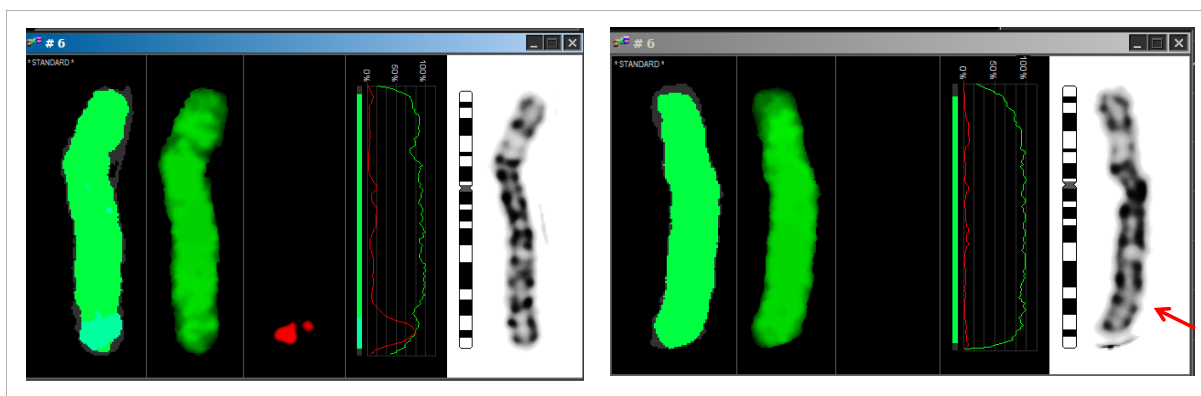
Slika 89. BAC FISH analiza. (a) RP11-524O15 – crveni signal i centromera 3 – plavi signal. Strelica označava del3. (b) RP11-35C18 – crveni signal i centromera 3 – plavi signal. Strelica označava del3.



**5. ST-306** – muški ispitanik, 24 godine. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skringinga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297 i ASD: P343 ). Array analizom detektirana je mikrodelecija kromosoma 6q26 veličine 227 Kb koja obuhvaća dio PARK2 gena (Slika 90a. i 90b.) BAC FISH analizom potvrđena je delecija 6q26 (Slika 91.). Mutacije PARK2 gena smatraju se uzrokom Parkinson disease, juvenile, type 2 (OMIM #600116).

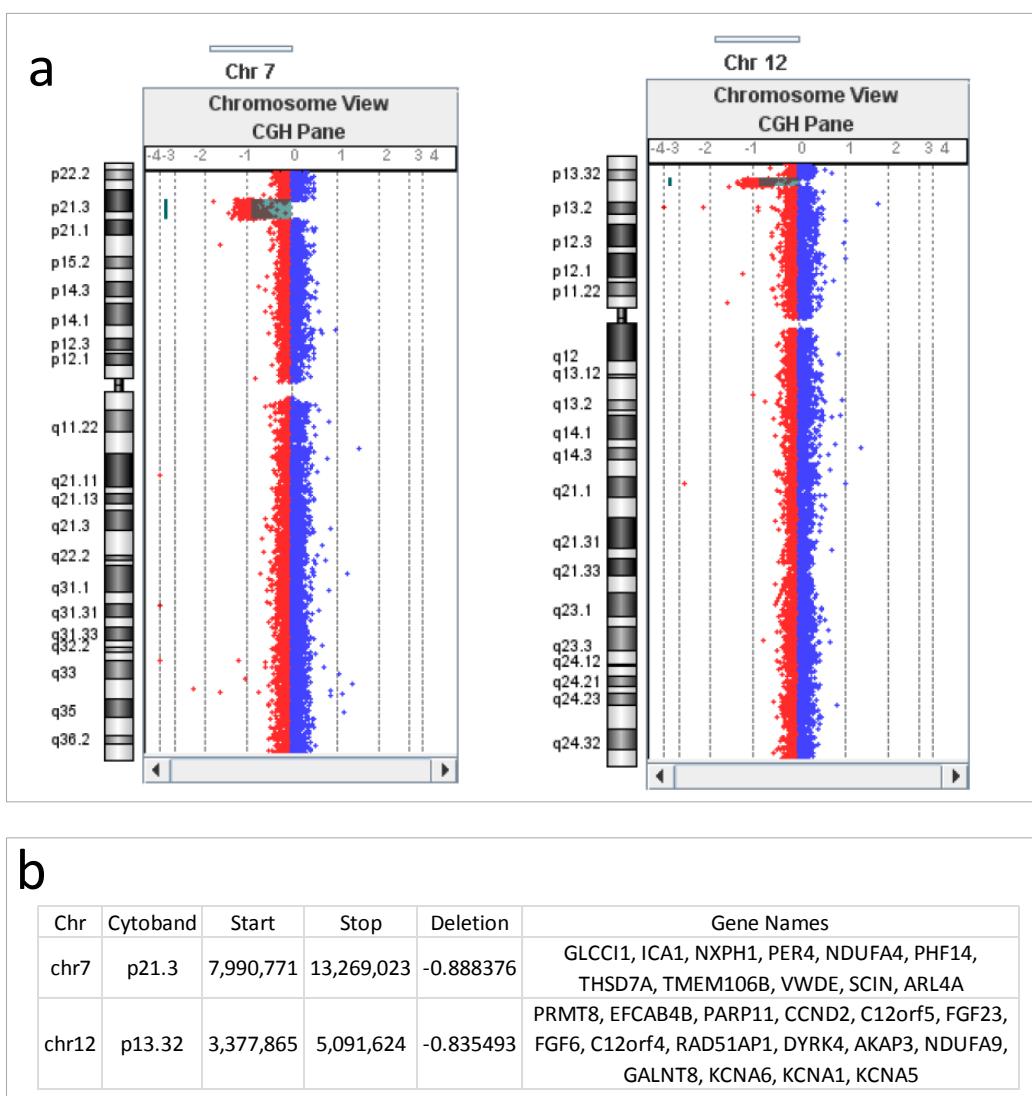


*Slika 90.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 6. Plave strelice prikazuje dodatno detektirane duplikaciju. (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije. Plava zvjezdica označava dodatno detektiranu regiju 6p21.32 s genima koji ne pridonose fenotipu mikrodelecijskog sindromu).

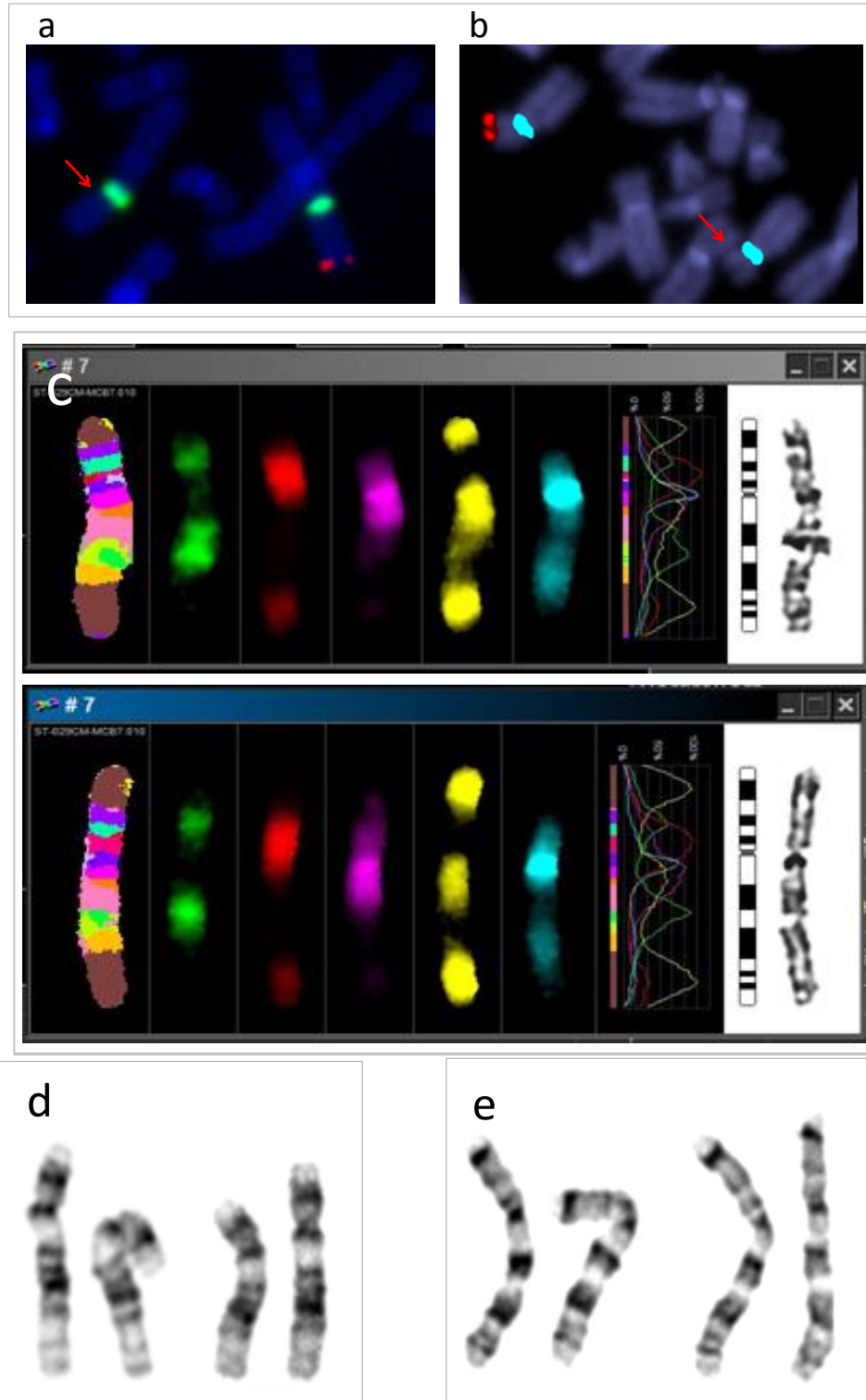


*Slika 91.* BAC FISH analiza. RP11-292F10 (crveni signal) i WCP6 (zeleni signal). Strelica označava del6q26.

**6. ST-029** ženska ispitanica, 32 godine. Uputna dijagnoza: RIP, autistično ponašanje, autoagresija, oštećenje sluha, mikrocefalija. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297 i ASD: P343 ). Array analizom detektirane su mikrodelecije dva segmenta različitih kromosoma: 7p21.3 veličine 5,3 Mb i 12p13.32 veličine 1,7 Mb (Slika 92a. i 92b.). FISH analizom potvrđen je array nalaz (Slika 93a. - 93c.). TMEM106B gen (7p21.3) je povezan s frontotemporalnom lobarnom degeneracijom i kognitivnim oštećenjem (84). NXP1 gen (7p21.3) je mogući kandidat gen za nesindromsko oštećenje sluha (85). EFCAB4B i PARP11 (12p13.32) povezani su s mikrocefalijom, dok su TSPAN9 i PMTR8 (12p13.32) povezani s hipotonijom i labavosti zglobova (86).

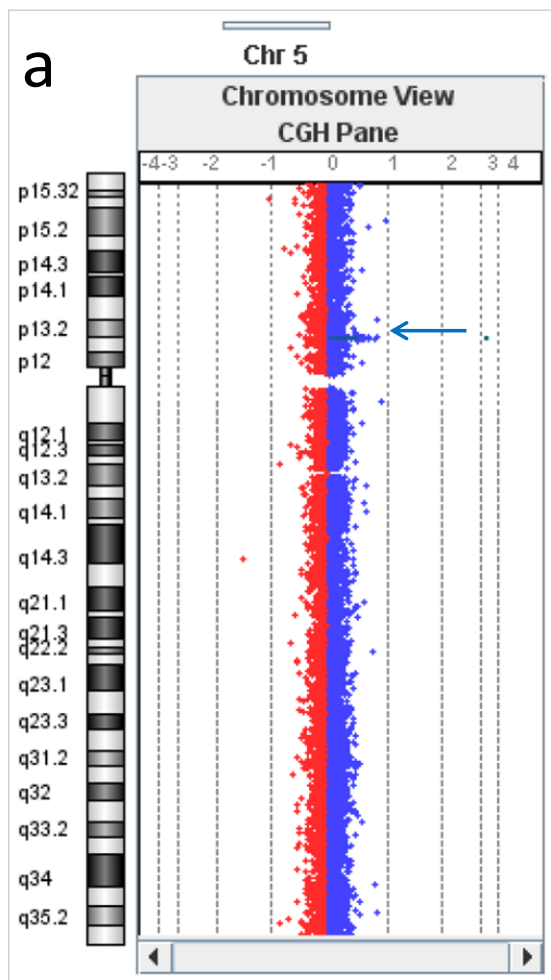


*Slika 92.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosome 7 i 12. (b) Pozicija i veličina detektiranih aberacija, te popis svih gena zahvaćenih regija.



Slika 93. (a) BAC FISH analiza kromosom 7. RP11-195L14 (crveni signal) i centomerna proba 7 (zeleni signal). Crvene strelica označava del7p21.3. (b) BAC FISH analiza kromosoma 12. RP11-320N7 (crveni signal) i centromerna proba 12 (plavi signal). Crvene strelica označava del12p13.32. (c) MCB profil kromosoma 7. (d) Parcijalni kariotip kromosom 12. (e) Parcijalni kariotip kromosoma 7.

**7. CRZ-007** – ženska ispitanica, 13 godina. Uputna dijagnoza: RIP. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297). Array analizom utvrđena je mikroduplicacija 5p13.2 veličine 395 Kb (Slika 94a. i Slika 94b). Delecije i mutacije C5orf42 gena u podlozi su Joubert sindroma 17; recipročna duplikacija koja je identificirana kod ispitanika još nije opisana u znanstvenoj literaturi.



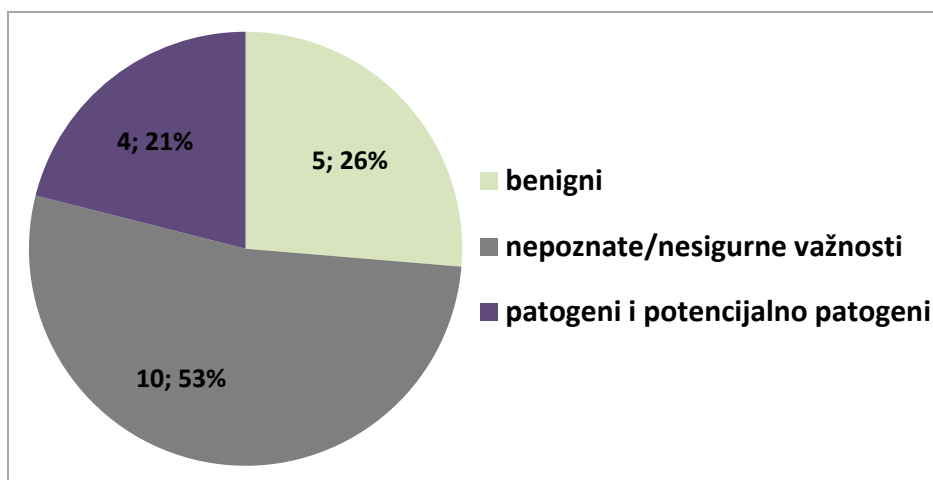
**b**

Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Gene Names
chr5	p13.2	37,178,277	37,574,217	0.535875	C5orf42, NUP155, WDR70

*Slika 94.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 5. Duplikacija je označena plavom strelicom (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije.

### 5.3.2. Aberacije detektirane aCGH analizom kod ispitanika s dijagnozom ASD uz uredan nalaz GTG, MLPA i FISH analiza.

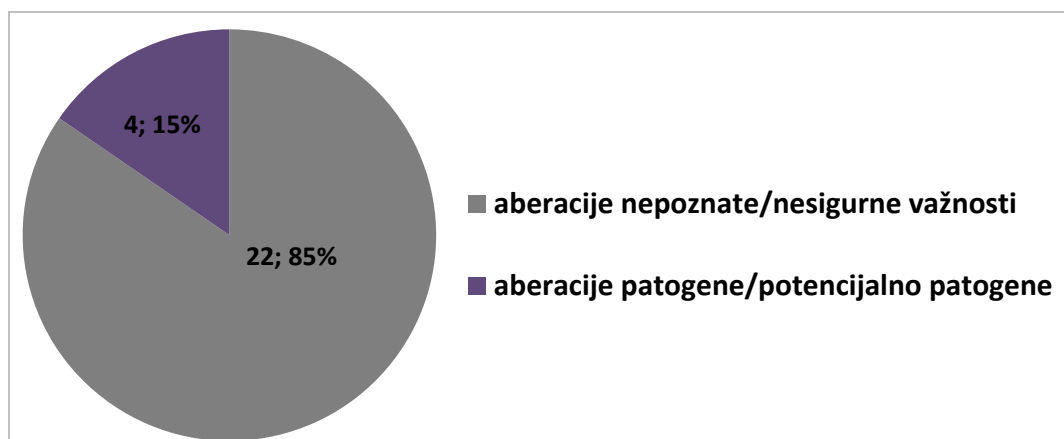
aCGH analiza provedena je kod 19 ispitanika s dijagnozom ASD-a s urednim nalazom GTG, FISH i MLPA analiza. Nakon bioinformatičke analize i selekcije kod 5 (26%) ispitanika utvrđene su benigne aberacije, kod 10 (53) ispitanika utvrđene promjena u broju kopija DNA kromosomskih segmenata klasificiranih kao nepoznate/nesigurne važnosti, dok su kod 4 (21%) ispitanika utvrđene patogene, potencijalno patogene aberacije (slika 95). Ukupno je utvrđeno 26 aberacija klasificiranih u kategorije patogene, potencijalno patogene i nepoznate/nesigurne važnosti (Slika 96). Prosječna veličina delecija je 541,98Kb (32,21Kb – 776,43Kb), dok je prosječna veličina duplikacija iznosila 477,2Kb (90,8Kb – 1,68Mb). Na slici 97. prikazan je odnos patogenih/potencijalno patogenih aberacija u odnosu na aberacije nepoznate/nesigurne važnosti.



Slika 95. Klasifikacija aberacija kod ispitanika s dijagnozom ASD kod kojih je provedena aCGH analiza. Ukupno je analizirano 19 ispitanika. Kod 5 ispitanika (26%) utvrđene su isključivo benigne aberacije, kod 10 ispitanika (53%) utvrđene su aberacije klasificiranih kao nepoznate/nesigurne važnosti i kod 4 ispitanika (21%) utvrđene su patogene i potencijalno patogene aberacije.



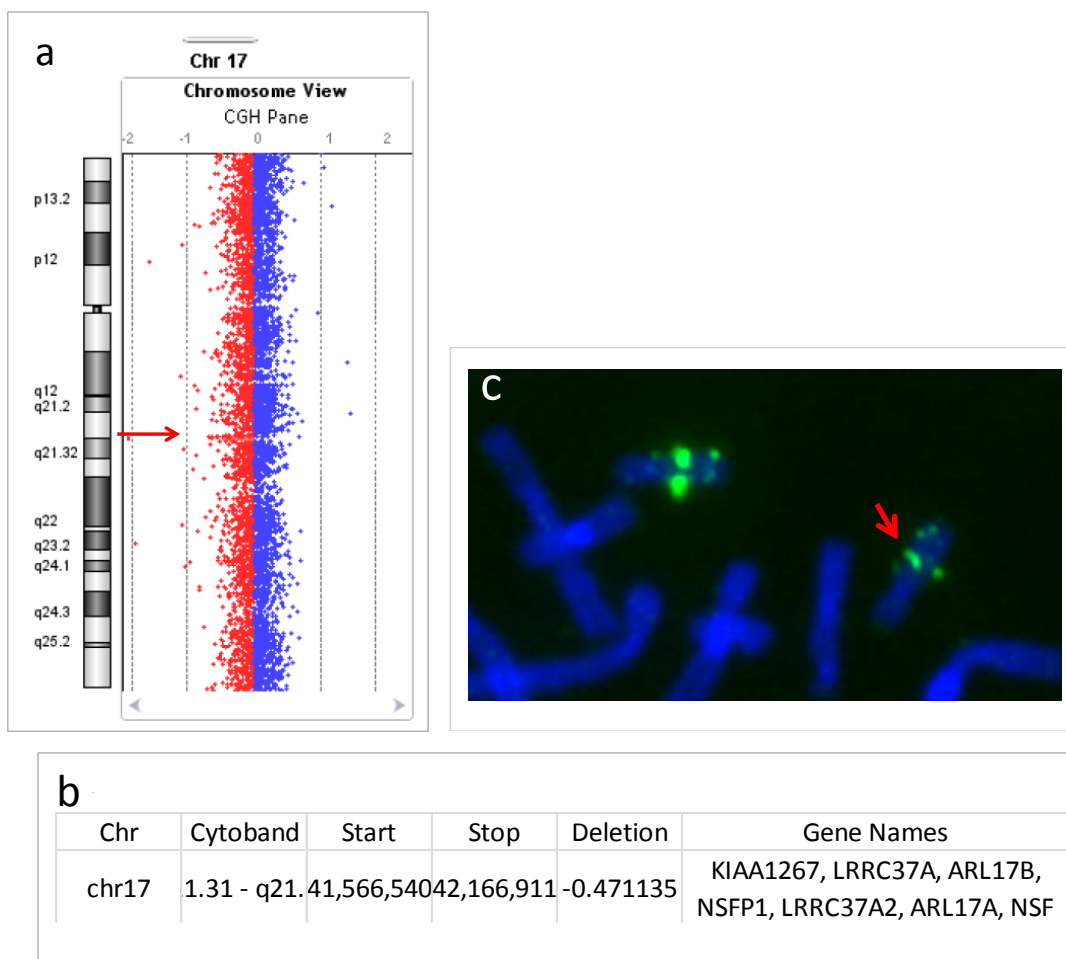
Slika 96. Odnos aberacija detektiranih aCGH analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP-a uz uredan nalaz GTG, MLPA i FISH analiza. Utvrđeno je 56 aberacija od kojih je 11 (42%) manjkova (delecije) i 15 (58%) viškova (duplikacije).



Slika 97. Odnos patogenih/potencijalno patogenih i aberacija nepoznate/nesigurne važnosti.

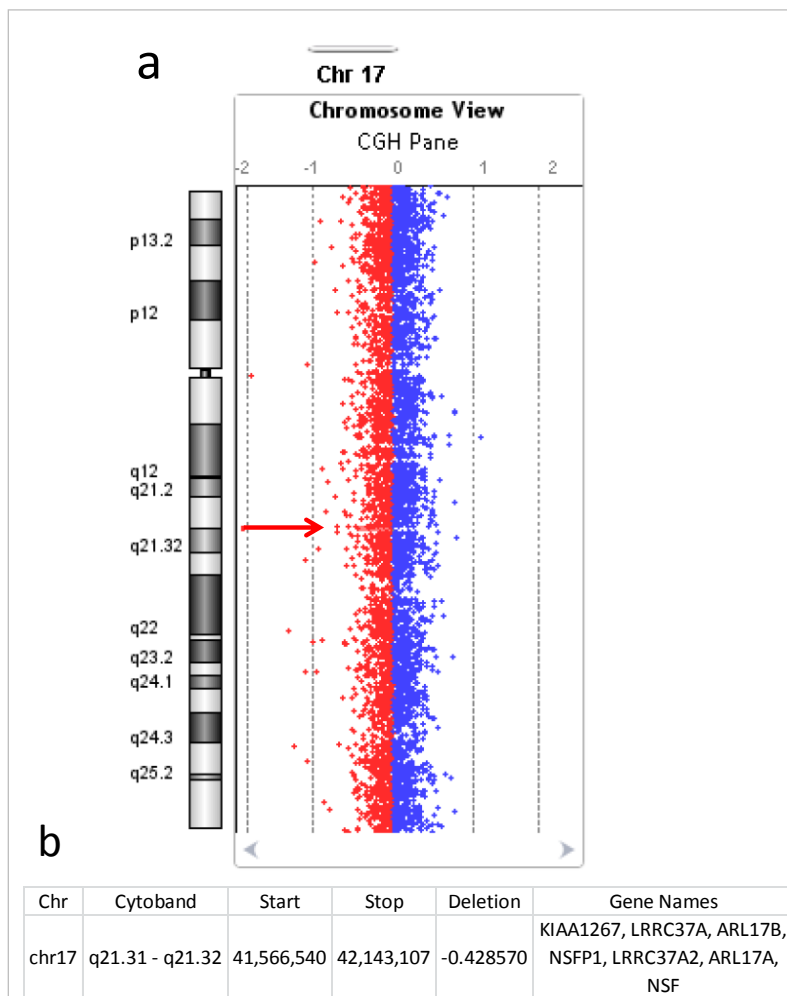
U nastavku poglavlja detaljno su prikazani pojedini nalazi kod ispitanika (ukupno 4) kod kojih su detektirane patogene i potencijalno patogene kromosomske aberacije uz prethodno uredan nalaz GTG, FISH i MLPA analiza. Uz array nalaz u slučajevima kada je bila učinjena precizne molekularne karakterizacije otkrivenih aberacija navedeni su rezultati dodatno provedenih analiza.

**1. ERF-005** – muški ispitanik, 11 godina. Uputna dijagnoza: ASD, laki RIP, Poremećaj hiperaktivnosti i deficita pažnje. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297 i ASD: P343 ). Array analizom detektirana je delecija 17q21.31 - q21.32 veličine 600 Kb (Slika 98a. i 98b.). FISH analizom potvrđena je delecija (Slika 98c.). Postavljena je dijagnoza Koolen-de Vries sindroma (17q21.31 mikrodelecijski sindrom) (87).

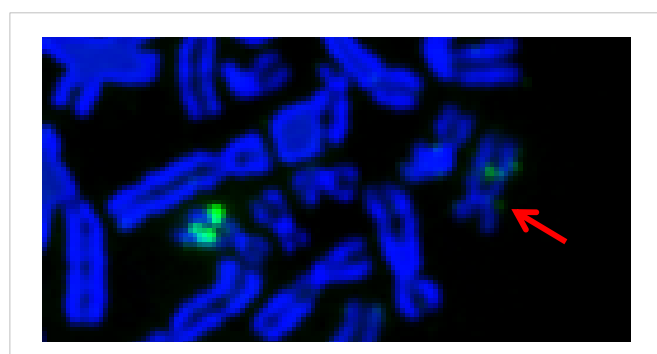


*Slika 98.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 17. Delecija je označena crvenom strelicom (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije. (c) BACK FISH analiza. CTD-254113 (zeleni signal). Strelica označava del17q21.

**2. ERF-011** – muški ispitanik, 6 godina. Uputna dijagnoza: ASD. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrodelecije: P245 i P297; ASD: P343 i MS-MLPA FRAX: ME029). Array analizom detektirana je delecija 17q21.31 - q21.32 veličine 576 Kb (Slika 99a. i 99b.). FISH analizom potvrđena je delecija (Slika 100.). Postavljena je dijagnoza Koolen-de Vries sindroma (17q21.31 mikrodelecijski sindrom) (87).



*Slika 99.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 17. Delecija je označena crvenom strelicom (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije.



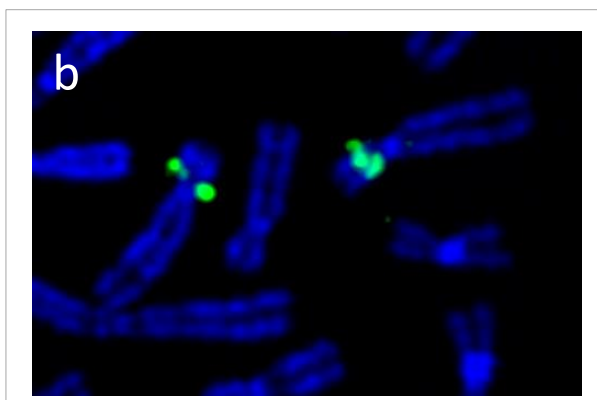
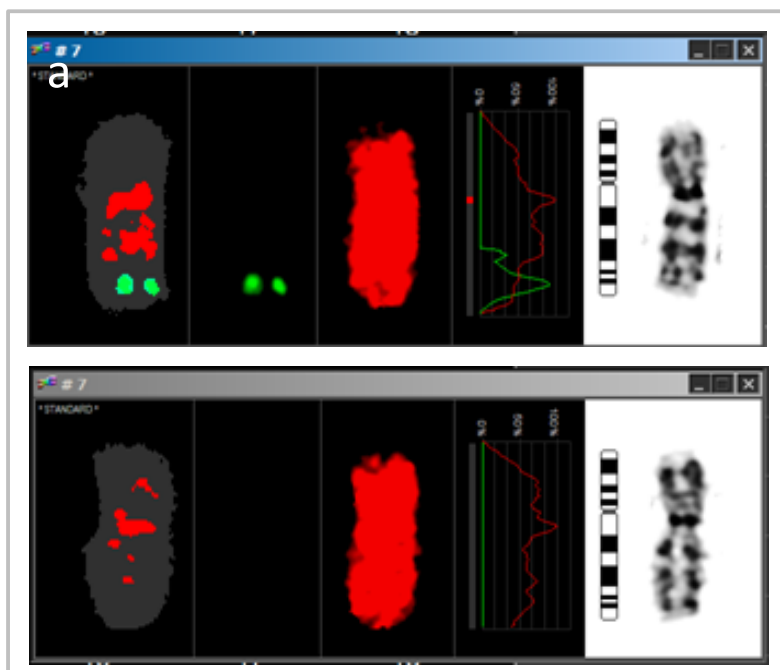
*Slika 100.* BACK FISH analiza. CTD-2541113 (zeleni signal). Strelica označava del17q21.



**3. ERF-018** – muški ispitanik, 4 godine. Uputna dijagnoza: autizam. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrolelecije: P245 i P297 i ASD: P343 ). Array analizom utvrđena je mikroduplikacija 5p13.2 veličine 374 Kb i mikrolelecija 7q35 veličine 134 Kb koja obuhvaća dio CNTNAP2 gena (Slika 101). U MLPA setu proba za ASD postoji jedna proba za CNTNAP2 gen koja se nalazi izvan deletirane regije. Iz tog razloga MLPA analiza u ovom slučaju dala je normalan rezultat. FISH analizom potvrđene su navedene kromosomske aberacije (Slika 102a. i Slika 102b.). Delecije i mutacije C5orf42 gena u podlozi su Joubert sindroma 17; recipročna duplikacija koja je identificirana kod ispitanika još nije opisana u znanstvenoj literaturi. CNTNAP2 je kandidat gen za ASD (88,89).

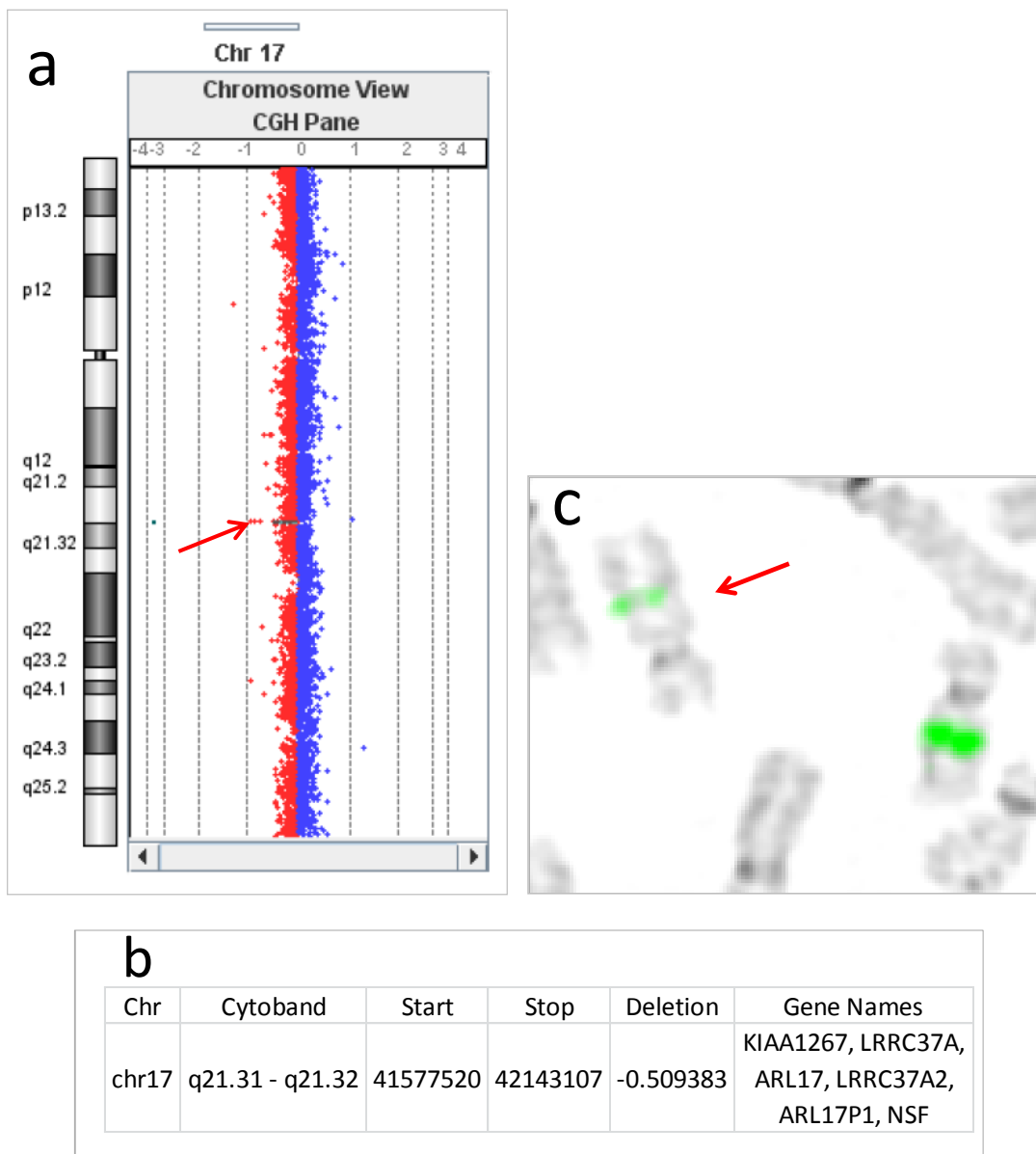
Chr	Cytoband	Start	Stop	Amplification	Deletion	Gene Names
chr5	p13.2	37,178,277	37,552,419	0.588803	0.000000	C5orf42, NUP155, WDR70
chr7	q35	145,920,565	146,055,248	0.000000	-0.994775	CNTNAP2

*Slika 101.* Pozicija i veličina detektiranih aberacija, te kompletan popis gena zahvaćenih regija.



*Slika 102.* BAC FISH analiza. (a) 7q35 – RP5-588L10 (BIO-FITC, zeleni signal) + WCP 7 (crveni signal). Strelica označava del7q35. (b) 5p13.2 – PR11-7M4 (BIO-FITC, zeleni signal). Strelica označava dup5p13.2.

**4. ERF-002** – muški ispitanik, 11 godina. Uputna dijagnoza: ASD. Uredan nalaz GTG analize i MLPA skrininga (subtelomere: P036 i P070; mikrolelecije: P245 i P297). Array analizom detektirana je delecija 17q21.31 - q21.32 veličine 565 Kb (Slika 103a. i 103b.). FISH analizom potvrđena je delecija (Slika 103c.). Postavljena je dijagnoza Koolen-de Vries sindroma (17q21.31 mikrolelecijski sindrom) (87).



*Slika 103.* (a) Shematski prikaz array rezultata za kromosom 17. Delecija je označena crvenom strelicom (b) Pozicija i veličina detektirane aberacije, te kompletan popis gena zahvaćene regije. (c) BACK FISH analiza. CTD-2541I13 (zeleni signal). Strelica označava del17q21.

### 5.3.3. Kandidat geni detektirani aCGH analizom

Daljnjom selekcijom CNV-ova koji su karakterizirani kao aberacije nepoznate/nesigurne važnosti utvrđeno je 49 gena koji su prema dostupnim literaturnim podacima uključeni u razvoj središnjeg živčanog sustava ili su njihove aberacije povezane s razvojem malformacija, ali za detektiranu aberaciju ne postoje definirani sindromi.

Tablica 14. prikazuje abecedni popis kandidat gena iz OMIM baze koji se potencijalno nalaze u podlozi RIP-a i ASD-a. Prema OMIM bazi mutacijske promjene u genima koji su prikazani zelenom bojom u tablici 14. uzrokuju poznate/opisane sindrome.

Tablica 14. Popis gena s ekspresijom u SŽS utvrđenih array CGH analizom kod ispitanika s urednim nalazom GTG i MLPA analiza.

Simbol gena	OMIM	Pozicija	del	Uputna diag.	amp	Uputna diag.	Naziv gena	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena
<b>ARHGAP8</b>	609405	22q13.31			1	RIP	GTPase-activating protein, RHO, 8	
<b>ATRN1</b>	612869	10q26			1	ASD	Attractin-like 1	
<b>ATXN10</b>	611150	22q13.31			1	RIP	Ataxin 10	Spinocerebellar ataxia 10 (phenotype 603516 (3))
<b>B3GALT6</b>	615291	1p36.33	1	RIP			UDP-Gal:beta-Gal beta-1,3-galactosyltransferase polypeptide 6	Ehlers-Danlos syndrome, progeroid type, 2 (phenotype 615349 (3)) Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, type 1, with or without fractures (phenotype 271640 (3))
<b>C12orf5</b>	610775	12p13.3	1	RIP			TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator	
<b>CASKIN1</b>	612184	16p13.3	1	RIP			CASK-interacting protein 1	
<b>CLASP2</b>	605853	3p22.3	1	RIP			CLIP-associated protein 2	
<b>CNKSR2</b>	300724	Xp22.12	1	RIP			connector enhancer of KSR 2	
<b>CNTN6</b>	607219	3p26-p25	1	RIP			Contactin 5	Cortical dysplasia-focal epilepsy syndrome (phenotype 610042 (3))
<b>CNTNAP2</b>	604569	7q35			1*	RIP	Contactin-associated protein-like 2	Pitt-Hopkins like syndrome 1 (phenotype 610042 (3)) {Autism susceptibility 15} (phenotype 612100 (3))
<b>CRHR2</b>	602034	7p14.3	1	RIP			Corticotropin releasing hormone receptor-2	
<b>CSMD2</b>	608397	1p34.3	1	RIP			Cub and Sushi multiple domains 1	
<b>DDR1</b>	600408	6p21.3	1	RIP			Neuroepithelial tyrosine kinase	
<b>DST</b>	113810	6p12.1			1	ASD	Dystonin (bullous pemphigoid antigen 1)	Epidermolysis bullosa simplex, autosomal recessive 2 (phenotype 615425 (3)) Neuropathy, hereditary sensory and autonomic, type VI (phenotype 614653 (3))
<b>EVC</b>	604831	4p16			1	RIP	Ellis-van Creveld syndrome gene	Ellis-van Creveld syndrome (phenotype 225500 (3)) Weyers acrocentric dysostosis (phenotype 193530 (3))
<b>FBLN1</b>	135820	22q13.31			1	RIP	Fibulin 1	Synpolydactyly, 3/3'4, associated with metacarpal and metatarsal synostoses (phenotype 608180 (3))
<b>FRG1</b>	601278	4q35			1	RIP	Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1	
<b>FTSJ1</b>	300499	Xp11.23			1	RIP	FTSJ homolog 1	Mental retardation, X-linked 9 (phenotype 309549 (3))
<b>FXN</b>	606829	9q21.11			1	RIP	Frataxin	Friedreich ataxia (phenotype 229300 (3)) Friedreich ataxia with retained reflexes (phenotype 229300 (3))
<b>GPHB5</b>	609652	14q23.2			1	RIP	glycoprotein hormone beta 5	

\* Opisani je mikrodelecjski sindrom za kromosomku regiju

Tablica 14. Nastavak.

Simbol gena	OMIM	Pozicija	del	Uputna diag.	amp	Uputna diag.	Naziv gena	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena
<b>GPRIN2</b>	611240	10q11.22	<b>8</b>	4 RIP/4 ASD	<b>9</b>	4 RIP/5 ASD	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2	
<b>HS6ST2</b>	300545	Xq26.2			<b>1</b>		Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	
<b>IQSEC3</b>	612118	12p13.33	<b>1</b>	RIP			IQ motif- and SEC7 domain-containing protein 3	
<b>KIAA0513</b>	611675	16q24.1	<b>1</b>	RIP			KIAA0513 gene	
<b>KIAA1267</b>	612452	17q21.31			<b>8*</b>	4 RIP/4 ASD	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))
<b>LANCL2</b>	612919	7q31.1-q31.33			<b>1</b>	ASD	LanC-like 2	
<b>MACROD2</b>	611567	20p12.1	<b>1</b>	ASD			Macro domain-containing 2	
<b>MAGEA8</b>	300341	Xq28			<b>1</b>	RIP	Melanoma antigen, family A, 8	
<b>MAGI2</b>	606382	7q21	<b>1</b>	RIP			Atrophin 1-interacting protein 1	
<b>NBPF1</b>	610501	1p36.13	<b>3</b>	1 RIP/1	<b>1</b>		Neuroblastoma breakpoint family, member 1	
<b>NPAS1</b>	603346	19q13.2-q13.3	<b>1</b>	RIP			Neuronal PAS domain protein 1	
<b>NR1D2</b>	602304	3p24.2			<b>1</b>	RIP	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	
<b>NUP50</b>	604646	22q13.31			<b>1</b>	RIP	Nucleoporin, 50 kD	
<b>PDZD2</b>	610697	5p13.3			<b>1</b>	RIP	PDZ domain containing 2	
<b>PLEKHA5</b>	607770	12p12			<b>2</b>	RIP	Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding PH domain protein 2	
<b>PPP1R14C</b>	613242	6q24.3-q25.3			<b>1</b>	RIP	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 14C	
<b>PPP1R18</b>	610990	6p21.3	<b>1</b>	RIP			Phostensin	
<b>PPP2R5E</b>	601647	14q23.1			<b>1</b>	RIP	Protein phosphatase-2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform	
<b>PRODH</b>	606810	22q11.21	<b>1</b>	RIP	<b>1</b>	ASD	Proline dehydrogenase (proline oxidase)	Hyperprolinemia, type I (phenotype 239500 (3)) {Schizophrenia, susceptibility to, 4} (phenotype 600850 (3))
<b>PTPRT</b>	608712	20q12-q13	<b>1</b>	RIP			Protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, T	
<b>RTN4R</b>	605566	22q11.21			<b>1</b>	RIP	NOGO receptor (reticulon 4 receptor)	{Schizophrenia, susceptibility to} (phenotype 181500 (3))
<b>SNPH</b>	604942	20p13	<b>1</b>	ERF			Syntaphilin	
<b>SYP</b>	313475	Xp11.23-p11.22			<b>1</b>	RIP	Synaptophysin	Mental retardation, X-linked 96 (phenotype 300802 (3))
<b>TFG</b>	602498	3q12.2			<b>4</b>	3 RIP/1 ASD	TRK-fused gene	?Spastic paraplegia 57, autosomal recessive (phenotype 615658 (3)) Chondrosarcoma, extraskeletal myxoid (phenotype 612237 (1)) Hereditary motor and sensory neuropathy, proximal type (phenotype 604484 (3))
<b>TPPP</b>	608773	5p15.3			<b>1</b>	RIP	Tubulin polymerization-promoting protein	
<b>VARS2</b>	612802	6p21.33	<b>1</b>	RIP			Valyl-tRNA synthetase 2	
<b>WDR45</b>	300526	Xp11.23			<b>1</b>	RIP	WD repeat-containing protein 45	Neurodegeneration with brain iron acculation 5 (phenotype 300894 (3))
<b>WIPF1</b>	602357	2q31.1			<b>1</b>	RIP	WAS/WASL-interacting protein family, member 1	Wiskott-Aldrich syndrome-2 (WAS2; 614493)
<b>WNT7A</b>	601570	3p25	<b>1</b>	RIP			Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	Fuhrmann syndrome (phenotype 228930 (3)) Ulna and fibula, absence of, with severe limb deficiency (phenotype 276820 (3))

\* Opisani je mikrodelecjski sindrom za kromosomku regiju

## 6. Rasprava

Prikazano istraživanje provedeno je na uzorku neselekcioniranih ispitanika podijeljenih u dvije skupine. Prva skupina od ukupno 355 ispitanika (141 ženskih i 214 muških – 1/1,5) dijagnosticiranih s RIP-om pokazuje muško/ženski omjer opisan u literaturi (1,5/1,7:1 muški/ženski) (90). Većina ispitanika iz ove skupine nalaze se u sustavu Centara za osobe s poteškoćama u razvoju (ispitanici su institucionalizirani). Druga skupina od ukupno 24 ispitanika (4 ženskih i 20 muških) s uputnom dijagnozom ASD-a pokazuje muško/ženski omjer od 5/1. Prema literaturnim podacima ASD se javlja 4 puta češće kod dječaka nego kod djevojčica (91). Neznatno veći udio muških ispitanika s uputnom dijagnozom ASD-a uključenih u istraživanje može biti posljedica odaziva roditelja zainteresiranih za sudjelovanje u istraživanju.

Kromosomske aberacije detektirane su GTG analizom kod 15 ispitanika (15/324) s dijagnozom RIP-a što iznosi 4,6%. U istraživanje nisu uključeni ispitanici s kliničkom slikom Down sindroma. Kromosomske aberacije detektirane GTG analizom kod ispitanika s dijagnozom RIP-a bile su numeričke aberacije 0,9% (3/324) i strukturne promijene 3,7% (12/324). Od detektiranih numeričkih aberacija dvije aberacije bile su vezane za spolne kromosome (2/3), dok je jedna bila hiperdiploidija (1/3).

Najčešći pojedinačni nalazi u podlozi RIP-a prema literaturnim podacima su kromosomske aberacije (92). Analizom nekoliko velikih studija utvrđeno je da se kromosomske aberacije nalaze u 4 – 34% ispitanika s RIP-om (93). Velike varijacije u broju detektiranih aberacija prvenstveno mogu biti posljedica selekcije ispitanika. U uzorku ispitanika koji se nalaze u institucijama postotak detektiranih kromosomskih aberacija iznosi 3,9 – 33,3%, dok je taj postotak 8,8% kod uzorka ispitanika koji su uključeni u obrazovni sustav (28). Također ako se isključe najpoznatije numeričke aberacije (kao što je Down sindrom) te prepoznatljivi kromosomski sindromi, kromosomske aberacije vidljive svjetlosnim mikroskopom nalaze se kod ~3% ispitanika (29, 94). Na postotak aberacija detektiranih GTG analizom također utječe rezolucija pruga. Kako provedeno istraživanje nije uključivalo ispitanike s kliničkom slikom Down sindroma ukupni postotak detektiranih kromosomskih aberacija GTG analizom nalazi se u prosijeku dosadašnjih istraživanja.

Analiza preko 200 studija pokazala je da se učestalost numeričkih aberacija kromosoma kreće oko 8,8% (0 - 42,9%) za ispitanika koji se nalaze u klinikama, te oko 9,5% (5,6 -13,3%) za ispitanike koji se nalaze u obrazovnom sustavu. Analiza je također pokazala da su numeričke aberacije autosoma znatno češće nego numeričke aberacije spolnih kromosoma (6,5/0,4% - autosomi/spolni kromosomi) (28). Broj detektiranih numeričkih kromosomskih aberacija kod ispitanika s dijagnozom RIP-a uvelike ovisi o uključivanju ili isključivanju ispitanika s kliničkom

dijagnozom Down sindroma. Ukupno manji postotak detektiranih numeričkih kromosomskih aberacija, te veći udio numeričkih aberacija spolnih kromosoma detektiranih u provedenom istraživanju u odnosu na literaturne podatke može se gledati kroz isključivanje ispitanika s kliničkom slikom Down sindroma iz istraživanja.

Detekcija strukturnih kromosomskih aberacija GTG analizom prvenstveno ovisi o rezoluciji pruganja kromosoma. Danas se standardna GTG analiza kod osoba s RIP-om provodi na razini >650 pruga/genomu (27,95). Prema literaturnim podacima strukturne aberacije kromosoma nalaze se u ~3% ispitanika (28, 29). U provedenom istraživanju GTG analizom detektirane su strukturne kromosomske aberacije u 3,7% ispitanika što se nalazi u prosjeku pregledne literature.

Kromosomske aberacije detektirane su GTG analizom kod 3 ispitanika s dijagnozom ASD-a (3/24) što iznosi 12,5%. Kod jedne ispitanice utvrđen je mozaik ring kromosom 22 uz deleciju 22p12q13.3 kromosomske regije na ring kromosomu koja se nalazi u podlozi ASD-a. Kod jedne ispitanice detektirana su dva ring kromosoma 14 u niskom postotku (1/99), dok je kod jednog ispitanika utvrđena balansirana translokacija naslijeđena od majke. Za detektirane aberacije ne možemo sa sigurnošću ustvrditi da se nalaze u podlozi ASD-a kod ispitanika.

Pregledom literature nalaze se brojni prikazi slučajeva kromosomskih aberacija detektiranih na gotovo svakom pojedinom kromosomu u ispitanika s uputnom dijagnozom ASD-a. Literaturni navodi o postotku detektiranih kromosomskih aberacija GTG analizom kod ispitanika s uputnom dijagnozom ASD-a znatno variraju. Rezultati nekoliko većih studija pokazuju da se kromosomske aberacije detektirane GTG analizom nalaze u podlozi ASD-a u ~3,4% ispitanika (0,86 – 4,8%) (96-103). Najučestalije detektirane aberacije su duplikaciji i delecije 15q11-13 kromosomske regije (približno 1%) (104-105). Nadalje, znatno često nalaze se i delecije 2q37 i 7q31 kromosomske regije, te delecije i duplikacije 22q13 kromosomske regije (106). U provedenom istraživanju detektirana je delecija 22q13 kromosomske regije kod jednog ispitanika što iznosi 4,2% (1/24), te dvije kromosomske aberacije kod dva ispitanika što iznosi 8,3% (2/24). Visok postotak aberacija detektiranih GTG analizom (4,2% i 8,3%) kod ispitanika s uputnom dijagnozom ASD-a u provedenom istraživanju obzirom na literaturne podatke može biti posljedica malog broja ispitanika uključenih u studiju. Poziv za sudjelovanje u istraživanju bio je poslan roditeljima za ukupno 100 djece s dijagnozom ASD-a. Od poslanih poziva 24 roditelja dalo je informirani pristanak za sudjelovanjem.

Aberacije detektirane GTG analizom u provedenom istraživanju potvrđuju incidenciju kromosomskih aberacija od ~3% u skupni ispitanika s dijagnozom RIP-a. Nešto veća incidencija kromosomskih aberacija detektiranih GTG analizom (ukupno 12,5%) u provedenim istraživanjem u skupini ispitanika s dijagnozom ASD-a (4,2% i 8,3%) može biti posljedica relativno malog broja ispitanika u odnosu na dosadašnja istraživanja.

Analiza MLPA tehnikom obuhvaćala je ispitanike iz obje skupine, ukupno 370, a uključivala je i ispitanike kod kojih su aberacije detektirane GTG analizom. U tim slučajevima MLPA tehnika korištena je za brzi skrining i procjenu koje FISH probe i tehnike bi bile pogodne za daljnju analizu.

MLPA analiza provedena je kod 335 ispitanika s dijagnozom RIP-a. Kod 304 ispitanika utvrđen je uredan nalaz GTG analize dok za 31 ispitanika nije bilo moguće izvršiti GTG analizu. Istraživanje je bazirano na 14 MLPA setova proba. Aberantni rezultati utvrđeni su upotrebom 8 setova probe (subtelomere – P036, P070; mikrodelecije – P297, P245; nesindromski X vezani RIP – P106; autizam – P343; kraniofacijalni – P080; PWS/AS – ME028 i FRAX – ME029). Kromosomske aberacije nisu detektirane kod 4 seta proba (RETT – P189; atyRETT – P015; UBE3A – P336 i CREBBP – P313). Ukupno je detektirano 22 delecije, 13 duplikacija i 4 aberantna metilacijska profila kod 35 ispitanika što iznosi 10,4% (35/335). Kod 8,6% ispitanika (3/35) utvrđene su po dvije aberacije.

Pregledom literature utvrđen je mali broj radova koji opisuju upotrebu panela/kombinacije MLPA setova proba u evaluaciji ispitanika s RIP-om. Prema rezultatima četiri studije kombinacijom subtelomerne MLPA analize (P036 i P070) i mikrodelecijske MLPA analize (P245) kod ispitanika s RIP-om, ali bez prethodne GTG obrade, postotak detektiranih aberacija iznosi 7,2 – 20% (107-110). 10,4% ukupno detektiranih aberacija MLPA analizom kod ispitanika s RIP-om u provedenoj studiji može biti posljedica isključivanja svih ispitanika s vidljivim strukturnih i numeričkih kromosomskim aberacijama iz postupka MLPA analize.

Prema studij koja je obuhvaćala 11688 ispitanika s RIP-om submikroskopske aberacije subtelomernih kromosomskih regija nalaze se u 2,5% ispitanika (111). Kako je FISH analiza subtelomera izrazito skupa i dugotrajna MLPA tehnika predstavljala je dobro alternativu za bržu, jednostavniju i jeftiniju analizu. Upravo zbog toga velik broj publikacija MLPA analize ispitanika s RIP-om objavljen je na području subtelomernih kromosomskih aberacija. Pregledom literature postotak detektiranih subtelomernih kromosomske aberacije MLPA analizom znatno varira od 3 – 13% obzirom na veličinu uzorka, te da li su prije MLPA subtelomerne analize isključene sve vidljive strukturne i numeričke kromosomske aberacije (55,57,112). Subtelomernom MLPA analizom u provedenom istraživanju submikroskopske kromosomske aberacije utvrđene su kod 3,7% ispitanika (12/324) što se nalazi u prosjeku pregledne literature.

Setovi MLPA proba za mikrodelecijske/mikroduplikacijske sindrome prema literaturi detektiraju kromosomske aberacije u 2,1 – 5,8% ispitanika s RIP-om (113,114). Upotrebom dva seta proba za mikrodelecijske/mikroduplikacijske sindrome (P245 i P297) kromosomske aberacije detektirane su kod 16 ispitanika, što iznosi 4,8% (16/331) i nalazi u prosjeku pregledne literature. Kod jedne ispitanice (1/16 6,25%) utvrđene su aberacije upotrebom oba seta proba.



Pregledom literature utvrđen je vrlo mali broj studija, samo tri, koje opisuju evaluaciju većeg broja ispitanika s RIP-om upotrebom MLPA seta proba za nesindromski X-vezani RIP (P106) (110,115,116). Prema dostupnim literaturnim podacima aberacije gena na X kromosomu mogu se detektirati u ~2% (0 – 5%) muških ispitanika s nesindromskim X-vezanim RIP-om. Postotak detektiranih aberacija MLPA analizom setom proba za nesindromski X-vezani RIP (P106) od 1% (1/92) nalazi se u prosijeku dostupne literature, te može biti posljedica selekcije ispitanika.

MLPA set proba dizajniran za evaluaciju ispitanika s ASD-om sadrži probe za kromosomske regije 15q11, 15q13, 16p11.2 te 22q13.33 koje su također implicirane u podlozi RIP-a (117-121). Pregledom literature nisu nađeni podatci o evaluaciji većeg broja pacijenta s RIP-om upotrebom MLPA seta proba za ASD. Provedenim istraživanjem MLPA analizom setom proba za ASD obuhvaćeno je 74 ispitanika s dijagnozom RIP-a. Kod jednog ispitanika (ST-141), što iznosi 1,6%, utvrđena je delecija egzona 9(7) GABRB3 gena. Kako u MLPA setu postoji više proba za navedeni gen sekvenciranjem dijela egzona 9 GABRB3 gena utvrđena je mutacijska promjena hibridizacijske sekvence. Pretraživanjem bioinformatičke baze podataka (Ensembl – BioMart, NCBI - ClinVar) utvrđeno je da mutacijska promjena nije opisan u literaturi.

Kraniofacijalni poremećaji mogu biti uzrokovani promjenama u nekoliko gena (122-124). MLPA set proba P080 dizajniran je za detekciju delecija i duplikacija u nekoliko gena u podlozi kraniofacijalnih poremećaja. U provedenom istraživanju detektirane su tri kromosomske aberacije kod dva pacijenta, što iznosi 18,8% (2/17). Kod jedne ispitanice (ST-001) utvrđena je duplikacija FGFR3 gena te duplikacije egzona 3, 4 i 7 RUNX2 gena. Sekvenciranjem dijelova navedenih gena nisu utvrđene mutacijske promjene. Kod jednog ispitanika (ST-018) MLPA analizom utvrđena je delecija egzona 1 MSX2 gena. Kako u MLPA set postoji više proba za navedeni gen sekvenciranjem dijela MSX2 gena utvrđena je mutacijska promjene koja nije opisana u literaturi (Ensembl – BioMart, NCBI - ClinVar). Literaturnim pregledom utvrđena je jedna studije na ukupno 35 ispitanika evaluiranih MLPA setom proba za kraniofacijalne poremećaje u kojoj je nađena jedna kromosomska aberacija MLPA analizom, što iznosi 2,9%. Relativno velik postotak detektiranih aberacija MLPA analizom setom proba za kraniofacijalne poremećaje u provedenom istraživanju može ukazivati na dobro izvršenu selekciju ispitanika.

MLPA set proba koji omogućava detekciju broja kopija DNA uz istodobno metilacijsko profiliranje razvijen krajem 2005. godine te se relativno brzo pokazala kao dobar test za analizu 15q11-q13 kromosomske regije (Prader-Willi/Angelman kritična regija) bez potrebe dodatnog testiranja roditelja (54, 125,126). Istraživanje provedeno na 20 ispitanika s uputnom dijagnozom PWS potvrdilo je dijagnozu u 6 ispitanika, što iznosi 30% (127). Znatno niži postotak detektiranih slučajeva PWS/AS u provedenom istraživanju, ukupno 2% (2/38) ovisio je o selekciji ispitanika.

Aberacije UBE3A gena nalaze se u podlozi Angelman sindroma kod 5-10% ispitanika (128,129). Analiza UBE3A gena indiciran kod ispitanika s kliničkom slikom Angelman sindroma te normalni nalazom analiza 15q11-q13 kromosomske regije U istraživanju analiza UBE3A gena provedena je kod 38 ispitanika MLPA setom proba za UBE3A gen (P343). Aberacije UBE3A gena nisu pronađene niti kod jednog ispitanika, ali je utvrđeno da 34% (13/38) ima MTHFR c.677C>T (p.A222V) mutacijsku promjenu. Literaturnim pregledom nalaze se podatci koje ukazuju da je prisutnost A222V mutacije povezan s povećanim rizikom za epimutacijske promijene na kromosomu 15 (130).

Sindrom fragilnog X kromosoma (FXS) drugi je vodeći uzrok RIP-a nakon Down sindroma te se procjenjuje da se nalazi u podlozi 1% opće populacije s RIP-om te u oko 10% X vezanog RIP-a (131). Metilacijska inaktivacija FRM1 gena događa se u slučaju kad je CGG triplet egzona 1 FMR1 gena prisutan u više od 200 ponavljanja što za posljedicu ima pojavu fragilnog X sindroma. Metilacijsko specifični MLPA set proba za sindrom fragilnog X kromosoma uz detekciju delecija/duplikacija omogućava metilacijsko profiliranje FMR1 i AFF2 gena. U provedenom istraživanju analiza MLPA setom proba za FSX provedena je kod 49 ispitanika te je kod njih 3 utvrđena puna mutacija FMR1 gena, što iznosi 6,1%. Prema literaturnim podacima objavljena je jedna studija u koju je bilo uključeno 98 ispitanika prospektivno i 44 ispitanika retrospektivno. Ukupni postotak detekcije pune mutacije CGG trileta bio je 19% (52,3% za retrospektivnu studiju, te 4% za prospektivnu studiju) (132). Provedeno istraživanje rađeno je kao prospektiva studija te je postotak detektiranih aberacija nešto veći nego u preglednom radu, što može biti posljedica manjeg broj provedenih analiza ili drugačije/različite selekcije ispitanika. Detektirani broj aberacija u provedenom istraživanju (0,9% - 3/335) odgovara literaturnim navodima o ukupnom broju od 1% FXS u općoj populaciji ispitanika s RIP-om.

Evaluacija ispitanika s kliničkom slikom RETT i atipičnog RETT sindroma provedeno je u istraživanju upotrebom dva seta MLPA proba. P015 set proba dizajniran je za detekciju delecija/duplikacija MECP2 gena, dok je P189 set proba dizajniran je za detekciju delecija/duplikacija CDKL5, NTNG1, ARX i FOXP1 gena. Kod ukupno 12 ispitanika primijenjena su obadva seta proba, kod 34 ispitanika primijenjen je P015 set proba, dok je kod 7 ispitanika primijenjen P189 set proba. Aberacije nisu pronađene kod niti jedno ispitanika, što se može objasniti/očekivati jer prema literaturnim podacima RETT i atipični RETT sindrom uzrokovani su prvenstveno mutacijskim promjena unutra gena (133-135). Literaturni navodi o delecijama i duplikacijama MECP2 gena temelji se na analizi već selekcioniranih ispitanika s urednim nalazom sekvenciranja MECP2 gena (56,136-138).

Genetski faktori predstavljaju za sada najveći dio poznate etiologije ASD, 10-20%. Međutim niti jedan od pojedinačnih genskih faktora (poznati genetskih sindromi pa do promjena u pojedinim bazama DNA) ne obuhvaća više od 1-2% svih slučajeva ASD-a (30). Radi

isključivanja poznatih submikroskopskih kromosomskih aberacija u podlozi ASD-a MLPA analiza provedena je kod 21 ispitanika s dijagnozom ASD-a i urednim nalazom GTG analize.

Evaluacija ispitanika s dijagnozom RIP-a provedena je upotrebom 6 MLPA setova proba (MLPA set proba za autizam – P343; subtelomerni MLPA setovi – P036 i P070; mikrodelecijski/mikroduplicacijski MLPA setovi – P245 i P297 te MLPA set proba za FRAX – ME029). Aberantni rezultati nisu detektirani niti sa jednim MLPA setom proba.

Pregledom literature utvrđen je mali broj studija evaluacije ispitanika s ASD-om upotrebom pojedinačnih ili kombinacijom različitih MLPA setova proba. Dvije studije koje uključuju veću grupu ispitanika, ukupno 801, s dijagnozom ASD-a detektiraju submikroskopske kromosomske aberacije u 1-2% ispitanika kombinacijom različitih MLPA setova proba (104,134). Najveći broj pojedinačno detektiranih aberacija nalazi se na 15q11-q13 kromosomskoj regiji. Normalni rezultat u svim provedenim MLPA analizama u istraživanju moguća su posljedica ograničenog broja ispitanika koji su bili uključeni u istraživanje.

MLPA analiza proveden je kod ukupno 11 ispitanika s aberacijama utvrđenim GTG analizom (Tablica 14.). Nebalansirane strukturne translokacije detektirane GTG analizom kod tri ispitanika bile su prisutne u svim analiziranim metafazama. MLPA subtelomerna analiza detektirala je nebalansirane translokacije kod sva tri ispitanika, 100%, što je u skladu s literaturnim navodima (57,108). MLPA subtelomerna analiza detektirane translokacije kod ispitanika ERF-021 pokazala je normalan rezultat, što je ukazivalo da je detektirani strukturni poremećaj balansiran. Navedeni nalaz također je u skladu s literaturni navodima da MLPA subtelomerna analiza ne detektira balansirane kromosomske aberacije (140).

Kod tri ispitanika indiciran je daljnja analiza određenih kromosoma ili kromosomskih regija. MLPA analiza pokazala je pozitivni rezultat u jednom slučaju. Kod ispitanica CRZ-023 GTG analizom utvrđena je delecija 15q11 kromosomske regije, dok je metilacijska MLPA analizom pokazala prisutnost samo metiliranih kopija gena 15q11 kromosomske regije. Prikazani rezultati ukazuju da je MLPA tehnika primjenjiva u slučajevima ciljane analize kromosomskih segmenta.

GTG analizom u provedenom istraživanju detektirana su 4 slučaja mozaičnih formi kromosomskih aberacija koje su bile uključene u daljinu obradu MLPA analizama (Tablica 14.).

Pregledom literature nalaze se pojedinačni slučajevi evaluacije ispitanika s mozaik marker kromosomima različitim MLPA setovima proba. Prema literaturi mozaik marker kromosomi prisutni u ~40% metafaza mogu biti detektirani MLPA analizom (141,142). MLPA analiza setom proba za autizam kod ispitanika s marker kromosom u 80% metafaza (ST-144) pokazala je nedvosmisleno duplikaciju referentne probe za 1q21 kromosomsku regiju, što je bila indicacija da je marker kromosom porijeklom s kromosoma 1.

Numeričke kromosomske aberacije prisutne u nemozaičnoj formi prema literaturnim podacima detektirane su MLPA analizom u 100% slučajeva (143,144). U provedenom istraživanju hiperdiploidija utvrđena je kod jedne ispitanice (ST-012) u 6% analiziranih metafaza. MLPA analiza subtelomera, te mikrolelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma pokazala je normalan rezultat, što može biti u vezi s relativno niskim postotkom hiperdiploidije utvrđene GTG analizom.

U provedenom istraživanju kod dvije ispitanice GTG analizom utvrđeni su ring kromosomi (Tablica 16.). MLPA analiza subtelomera, te mikrolelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma kod ispitanice s ring kromosomom prisutnim u 1% analiziranih metafaza (ERF-022) pokazala je normalan rezultat što je posljedica iznimno niskog postotka mozaicizma. MLPA analiza setom proba za autizam pokazala deleciju egzona 9(7) GABRB3 gena. Sekvenciranjem dijela egzona 9(7) GABRB3 gena unutar kojeg se nalazi deletirana MLPA proba utvrđena je mutacijska promjena A>AG (19348A>AG). Ista mutacijska promjena detektirana je i kod ispitanika ST-141. Pretraživanjem bioinformatičke baze podataka (Ensembl – BioMart, NCBI - ClinVar) utvrđeno je da mutacijska promjena nije opisan u literaturi. MLPA analiza kod ispitanice s ring kromosomom u 42% analiziranih metafaza (ERF-012) pokazala je nedosljednost među različitim setovima proba. MLPA analiza subtelomera pokazala je normalan rezultat, dok je MLPA analiza za mikrolelecijske sindrome i autistični spektar pokazala deleciju SHANK3 gena, što može ukazivati na manju osjetljivost pojedinih MLPA setova proba ili pojedinih MLPA proba obzirom na razinu mozaicizma. Literaturnim pregledom nađeni su pojedinačni slučajevi evaluacije ispitanika s mozaik ring kromosomima upotrebom različitih MLPA setova proba (145,146).

Postotak detekcije mozaicizma MLPA tehnikom razlikuje se kroz literaturu obzirom na set proba. Najveći broj publikacija su prikazi slučajeva koji imaju različite uputne dijagnoze (147-151). Prema dostupnim podacima samo jedna studija proveden je u cilju utvrđivanja senzitivnosti MLPA tehnike u detekciji mozaicizma prema kojoj MLPA tehnikom nije moguće pouzdano detektirati mozaicizam ispod ~40% (152). Ukupno gledajući u provedenom istraživanju MLPA analizom detektirani su mozaik slučajevi s postotkom mozaicizma većim od 40% što je u skladu s literaturnim podacima, uz naglasak da su u provedenom istraživanju različiti MLPA setovi proba pokazali različitu senzitivnost detekcije mozaicizma.

U slučajevima kada je MLPA analiza pokazala aberacije pojedinih egzona gena ili pojedinih gena iz veće regije mikrolelecijskih sindroma prema preporukama MRC-Holland kompanije učinjeno je sekvenciranje odgovarajućih kromosomskih regija. Ukupno je u istraživanju bilo detektirano 8 takvih slučajeva. Kod 3 ispitanika (ST-018; ST141 i ERF-022) potvrđene su mutacijske promijene unutar hibridizacijske sekvence MLPA proba što je za posljedicu imalo detekciju delecije MLPA analizom.

Kod 3 ispitanika u istraživanju MLPA analizom detektirane su delecije pojedinih gena iz većih regija mikrolelecijskih sindroma P245 MLPA setom proba (ST-015 del SEMA7A, ST-199 del SATB2, ST-229 del SNAP29), dok je kod jednog ispitanika detektirana delecija subtelomere 19q13 P070 MLPA setom proba (ST-177). Rezultati sekvenciranja nisu detektirali mutacijske promjene niti kod jednog od navedenih ispitanika. Daljnjom analizom svake pojedine MLPA probe koja je pokazivala aberantne rezultate utvrđeno je da lijeva i desna strana (hibridizacijske sekvence) MLPA probe imaju homologiju s više od jedne sekvence u humanom genomu. Prema informacijama iz osobne komunikacije s MRC-Holland kompanijom višestruka homologija lijeve i desne strane MLPA probe ne bi trebala utjecati na reducirani signal u MLPA analizi. Pregledom literature nisu pronađene publikacije vezane za višestruku homologiju MLPA proba, međutim postoji mogućnost da su delecije detektirane MLPA analizom veće od PCR produkata korištenih za sekvenciranje (PCR produkti bili su od 300-500 pb). U tom slučaju heterozigotna delecija za posljedicu ima PCR umnažanje DNA s normalnog alela, te uredan nalaz sekvenciranja (153).

aCGH analiza provedena je kod ukupno 68 ispitanika s urednim nalazom GTG analize i MLPA skrininga. U istraživanju aCGH analiza provedena je kod 49 ispitanika s dijagnozom RIP-a uz uredan nalaz GTG analize te uredan nalaz MLPA analiza (subtelomera; mikrolelecijski i mikroduplikacijski sindromi). Kod 12 ispitanika (25%) nisu utvrđene aberacije gena koji su povezani s razvojem SZŠ niti se nalaze u podlozi razvoja malformacija. Kod 7 ispitanika (14%) utvrđene su aberacije koje nisu prisutne u bioinformatičkim bazama podataka kao normalne varijacije u broju kopija te se za njih sa velikom sigurnošću može reći da se nalaze u podlozi RIP-a. Kod 3 ispitanika utvrđeni su poznati mikrolelecijski/mikroduplikacijski sindromi (mikroduplikacija Xp11.23 i mikrolelekcija 22q11.21; mikrolelekcija 15q11; mikroduplikacija 16p13), dok su kod 4 ispitanika otkrivene aberacije koje za sada u literaturi nisu opisane i definirane kao sindromi. Pregledom baze kliničkih varijanti (NCBI ClinVar) nalazi se dva zapisa o deleciji 3p22 kromosomskog segmenta veličine ~4 Mb kod ispitanika s RIP-om i pridruženim dizmorfijama. Navedena aberacija u bazi klasificirana je kao patogena. Navedeni slučajevi imaju djelomično preklapajuću kromosomsku regiju s delecijom 3p24.1-p22.3 detektiranom kod ispitanice s dijagnozom RIP-a što upućuje na mogućnost iste fenotipske manifestacije delecije 3p22 kromosomskog segmenta. Delecija djela PARK2 gena veličine 227 Kb detektirana kod ispitanika s dijagnozom RIP-a u literaturi se djelomično preklapa s četiri slučaja vrlo malih delecija (od 216 Kb do 497 Kb) opisanih kod ispitanika s RIP-om, epilepsijom te dizmorfičnim fenotipom. Ovi literaturni podatci, te ovaj rezultat aCGH analize može upućivati na najmanju preklapajuću regiju. Međutim potrebne su daljne analize i veći broj ispitanika da bi se izveo strogi/konačni zaključak. Mikrolelekcija dva kromosomska segmenta, 7q21.3 i 12p13.32, detektirani su kod jednog ispitanika. Unutar 7q21.3 mikrolelekcije veličine 5,3 Mb nalazi se TMEM106 gen (Transmembrane protein 106B) povezan s frontotemporalnom lobarnom degenracijom i kognitivnim oštećenjem (84). Također pregledom baze kliničkih varijanti mikrolelekcija kromosomskog segmenta 7q21.3 djelomično se preklapa s delecijama

detektiranim u slučajevima RIP-a uz dizmorfičan fenotip. Mikroduplikacija 5p13.2 veličine 395 Kb otkrivena kod ispitanika aCGH analizom prema bazi kliničkih varijanti detektirana je u dva slučaja RIP-a uz morfološki abnormalni razvoj. Navedene aberacije približno su iste veličine kao aberacija otkrivena u istraživanju što može upućivati da detektirana aberacija ima potencijalno patogeni efekt.

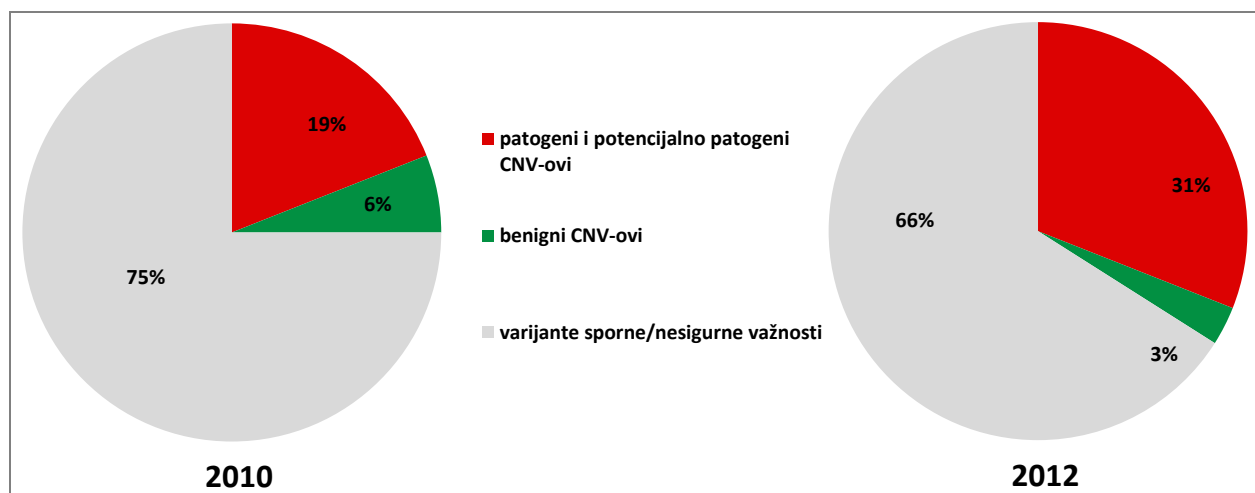
Ukupno 19 ispitanika s dijagnozom ASD-a uz uredan nalaz GTG analize te uredan nalaz MLPA analiza (subtelomera; mikrodelecijski i mikroduplikacijski sindromi) bilo je obuhvaćeno aCGH analizom u provedenom istraživanju. Kod 5 ispitanika (26,3%) nisu utvrđene aberacije gena koji su povezani s razvojem SZŽ niti se nalaze u podlozi razvoja malformacija. Kod 4 ispitanika (21%) utvrđene su aberacije za koje se sa velikom sigurnošću može reći da se nalaze u podlozi ASD-a. Kod tri ispitanika detektirana je mikrodelecija 17q21.31 veličine ~600 Kb koja zahvaća KIAA1267 gen (KAT8 regulatory NSL complex subunit 1). Detektirana delecija opisna je u literaturi kao 17q21.31 mikrodelecijski sindrom (Koolen-de Vries sindrom). Mikrodelecija unutar 7q35 kromosomskog segmenta koja obuhvaća dio CNTNAP2 gena (Contactin Associated Protein-Like 2) detektirana je kod jednog ispitanika s dijagnozom ASD-a. Prema literaturnim podacima aberacije CNTNAP2 gena detektirane su kod ispitanika s ASD-om, te je CNTNAP2 gen kandidat u podlozi ASD-a (88,89).

Array tehnika danas postaje metoda izbora u genetskoj evaluaciji ispitanika s neurorazvojnim poremećajima obzirom na iznimnu moć rezolucije u istraživanju kromosomskih aberacija. Stopa detekcije kromosomskih aberacija array tehnike ovisi o rezoluciji platforme, stoga veći postotak detekcije može značiti upotrebu platforme veće rezolucije. Pregledom preko 30 publikacija koje navode upotrebu array tehnike u evaluaciji ispitanika s RIP-om i/ili ASD-om, postotak detektiranih patogenih aberacija kreće se između 15-20% za ispitanike s RIP-om i ~10% za ispitanike s ASD-om (94,154,155). Broj detektiranih patogenih aberacija u provedenom istraživanju iznosi ~17,7% (RIP-14,3% i ASD-21%) i nalazi se u granicama pregledane literature.

Istraživanje humanog genoma na sve većoj rezoluciji omogućilo je danas rutinsku detekciju sve većeg broja aberacija pojedinih gena ili dijelova gena. Velika količina informacija dobivenih array analizom ponekad može biti izazov u utvrđivanju patogenih aberacija u podlozi neurorazvojnih poremećaja. Također sve veća rezolucija array platforma povećava broj detektiranih aberacija s nesigurnim/nepoznatim utjecajem na fenotip. Prema literaturi analiza detektiranih promjena u broju kopija DNA bazira se na pretraživanju bioinformatičkih baza podataka i utvrđivanju da li je detektirana aberacija prisutna kao varijacija u broju kopija kod normalnih osoba, te da li postoje publicirani slučajevi s istim aberacijama i uputnim dijagnozama. Obzirom na dostupne podatke detektirane promjene u broj kopija klasificiraju se na: (i) patogene i potencijalno patogene; (ii) varijante sporne/nesigurne važnosti i (iii) benigne (156-160).

Analizom kromosomskih regija detektiranih array analizom u provedenom istraživanju kroz bioinformatičke baze utvrđeno je 49 gena za koje postoji zapis o ekspresiji u SŽS koji su potencijalni geni kandidati u podlozi RIP-a i ASD-a.

Obzirom na sve veću rezoluciju istraživanja humanog genoma veliki izazov predstavlja validacija i interpretacija detektiranih promjena u broju kopija, što se osobiti odnosi na varijante klasificirane kao sporne/nesigurne važnosti. Danas kada je array tehnologija u detekciji varijacija u broju kopija vjerojatno dosegla svoj maksimumu, za očekivati je da se broj detektiranih aberacija u budućnosti neće znatno mijenjati. Međutim klasifikacija detektiranih aberacija znatno se mijenja. Pregledom literature dolazi se do zapanjujućih podataka da su u sve većem broju CNV-ovi detektirani array tehnologijom klasificirani kao patogeni/potencijalno patogeni. Tako je u samo dvije godine broj CNV-ova koji su klasificiranih kao patogeni porastao sa 19% na 31%. Na slici 104 je prikazan odnos klasifikacije CNV-ova detektiranih kod iste skupine ispitanika (ukupno 67) ali za razdoblje evaluacije kroz dvije godine iz kojeg je jasno vidljiv pomak prema većem broju CNV-ov klasificiranih kao patogeni (161).



Slika 104. Klasifikacija CNV-ova kroz razdoblje 2010-2012. (Modificirano prema Palmer E. i sur. Am J Med Genet A. 2014;164A(2):377-385.)

Ovakav pomak u klasifikaciji posljedica je kombinacije različitih faktora među kojima su: (i) novi literaturni podatci koji razjašnjavaju fenotipske posljedice CNV-ova, što uključuje redefiniranje najmanje kritične regije mikrodelecijskih/mikroduplicacijskih sindroma, (ii) novi dokazi o funkcionalnim učincima CNV-ova, (iii) otkrivanje novih kandidat gena u podlozi neurorazvojnih poremećaja upotrebom array tehnika, sekvenciranjem sljedeće generacije i asocijacijskih studijama, (iv) reseqvenciranjem humanog genoma – Hg19, (v) preciziranjem podataka o patogenosti pojedinih CNV-ov u bioinformatičkim bazama podataka. Uzimajući sve navedeno, interpretacija array rezultata u nekim slučajevima još uvijek predstavlja izazov.

## 7. Zaključci

1. Prevalencija kromosomskih aberacija detektiranih GTG analizom iznosi 4,6% u grupi ispitanika s dijagnozom RIP-a, te 12,5% u grupi ispitanika s dijagnozom ASD-a.
2. Kombinacijom MLPA setova proba (subtelomere, mikrodelecije/mikroduplicacije, PWS/AS, FRAX, kraniofacijalni poremećaji) kod 10,3% ispitanika s dijagnozom RIP-a detektirane su submikroskopske kromosomske aberacije (one koje nije bilo moguće detektirati GTG analizom).
3. aCGH analizom patogene kromosomske aberacije detektirane su kod 7% ispitanika s dijagnozom RIP-a i urednim nalazom GTG i MLPA analiza, te u 21% ispitanika s dijagnozom ASD-a i urednim nalazom GTG i MLPA analiza.
4. Istraživanje je pokazalo da je MLPA tehnika vrlo primjenjiva i djelotvorna, te omogućava brže, jednostavnije i jeftinije otkrivanje submikroskopskih kromosomskih aberacija u odnosu na GTG i FISH analize, te može služiti kao prva skrining tehnika u detekciji submikroskopskih kromosomskih aberacija kod osoba s dijagnozom RIP-a.
5. U slučajevima detekcije aberacija GTG i/ili MLPA analizama, aCGH analiza omogućava preciznu molekularnu karakterizaciju uz određivanje preciznih točaka loma kromosomskih segmenata, te sadržaja gena zahvaćene regije.
6. Primjena FISH tehnike pokazala se kao izuzetno važna jer omogućava karakterizaciju mehanizama aberacija detektiranih GTG, MLPA ili aCGH analizama.
7. Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na važnost potvrde MLPA rezultata koji pokazuju aberacije unutar pojedinih gena ili aberacije koje uključuju više nepovezanih genskih regija. U provedenom istraživanju sekvenciranje pojedinih regija gena pokazalo se kao metoda izbora za provjeru delecija detektiranih MLPA analizom.
8. Metilacijsko specifična MLPA tehnika u provedenom istraživanju pokazala se kao djelotvorna metoda u skriningu muških ispitanika s RIP-om na FRAX sindrom. Također, MS-MLPA tehnika omogućava jednostavnije i brže testiranje Prader-Will i Angelman sindroma bez potrebe testiranja roditelja.
9. Kod ispitanika s dijagnozom RIP-a i ASD-a uz urednan nalaz GTG analize strategija skrininga genoma primjenom recentnih molekularno citogenetskih tehnika pokazala se kao djelotvorna u otkrivanju patogenih i potencijalno patogenih submikroskopskih kromosomskih promjena.



10. Uzimajući u obzir ograničenja, bilo rezolucijska ili tehnička, pojedinih molekularno citogenetskih tehnika rezultati istraživanja ukazuju na važnost primjene svih dostupnih tehnika (GTG, MLPA, FISH, aCGH, sekvenciranje) u genetskoj evaluaciji osoba s dijagnozom RIP-a i ASD-a s ciljem postavljanja precizne dijagnoze u što većem broju slučajeva.
11. aCGH tehnikom otkriven je veći broj submikroskopskih aberacija u podlozi RIP-a i ASD, te su temeljem rezultata aCGH analize ovog istraživanja otkriveni geni kandidati (ARHGAP8, ATRNL1, ATXN10, B3GALT6, C12orf5, CASKIN1, CLASP2, CNKSR2, CNTN6, CNTNAP2, CRHR2, CSMD2, DDR1, DST, EVC, FBLN1, FRG1, FTSJ1, FXN, GPHB5, GPRIN2, HS6ST2, IQSEC3, KIAA0513, KIAA1267, LANCL2, MACROD2, MAGEA8, MAGI2, NBPF1, NPAS1, NR1D2, NUP50, PDZD2, PLEKHA5, PPP1R14C, PPP1R18, PPP2R5E, PRODH, PTPRT, RTN4R, SNPH, SYP, TFG, TPPP, VARS2, WDR45, WIPF1, WNT7A) koji se potencijalno nalaze u podlozi RIP-a i ASD-a.
12. Provedeno istraživanje ukazuje da molekularno citogenetske tehnike skrininga genoma, MLPA i aCGH, omogućavaju analizu neurorazvojnih poremećaja od genotipa prema fenotipu, što olakšava definiranje novih genetskih sindroma.

## 8. Sažetak

Neurorazvojni poremećaji obuhvaćaju veliku grupu, klinički heterogenih, kroničnih poremećaja koje karakterizira oštećenje razvoja središnjeg živčanog sustava, što za posljedicu ima narušeno napredovanje u jednoj ili više razvojnih domena (tjelesna, kognitivna/spoznajna, socijalna i emocionalna). Razvojni intelektualni poremećaj (RIP, engl. Intellectual disability) i poremećaji autističnog spektra (engl. Autism spectrum disorders, ASD) predstavljaju česte neurorazvojne poremećaje kojima je zajedničko teško oštećenje kognitivnog razvoja u ranoj dječjoj dobi i adolescenciji. RIP se definira kao ispodprosječno intelektualno funkcioniranje uz značajna ograničenje u najmanje dvije vještine svakodnevnog života. Procjenjuje se da RIP zahvaća 1-3% opće populacije. Prema razini intelektualnog funkcioniranja RIP se djeli na: blagi (IQ 50 – 55), umjereni (35-40/50-55), teški (20-25/ 35-40), duboki (ispod 20/25), te RIP neodređene težine. Laki/blagi oblik RIP-a javlja se 7-10 puta češće od težih stupnjeva, te se procjenjuje da obuhvaća 80-85% svih osoba s RIP-om. ASD kao dijagnostička kategorija obuhvaća širok spektar poremećaja rane dječje dobi obilježenih velikim odstupanjima u socijalnim interakcijama, socijalnoj komunikaciji i imaginaciji te motoričkim vještinama koje se očituju u stereotipijama. Prema današnjim istraživanjima procjenjuje se da prevalencije ASD-a iznosi 62/10000, a javlja se 4 puta češće kod dječaka u odnosu na djevojčice.

Etiološka dijagnoza u osoba s RIP-om identificira se u 40-60% slučajeva. Međutim etiologija blagog RIP-a koji se javlja 7-10 puta češće od umjerenog i teškog, poznata je tek u oko 24% slučajeva. Genetski faktori nalaze se u podlozi 30% svih slučajeva RIP-a, te predstavljaju više od 60% svih poznatih uzroka. Poremećaji autističnog spektra imaju izrazito heterogenu etiologiju koja obuhvaća genetske faktore, epigenetske modifikacije unutar genoma te utjecaj okoline. Genetski faktori koji predstavljaju najveći dio poznate etiologije (10-20%) mogu biti različiti, međutim niti jedan od njih ne obuhvaća više od 1-2% svih slučajeva ASD-a. Unatoč ekstenzivnim istraživanjima, etiologija RIP-a i ASD-a u velikom broju slučajeva ostaje nepoznata. Smatra se da se genetski faktori nalaze u podlozi velikog broja nedijagnosticiranih slučajeva RIP-a i ASD-a obzirom da do nedavno nisu bile dostupne dovoljno osjetljive tehnike skrininga.

Istraživanje je provedeno na 379 ispitanika podijeljenih u dvije skupine obzirom na uputnu dijagnozu. 355 ispitanika s uputnom dijagnozom RIP i 24 ispitanika s uputnom dijagnozom ASD. Istraživanjem je povedena sveobuhvatna genetska analiza s ciljem utvrđivanja etiološke dijagnoze i identifikacije gena kandidata u podlozi RIP-a i ASD-a. Klasičnom analizom kromosoma GTG prugama (GTG engl. G-bands by Trypsin using Giemsa) kod 5% ispitanika s dijagnozom RIP-a utvrđene su kromosomske aberacije, dok je postotak detektiranih aberacija kod ispitanika s dijagnozom ASD-a iznosio 12,5%. Kod ispitanika s urednim nalazom GTG pruganja provedena je daljnja molekularno citogenetska analiza MLPA (MLPA engl. multiplex ligation dependent probe amplification) i aCGH (aCGH engl. array comparative genomic hybridization) tehnikama. Kombinacijom MLPA setova proba detektirane su submikroskopske kromosomske aberacije u daljnjih 10,3% ispitanika s dijagnozom RIP-a, dok MLPA analiza ispitanika s dijagnozom ASD-a nije pokazala aberantne rezultate. Daljnjom obrada aCGH tehnikom ispitanika s urednim nalazom GTG i MLPA analiza patogene kromosomske aberacije detektirane su kod 7% ispitanika s dijagnozom RIP-a, te u 21% ispitanika s dijagnozom ASD-a. Bioinformatičkom analizom aCGH podataka dobivenih ovim istraživanjem otkriveni su potencijalni geni kandidati u podlozi RIP-a i ASD-a (ARHGAP8, ATRNL1, ATXN10, B3GALT6, C12orf5, CASKIN1, CLASP2, CNKSR2, CNTN6, CNTNAP2, CRHR2, CSMD2, DDR1, DST, EVC, FBLN1, FRG1, FTSJ1, FXN, GPHB5, GPRIN2, HS6ST2, IQSEC3, KIAA0513, KIAA1267,

LANCL2, MACROD2, MAGEA8, MAGI2, NBPF1, NPAS1, NR1D2, NUP50, PDZD2, PLEKHA5, PPP1R14C, PPP1R18, PPP2R5E, PRODH, PTPRT, RTN4R, SNPH, SYP, TFG, TPPP, VARS2, WDR45, WIPF1, WNT7A).

Klasična analiza kromosoma GTG pruganjem u provedenom istraživanju pokazale je niži postotak detekcije aberacija u usporedbi s molekularno citogenetskim tehnikama (MLPA i aCGH). Upotrebom recentnih tehnika otkriven je veći broj submikroskopskih aberacija u podlozi RIP-a i ASD te su utvrđeni novi potencijalni geni kandidati. Provedeno istraživanje ukazuje da molekularno citogenetske tehnike skrininga genoma omogućavaju analizu neurorazvojnih poremećaja od genotipa prema fenotipu, što danas olakšava definiranje novih genetskih sindroma.

## 9. Summary

Neurodevelopmental disorders encompass a large group of clinically heterogeneous, chronic disorder characterized by damage of the developing central nervous system, resulting in impaired progression of one or more developmental domains (physical, cognitive, social and emotional). Intellectual Disability (ID) and Autism spectrum disorders (ASD) are common neurodevelopmental disorders that have in common severely impaired cognitive development in early childhood and adolescence. ID is defined as below-average intellectual functioning with significant limitation in at least two domains of daily living skills. It is estimated that ID affects 1-3% of the general population. By the level of intellectual functioning ID is divided as mild (IQ 50-55), moderate (35-40 / 50-55), severe (20-25 / 35-40), deep (below 20/25), and the ID of indefinite severity. Mild/moderate form of ID occurs 7-10 times more often than the heavier degrees, and it is estimated that comprises 80-85% of all patients with ID. ASD as a diagnostic category encompasses a wide range of disorders of early childhood marked by major deviations in social interaction, social communication/imagination and motor skills that are reflected in stereotypical movements and interests. According to current research, it is estimated that the prevalence of ASD is 62/10000, and occurs four times more often in boys than girls. Etiological diagnosis in patients with ID is identified in 40-60% of cases. However, the etiology of mild ID that occurs 7-10 times more frequently than moderate and severe form is known only in about 24% of cases. Genetic factors are found in 30% of all cases of ID and they represent more than 60% of all known causes. Etiology of ASD is extremely heterogeneous and includes genetic factors, epigenetic modifications of the genome and environmental impact. Genetic factors that represent most of the known etiology (10-20%) can be different, but none of them covers more than 1-2% of all cases of ASD. It is believed that genetic factors underlay the large number of undiagnosed cases of ID and ASD given that until recently sufficiently sensitive screening technique were not available.

The study was conducted on 379 subjects. Considering the referral diagnosis, subjects were divided into two groups: 355 diagnosed with ID and 24 diagnosed with ASD. In this research, comprehensive genetic analysis was conducted to determine the etiological diagnosis and to identify candidate genes underlying ID and ASD. By use of classical chromosome analysis (GTG - G-bands by Trypsin using Giemsa) chromosomal aberrations were identified in 5% of patients diagnosed with ID, while the percentage of detected abnormalities in patients diagnosed with ASD was 12.5%. In patients with normal findings of GTG analysis, further molecular cytogenetic analysis was conducted using MLPA (Multiplex ligation dependent probe amplification) and aCGH (Array comparative genomic hybridization) techniques. Combining different MLPA probe sets, submicroscopic chromosomal aberrations were detected in a further 10.3% of patients diagnosed with ID, while MLPA analysis of patients diagnosed with ASD revealed no aberrant results. Subjects with normal findings of GTG and MLPA analysis were further analyzed by aCGH technology. Pathogenic chromosomal aberrations were detected in 7% of patients diagnosed with ID, and in 21% of patients diagnosed with ASD. Bioinformatic analysis of aCGH data obtained in this study revealed a potential candidate genes underlying ID and ASD (ARHGAP8, ATRNL1, ATXN10, B3GALT6, C12orf5, CASKIN1, CLASP2, CNKSR2, CNTN6, CNTNAP2, CRHR2, CSMD2, DDR1, DST, EVC, FBLN1, FRG1, FTSJ1, FXN, GPHB5, GPRIN2, HS6ST2, IQSEC3, KIAA0513, KIAA1267, LANCL2, MACROD2, MAGEA8, MAGI2, NBPFF1, NPAS1, NR1D2, NUP50, PDZD2, PLEKHA5, PPP1R14C, PPP1R18, PPP2R5E, PRODH, PTPRT, RTN4R, SNPH, SYP, TFG, TPPP, VARS2, WDR45, WIPF1, WNT7A). Classical chromosome analysis by GTG banding showed a lower percentage of aberrations detected compared with molecular cytogenetic techniques (MLPA and aCGH).

In this study combination of classical and molecular cytogenetic techniques revealed a greater number of submicroscopic aberrations underlying ID and ASD. Also some new potential candidate

genes underlying ID and ASD were identified. Conducted research indicates that molecular cytogenetic techniques allow screening of the genome in neurodevelopmental disorders from genotype to phenotype, which facilitates defining new genetic syndromes.

## 10. Popis literature

1. Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, i sur. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature*. 2010;464(7289):768-772.
2. Ku CS, Wu M, Cooper DN, i sur. Exome versus transcriptome sequencing in identifying coding region variants. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012;12(3):241-251.
3. Mochida GH, Walsh CA. Genetic basis of developmental malformations of the cerebral cortex. *Arch Neurol* 2004;61(5):637-40.
4. LeBlanc JJ, Fagiolini M. Autism: A "Critical Period" Disorder? *Neural Plasticity* 2011;vol. 2011, Article ID 921680.
5. Engle EC. Human Genetic Disorders of Axon Guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001784.
6. Američka Psihijatrijska Udruga. DSM-IV dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje. Zagreb: Naklada slap,1998.
7. Svjetske zdravstvene organizacije. Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih zdravstvenih problema. 2. izd. Zagreb, Medicinska naklada; 2012.
8. Moeschler JB, Shevell M, American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006;117(6):2304-16.
9. Kaufman L, Ayub M, Vincent J.B. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord*. 2010;2(4):182-209.
10. Vig S, Jedrysek E. Autistic features in young children with significant cognitive impairment: autism or mental retardation? *J Autism Dev Disord*. 1999;29(3):235-248.
11. Moeschler JB. Genetic evaluation of intellectual disabilities. *Seminar Pediatr Neurol*. 2008;15:2-9.
12. Roeleveld N, Zielhuis G. A. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol*. 1997;39:125-132.
13. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(3):117-134.
14. Bunday S, Thake A, Todd J. The recurrence risks for mild idiopathic mental retardation. *J Med Genet*. 1989; 26(4):260-266.
15. Chiurazzi P, Oostra BA. Genetics of mental retardation. *Curr Opin Pediatr*. 2000;12(6):529-35.
16. Wing L. The continuum of autistic characteristics. U: Schopler E, Mesibov GB, ur. *Diagnosis and assessment in autism*. New York:Plenum;1988,str.9-108.
17. Young RL, Rodi ML. Redefining Autism Spectrum Disorder Using DSM-5: The Implications of the Proposed DSM-5 Criteria for Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2014;44(4):758-765.
18. Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, i sur. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2010;125(4):e727-735.
19. Fombonne E. The epidemiology of autism: a review. *Psychol Med*. 1999;29(4):769-786.
20. Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, i sur. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*. 2012;5(3):160-179.
21. Baird G, Charman T, Baron-Cohen S, i sur. A screening instrument for autism at 18 months of age: a 6-year follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000;39(6):694-702.
22. Wing L, Gould J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J Autism Dev Disord*. 1979;9(1):11-29.

23. Gillberg C. Infantile autism and other childhood psychoses in a Swedish urban region. Epidemiological aspects. *J Child Psychol Psychiatry*. 1984;25(1):35-43.
24. Charman T. What does the term 'working diagnosis' mean? *J Autism Dev Disord* 2005;35:539-540.
25. Committee on Children With Disabilities. American Academy of Pediatrics: The pediatrician's role in the diagnosis and management of autistic spectrum disorder in children. *Pediatrics*. 2001;107(5):1221-1226.
26. Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009;374:1627-1638.
27. Shaffer LG, American College of Medical Genetics Professional Practice and Guidelines Committee. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med*. 2005;7(9):650-654.
28. van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(1):6-25.
29. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, i sur. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006;140(19):2063-74.
30. Schaefer GB, Mendelsohn NJ. Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genet Med*. 2008;10(1):4-12.
31. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, i sur. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*. 1995;25(1):63-77.
32. Le Couteur A, Bailey A, Goode S, i sur. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. *J Child Psychol Psychiatry*. 1996;37(7):785-801.
33. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, i sur. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 2008;82(2):477-488.
34. Ledbetter DH. Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet*. Sep 1992; 51(3): 451-456.
35. Ning Y, Roschke A, Smith ACM, A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet*. 1996;14(1):86-89.
36. Ballif B C, Kashork C D, Shaffer L G. The Promise and Pitfalls of Telomere Region-Specific Probes. *Am J Hum Genet*. 2000; 67(5):1356-1359.
37. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, i sur. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996;273:494-497.
38. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet*. 1996;12:368-375.
39. Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U. FISH banding methods: applications in research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002;2(3):217-225.
40. Cheung VG, Nowak N, Jang W, Kirsch IR, Zhao S, Chen XN, i sur. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature*. 2001;409:953-958.
41. Dallapiccola B, Mingarelli R, Novelli G. The link between cytogenetics and mendelism. *Biomed Pharmacother*. 1995;49(2):83-93.
42. Bassani S, Zapata J, Gerosa L, Moretto E, Murru L, Passafaro M. The neurobiology of X-linked intellectual disability. *Neuroscientist*. 2013;19(5):541-552.
43. <http://www.ensembl.org/biomart/martview>
44. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999;23(2):185-188.

45. Ramocki M B, Tavyev Y J, Peters S P. The MECP2 Duplication Syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(5):1079–1088.
46. Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*. 2005;6(1):46-57.
47. <http://www.brain-map.org/>
48. Kroon T, Sierksma MC, Meredith RM. Investigating mechanisms underlying neurodevelopmental phenotypes of autistic and intellectual disability disorders: a perspective. *Front Syst Neurosci*. 2013;7:75.
49. <http://igc.otago.ac.nz/home.html>
50. Schanen NC. Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 2:R138-50.
51. Grafodatskaya D, Chung B, Szatmari P, Weksberg R. Autism spectrum disorders and epigenetics. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010;49(8):794-809.
52. Wong CC, Meaburn EL, Ronald A, i sur. Methyloomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol Psychiatry*. 2014;19(4):495-503.
53. Schouten PJ, McElgunn JC, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(12): e57.
54. Nygren OH, Ameziane N, Duarte MBH, Vijzelaar NCP, Waisfisz Q, Hess JC, i sur. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):e128.
55. Rooms L, Reyniers E, van Lwijk R, i sur. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat*. 2004;23(1):17-21.
56. Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlström J. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the MECP2 gene of Swedish Rett syndrome patients. *Genet Test*. 2003;7(4):329-332.
57. Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, i sur. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet*. 2006;69(1):58-64.
58. <http://www.mlpa.com/>
59. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, i sur. Matrix-based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances. *Genes Chromosom. Cancer*. 1997;20:399–407.
60. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, i sur. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207-211.
61. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, i sur. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-1351.
62. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, i sur. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
63. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, i sur. 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(2):180-186.
64. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res*. 2011;135(3-4):174-202.



65. Kashevarova AA, Nazarenko LP, Skryabin NA, i sur. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. *Gene*. 2014 Feb 15;536(1):145-50.
66. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22(3):229-237.
67. Nicholl J, Waters W, Mulley JC, i sur. Cognitive deficit and autism spectrum disorders: prospective diagnosis by array CGH. *Pathology*. 2014;46(1):41-45.
68. Anney R, Klei L, Pinto D, i sur. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*. 2010;19(20):4072-4082.
69. van de Lagemaat LN, Grant SG. Genome variation and complexity in the autism spectrum. *Neuron*. 2010;67(1):8-10.
70. Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, i sur. Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet*. 2005;76(5):750-762.
71. Saillour Y1, Cossée M, Leturcq F, i sur. Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method. *Hum Mutat*. 2008;29(9):1083-1090.
72. Shao L, Shaw CA, Lu XY, i sur. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(17):2242-2251.
73. Boone PM, Bacino CA, Shaw CA, i sur. Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH. *Hum Mutat*. 2010;31(12):1326-1342. Celestino-Soper PB, Shaw CA, Sanders SJ, i sur. Use of array CGH to detect exonic copy number variants throughout the genome in autism families detects a novel deletion in TMLHE. *Hum Mol Genet*. 2011;20(22):4360-4370.
74. Shaffer LG, Theisen A, Bejjani BA, i sur. The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genet Med*. 2007;9(9):607-616.
75. Shaffer LG, Bejjani BA. Development of new postnatal diagnostic methods for chromosome disorders. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16(2):114-118.
76. Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, i sur. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(5):346-58.
77. Symons FJ, Sperry LA, Dropik PL, Bodfish JW. The early development of stereotypy and self-injury: a review of research methods. *J Intellect Disabil Res*. 2005;49(Pt 2):144-158.
78. Raymond F.L. Monogenic Causes of Mental Retardation. U: *Genetics of Mental Retardation*. Knight SJL ur. Basel: Karger; 2010, str. 89–100.
79. Moeschler JB, Shevell M, Committee on Genetics. *Comprehensive Evaluation of the Child With Intellectual Disability or Global Developmental Delays*. *Pediatrics*. 2014;134(3):e903 -e918.
80. Giorda R1, Bonaglia MC, Beri S, i sur. Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(X)(p11.22-p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. *Am J Hum Genet*. 2009;85(3):394-400.
81. von der Lippe C, Rustad C, Heimdal K, Rødningen OK. 15q11.2 microdeletion - seven new patients with delayed development and/or behavioural problems. *Eur J Med Genet*. 2011;54(3):357-360.
82. Thienpont B, Béna F, Breckpot J, i sur. Duplications of the critical Rubinstein-Taybi deletion region on chromosome 16p13.3 cause a novel recognisable syndrome. *J Med Genet*. 2010;47(3):155-161.
83. Schinzel A. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man*. 2. izd., Berelin; New York; de Gruyter, 2001.

84. van Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M, i sur. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet.* 2010;42(3):234-239.
85. Ali G, Lee K, Andrade PB, i sur. Novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB90 maps to 7p22.1-p15.3. *Hum Hered.* 2011;71(2):106-112.
86. Fanizza I, Bertuzzo S, Beri S, i sur. Genotype-phenotype relationship in a child with 2.3 Mb de novo interstitial 12p13.33-p13.32 deletion. *Eur J Med Genet.* 2014;57(7):334-338.
87. Koolen DA, Kramer JM, Neveling K, i sur. Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(6):639-641.
88. Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, i sur. A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet.* 2008;82(1):160-164.
89. Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, i sur. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell.* 2011;147(1):235-246.
90. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003;117C(1):3-14.
91. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:161-87.
92. Stevenson RE, Procopio-Allen AM, Schroer RJ, Collins JS. Genetic syndromes among individuals with mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2003;123A(1):29-32.
93. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003;117C(1):15-24.
94. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, i sur. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-764.
95. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, i sur. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet.* 1997;72(4):468-77.
96. Ritvo ER, Jorde LB, Mason-Brothers A, i sur. The UCLA-University of Utah epidemiologic survey of autism: recurrence risk estimates and genetic counseling. *Am J Psychiatry.* 1989;146(8):1032-6.
97. Wassink TH, Piven J, Patil SR. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatr Genet.* 2001;11(2):57-63.
98. Weidmer-Mikhail E, Sheldon S, Ghaziuddin M. Chromosomes in autism and related pervasive developmental disorders: a cytogenetic study. *J Intellect Disabil Res.* 1998;42 ( Pt 1):8-12.
99. Li SY, Chen YC, Lai TJ, Hsu CY, Wang YC. Molecular and cytogenetic analyses of autism in Taiwan. *Hum Genet.* 1993;92(5):441-5.
100. Lauritsen M, Mors O, Mortensen PB, Ewald H. Infantile autism and associated autosomal chromosome abnormalities: a register-based study and a literature survey. *J Child Psychol Psychiatry.* 1999 Mar;40(3):335-45.
101. Konstantareas MM, Homatidis S. Chromosomal abnormalities in a series of children with autistic disorder. *J Autism Dev Disord.* 1999;29(4):275-285.
102. Gillberg C, Wahlström J. Chromosome abnormalities in infantile autism and other childhood psychoses: a population study of 66 cases. *Dev Med Child Neurol.* 1985;27(3):293-304.
103. Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E, Waltes R. Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010;19(3):169-178.
104. Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, i sur. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry.* 2009;66(4):349-59.
105. Freitag CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry.* 2007;12(1):2-22.

106. Vorstman JA, Morcus ME, Duijff SN, i sur. The 22q11.2 deletion in children: high rate of autistic disorders and early onset of psychotic symptoms. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2006;45(9):1104-1113.
107. Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol Cytogenet*. 2013;6(1):7.
108. Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, i sur. 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(4):e425-432.
109. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, i sur. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*. 2004;41(12):892-899.
110. Boggula VR, Shukla A, Danda S, i sur. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. *Indian J Med Res*. 2014;139(1):66-75.
111. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, i sur. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet*. 2006;43(6):478-89.
112. Northrop EL, Ren H, Bruno DL, i sur. Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Hum Mutat*. 2005;26(5):477-486.
113. Ahn JW, Mann K, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Submicroscopic chromosome imbalance in patients with developmental delay and/or dysmorphism referred specifically for Fragile X testing and karyotype analysis. *Mol Cytogenet*. 2008;1:2.
114. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet*. 2007;50(1):33-42.
115. Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, i sur. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med*. 2007;9(2):117-122.
116. Utine GE, Kiper PO, Alanay Y, i sur. Searching for Copy Number Changes in Nonsyndromic X-Linked Intellectual Disability. *Mol Syndromol*. 2012;2(2):64-71.
117. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, i sur. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*. 2008;40(3):322-328.
118. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, i sur. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet*. 2009;41(2):160-162.
119. International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*. 2008;455(7210):237-241.
120. Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, i sur. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nat Genet*. 2007;39(9):1071-1073.
121. Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet*. 1995;9(2):132-140. Treba biti 37
122. Ciurea AV, Toader C. Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life*. 2009;2(1):5-17.
123. Hajihosseini MK. Fibroblast growth factor signaling in cranial suture development and pathogenesis. *Front Oral Biol*. 2008;12:160-177.

124. Agochukwu NB, Solomon BD, Muenke M. Impact of genetics on the diagnosis and clinical management of syndromic craniosynostoses. *Childs Nerv Syst.* 2012;28(9):1447-1463.
125. Bittel DC, Kibiryeveva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test.* 2007;11(4):467-475.
126. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Krämer N, Janssen B, Zschocke J. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes.* 2007;21(3):208-215.
127. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem.* 2006;52(7):1276-1283.
128. Bird LM. Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *Appl Clin Genet.* 2014;7:93-104.
129. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet.* 2003;40(2):87-95.
130. Zogel C, Böhringer S, Gross S, Varon R, Buiting K, Horsthemke B. Identification of cis- and trans-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(6):752-758.
131. Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet.* 1995;57(5):1006-1018.
132. Gatta V, Gennaro E, Franchi S, i sur. MS-MLPA analysis for FMR1 gene: evaluation in a routine diagnostic setting. *BMC Med Genet.* 2013;14:79.
133. Schanen C, Houwink EJ, Dorrani N, i sur. Phenotypic manifestations of MECP2 mutations in classical and atypical Rett syndrome. *Am J Med Genet A.* 2004;126A(2):129-140.
134. Hammer S, Dorrani N, Hartiala J, Stein S, Schanen NC. Rett syndrome in a 47,XXX patient with a de novo MECP2 mutation. *Am J Med Genet A.* 2003;122A(3):223-226.
135. Smeets E1, Schollen E, Moog U, i sur. Rett syndrome in adolescent and adult females: clinical and molecular genetic findings. *Am J Med Genet A.* 2003;122A(3):227-233.
136. Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mutat.* 2005;25(3):324.
137. Bebbington A, Downs J, Percy A, i sur. The phenotype associated with a large deletion on MECP2. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(9):921-927.
138. Scala E, Longo I, Ottimo F, i sur. MECP2 deletions and genotype-phenotype correlation in Rett syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(23):2775-2784.
139. Cai G, Edelmann L, Goldsmith JE, i sur. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Med Genomics.* 2008;1:50.
140. Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, i sur. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet.* 2007;8:9.
141. Hoppman-Chaney NL, Dawson DB, Nguyen L, i sur. Partial hexasomy for the Prader-Willi-Angelman syndrome critical region due to a maternally inherited large supernumerary marker chromosome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(8):2034-2038.
142. van Opstal D, Boter M, Noomen P, Srebniak M, Hamers G, Galjaard RJ. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for rapid distinction between unique sequence positive and negative marker chromosomes in prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet.* 2011;4:2.

143. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Vestergaard Larsen G, Kjaergaard S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis-experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* 2008;28(12):1119-1125.
144. Wang J, Liu Z, Liu H, i sur. Rapid detection of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements by subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification in fetuses with congenital heart disease. *Fetal Diagn Ther.* 2013;34(2):110-115.
145. Havlovicova M, Novotna D, Kocarek E, i sur. A girl with neurofibromatosis type 1, atypical autism and mosaic ring chromosome 17. *Am J Med Genet A.* 2007;143(1):76-81.
146. Chen CP, Ko TM, Chen YY, Su JW, Wang W. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of mosaicism for a small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 22 associated with cat eye syndrome. *Gene.* 2013;527(1):384-388.
147. Gervasini C, Parenti I, Picinelli C, i sur. Molecular characterization of a mosaic NIPBL deletion in a Cornelia de Lange patient with severe phenotype. *Eur J Med Genet.* 2013;56(3):138-143.
148. Anderlid BM, Lundin J, Malmgren H, Lehtihet M, Nordgren A. Small mosaic deletion encompassing the snoRNAs and SNURF-SNRPN results in an atypical Prader-Willi syndrome phenotype. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(2):425-431.
149. Mur P, Pineda M, Romero A, i sur. Identification of a founder EPCAM deletion in Spanish Lynch syndrome families. *Clin Genet.* 2014;85(3):260-266.
150. Evans DG, Ramsden RT, Shenton A, i sur. Mosaicism in neurofibromatosis type 2: an update of risk based on uni/bilaterality of vestibular schwannoma at presentation and sensitive mutation analysis including multiple ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2007;44(7):424-428.
151. Callum P, Messiaen LM, Bower PV, i sur. Gonosomal mosaicism for an NF1 deletion in a sperm donor: evidence of the need for coordinated, long-term communication of health information among relevant parties. *Hum Reprod.* 2012;27(4):1223-1226.
152. van Veghel-Plandsoen MM, Wouters CH, Kromosoeto JN, den Ridder-Klünnen MC, Halley DJ, van den Ouweland AM. Multiplex ligation-dependening probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(9):1009-1012.
153. Herman S, Varga D, Deissler HL, Kreienberg R, Deissler H. Medium-sized deletion in the BRCA1 gene: Limitations of Sanger sequencing and MLPA analyses. *Genet Mol Biol.* 2012;35(1):53-56.
154. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, i sur. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013;17(6):589-599.
155. Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med.* 2013;15(5):399-407.
156. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D986-992.
157. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, i sur. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009;84(4):524-533.
158. Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, i sur. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009;30(3):283-292.
159. Pfundt R, Veltman JA. Structural genomic variation in intellectual disability. *Methods Mol Biol.* 2012;838:77-95.

160. Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, i sur. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(2):161-165.
161. Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, i sur. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(2):377-385.

## 11. Životopis

Rođena sam u Virovitici 13.05.1984. godine kao drugo dijete u obitelji Alojza i Zlate Merkaš. Srednju i osnovnu školu pohađala sam u Slatini. 2002. godine upisujem Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer Ekologija. Studiji završavam 2007. godine i stječem titulu diplomiranog inženjera biologije. Od 2008. godine zaposlena sam kao znanstveni novak na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na projektu „Molekularna citogenetika u evaluaciji mentalne retardacije nepoznate etiologije“. Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisujem 2009. godine. Dobitnica sam stipendije Nacionalne zaklade za znanost, Stipendija za izobrazbu doktoranad, te tijekom 2009. i 2010. godine 11 mjeseci boravim u Institutu za humanu genetiku, Friedrich-Schiller Sveučilišta u Jeni (voditelj PD Dr. rer. nat. / med. habil. Thomas Liehr). Od 2014. godine član sam odbora za Kliničku laboratorijsku genetiku u sklopu Europskog odbora za medicinsku genetiku. Koautor sam 7 znanstvenih radova.

Popis radova:

1. Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, Manvelyan M, Simonyan I, Mkrтчyan H, Aroutiounian R, Polityko AD, Kulpanovich AI, Egorova T, Jaroshevich E, Frolova A, Shorokh N, Naumchik IV, Volleth M, Schreyer I, Nelle H, Stumm M, Wegner RD, Reising-Ackermann G, Merkas M, Brecevic L, Martin T, Rodríguez L, Bhatt S, Ziegler M, Kreskowski K, Weise A, Sazci A, Vorsanova S, Cioffi Mde B, Ergul E. Heteromorphic variants of chromosome 9. *Mol Cytogenet.* 2013, 1;6(1):14.
2. Klobučar GI, Stambuk A, Srut M, Husnjak I, Merkaš M, Traven L, Cvetković Z. *Aporrectodea caliginosa*, a suitable earthworm species for field based genotoxicity assessment? *Environ Pollut.* 2011, 159(4):841-9.
3. Liehr T, Bartels I, Zoll B, Ewers E, Mrasek K, Kosyakova N, Merkas M, Hamid AB, von Eggeling F, Posorski N, Weise A. Is there a yet unreported unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences in proximal 4p? *Cytogenet Genome Res* 2011, 132:121-123.
4. Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, Thomaidis L, Aperis G, Sotiriou S, Kitsos G, Merkas M, Sifakis S, Papoulidis I, Liehr T, Zuffardi O, Petersen M. B. Deletion 2q31.2-q31.3 in a 4-year-old girl with microcephaly and severe mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 2011, 155:1476–1482.
5. Nelle H, Schreyer I, Ewers E, Mrasek K, Kosyakova N, Merkas M, Hamid AB, Weise A, Liehr T. Harmless familial small supernumerary marker chromosome 22 hampers diagnosis of fragile X syndrome. *Molecular Medicine Reports* 2010, 3:571-574. Niksic SB, Deretic VI, Pilic GR, Ewers E, Merkas M, Ziegler M, Liehr T. Trisomy 21 with a small supernumerary marker chromosome derived from chromosomes 13/21 and 18. *Balk J Med Genet* 2010, 13:55-58.
6. Liehr T, Karamysheva T, Merkas M, Brecevic L, Hamid AB, Ewers E, Mrasek K, Kosyakova N, Weise A. Somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes. *Curr Genomics* 2010, 11:432-439
7. Niksic SB, Deretic VI, Pilic GR, Ewers E, Merkas M, Ziegler M, Liehr T. Trisomy 21 with a small supernumerary marker chromosome derived from chromosomes 13/21 and 18. *Balk J Med Genet* 2010, 13:55-58.

**Prilog 1. SALSA MLPA P036 Human Telomere-3 probemix**

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene)			
118 *	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (ZFY gene)			
130 ±	1p	TNFRSF4	02269-L01761	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3p	CHL1	01721-L01329	03-000.34
151	4p	PIGG (FLJ20265)	02005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6p	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC8A (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208 ±	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 ±	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24 (Acrocentric chromosome)
227 +	14q-cen	CCNB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.86 (Acrocentric chromosome)
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36 (Acrocentric chromosome)
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265 ±	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
283 ±	21q-cen	RBM11	18223-L23852	21-014.51 (Acrocentric chromosome)
289 +	22q-cen	BID	01740-L01310	22-016.61 (Acrocentric chromosome)
298	Xp/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52 (PAR1 region)
307	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	02392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH1	02013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	01746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
355	7q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
361	8q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
379	10q	PAOX (PAO)	09142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
411 ±	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418 ±	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
441	18q	RBFA (C18orf22)	01758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450 ±	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458 ±	20q	OPRL1	02688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telom.)

**Prilog 2. SALSA MLPA P070 Human Telomere-5 probemix**

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation (autosomal)			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene ; X-111.95)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene ; Y-013.98)			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (DDX3Y gene ; Y-013.54)			
132	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	04084-L03605	01-247.08
139	2q	ATG4B (=APG4B)	02781-L03168	02-242.25
145	3q	KIAA0226	02690-L02842	03-198.88
152	4q	FRG1	02691-L02843	04-191.10
160	5q	GNB2L1	02790-L02232	05-180.60
166	6q	TBP	02694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	02793-L03167	07-158.63
179 ±	8q	RECQL4	02695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	02792-L02846	09-139.78
193 ±	10q	ECHS1	02696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B (=KIAA1030)	02697-L02848	11-133.29
211	12q	ZNF10	02686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	02698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	02699-L02850	14-104.99
233	15q	TM2D3 (=FLJ22604)	02701-L02851	15-100.01
241	16q	GAS8 (=GAS11)	02702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	02703-L03169	17-077.87
258	18q	CTDP1	02704-L03607	18-075.58
265 ±	19p	CHMP2A (=BC-2)	02705-L02853	19-063.76
274	20q	UCKL1 (=FLJ20517)	02706-L00642	20-062.05
281	21q	S100B	02587-L02854	21-046.85
290	22q	ARSA	02707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7 (=SYBL1)	02708-L02855	X-154.82 + Y-057.68 (PAR region)
306 ±	1p	TNFRSF18	02270-L01762	01-001.13
315	2p	ACP1	02709-L02856	02-000.27
323	3p	CHL1	02896-L02363	03-000.34
329	4p	PIGG	14440-L16146	04-000.51
337	5p	CCDC127 (=LOC133957)	02791-L02233	05-000.26
346	6p	IRF4	04077-L03462	06-000.34
355*	7p	SUN1 (UNC84A)	02780-L02857	07-000.84
362	8p	FBXO25	02715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8 (=FLJ00026)	02716-L00688	09-000.38
379	10p	ZMYND11 (=B569)	05180-L16343	10-000.22
387	11p	BET1L	02784-L02226	11-000.20
393 *	12p	KDM5A (JARID1A (=RBBP2))	02787-L02229	12-000.29
402 ±	"13p"	PSPC1	02717-L03608	13-019.25 (Acrocentric)
409 +	"14p"	PARP2 (=ADPRTL2)	02718-L00732	14-019.90 (Acrocentric)
418 ±	"15p"	NDN	04026-L01542	15-021.48 (Acrocentric)
427 ±	16p	DECR2	02720-L00648	16-000.40
436	17p	RPH3AL	04081-L03465	17-000.18
444	18p	THOC1	02789-L02231	18-000.20
450	19p	PPAP2C	03501-L02880	19-000.23
459	20p	ZCCHC3 (=FLJ22115)	02723-L00641	20-000.23
466 +	"21p"	HSPA13 (=STCH)	02724-L00334	21-014.68 (Acrocentric)
479 +	"22p"	IL17RA	02725-L16344	22-015.96 (Acrocentric)
484	X/Yp (PAR1)	SHOX	03714-L16345	X/Y-000.52 (PAR region)



**Prilog 3. SALSA MLPA P245-A1 Microdeletion Syndromes-1 probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	TNFRSF4 Probe 02269-L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 Probe 07632-L07317	10p15.1	DiGeorge region 2 (10p)
142	PAFAH1B1 Probe 04120-L03532	17p13.3	Miller-Dieker region
148	MECP2 Probe 09310-L09999	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
153	NSD1 Probe 02595-L08077	5q35.3	Sotos syndrome
160	UBE3A Probe 04620-L00863	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
166	GABRD Probe 04690-L07966	1p36.33	1p36 deletion syndrome
172 ∞	CREBBP Probe 03087-L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi syndrome
178	GNB1 Probe 02890-L07968	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184	MECP2 Probe 09311-L10002	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
190 *	SEMA7A Probe 08380-L10003	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
196	CLDN5 Probe 01218-L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202	MECP2 Probe 03409-L02797	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
208	GP1BB Probe 05464-L10114	22q11.21	DiGeorge syndrome
214	NDN Probe 06282-L01542	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
220	PAX6 Probe 03253-L02690	11p13	WAGR syndrome
226	MAPT Probe 07856-L08385	17q21.31	"17q21 microdeletion"
232	LETM1 Probe 04190-L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
238	PAFAH1B1 Probe 01443-L08394	17p13.3	Miller-Dieker region
246	SNRPN Probe 02026-L10004	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
254 †	SHANK3 Probe 10181-L11409	22q13.33	22q13 / Phelan-McDermid
260	NF1 Probe 03778-L11180	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
267	FANCL Probe 08386-L11411	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"
274	LRRC48 Probe 01452-L00936	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283 ±	CRR9 Probe 01126-L00684	5p15.3	Cri du Chat syndrome
292	SNRPN Probe 01318-L07970	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
297 †	DMD Probe 01412-L01059	Xp21.2	Chromosome X control probe
304	LLGL1 Probe 01453-L08499	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
310	ELN Probe 01333-L00876	7q11.23	Williams syndrome
319	TGFBF1 Probe 04652-L04036	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
326	CYP1A1 Probe 06811-L06406	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
335	NF1 Probe 02508-L02620	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
341	MAPT Probe 07857-L08501	17q21.31	"17q21 microdeletion"
349	Hs.538604 Probe 01232-L07388	10p15.1	DiGeorge region 2 (10p)
355	DLG1 Probe 08395-L08249	3q29	"3q29 deletion syndrome"
364	ELN Probe 01336-L00878	7q11.23	Williams syndrome
373	SNAP29 Probe 01235-L00773	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 †	SHANK3 Probe 10182-L11174	22q13.33	22q13 / Phelan-McDermid
391	LIMK1 Probe 01337-L02333	7q11.23	Williams syndrome
401	TRPS1 Probe 03081-L07411	8q24.12	Langer-Giedion syndrome
409	TGFBF1 Probe 04653-L10006	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
418	DLG1 Probe 08401-L08255	3q29	"3q29 deletion syndrome"
427 †	EIF353 Probe 01108-L00679	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
437	TERT Probe 03761-L02477	5p15.33	Cri du Chat syndrome
445	WHSC1 Probe 06058-L05513	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
454	NSD1 Probe 02600-L02071	5q35.3	Sotos syndrome
466 †	RAI1 Probe 09440-L11412	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
474	CRHR1 Probe 07859-L07620	17q21.31	"17q21 microdeletion"
484 †	REL Probe 09860-L10628	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"

**Prilog 4. SALSA MLPA P245-B1 Microdeletion Syndromes-1 probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118 *	Y-fragment S0135-L16766: Specific for the Y chromosome		
130 ±	TNFRSF4 probe 02269-L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 probe 07632-L07317	10p14	DiGeorge region 2 (10p)
142	PAFAH1B1 probe 04120-L03532	17p13.3	Miller-Dieker syndrome
148	MECP2 probe 09310-L13824	Xq28	RETT syndrome / Xq28 duplication
154 ¥	NSD1 probe 02595-L23366	5q35.3	Sotos syndrome
160 ± ¥	GABRD probe 04690-L04068	1p36.33	1p36 deletion syndrome
166 *	UBE3A probe 10877-L11547	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
172 ±	CREBBP probe 03087-L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi gene
178 ¥	GNB1 probe 02890-L02511	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184 *	MECP2 probe 15319-L17592	Xq28	RETT syndrome, Xq28 duplication
190 *	SEMA7A probe 18316-L23369	15q24	15q24 microdeletion syndrome
196	CLDN5 probe 01218-L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202 ± ¥	MECP2 probe 03409-L16570	Xq28	RETT syndrome, Xq28 duplication
208 ± ¥	GP1BB probe 05464-L15184	22q11.21	DiGeorge syndrome
214 *	MBD5 probe 15311-L17110	2q23.1	2q23.1 microdeletion syndrome
220 *	PPIL2 probe 07530-L22697	22q11.21	Distal 22q11 syndrome
226 *	REL probe 17474-L23693	2p16.1	2p16.1 microdeletion syndrome
232 ±	LETM1 probe 04190-L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn syndrome
238	PAFAH1B1 probe 16348-L22830	17p13.3	Miller-Dieker syndrome / Lissencephaly
244 *	SNRPN probe 12178-L13826	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
252 *±	SHANK3 probe 12031-L13828	22q13.33	Phelan-McDermid syndrome
260 *	NF1 probe 11732-L13830	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
265 *±	RTDR1 probe 08484-L22698	22q11.22	Distal 22q11 syndrome
272 *	MAPT probe 08365-L22699	17q21.31	17q21 microdeletion syndrome
278 ¥	LRRC48 probe 01452-L20745	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283 *	SEMA5A probe 14265-L22700	5p15.31	Cri du Chat syndrome
292 *	DMD probe 01411-L23371	Xp21.1	X chromosome copy number
300 ¥	SNRPN probe 01318-L23196	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
307 ± ¥	LLGL1 probe 01453-L22689	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
315 *	ELN probe 16349-L22813	7q11.23	Williams-Beuren syndrome
323 *	PTCH1 probe 03702-L22814	9q22.32	9q22.3 microdeletion syndrome
331 ¥	CYP1A1 probe 06811-L22815	15q24.1	15q24 microdeletion syndrome
339 *	NF1 probe 02507-L22694	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
346 *	KANSL1 probe 18172-L22729	17q21.31	17q21.31 microdeletion syndrome
355	DLG1 probe 08395-L08249	3q29	3q29 microdeletion syndrome
364	ELN probe 01336-L00878	7q11.23	Williams-Beuren syndrome
373 *	SNAP29 probe 16748-L19368	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 *	RABL2B probe 06734-L05558	22q13.33	Phelan-McDermid syndrome
391 *	SATB2 probe 15315-L17114	2q33.1	2q33.1 microdeletion syndrome
401 ±	TRPS1 probe 03081-L07411	8q23.3	Langer-Giedion syndrome
411 *	MBD5 probe 15313-L22691	2q23.1	2q23.1 microdeletion syndrome
422 ± ¥	DLG1 probe 08401-L15187	3q29	3q29 microdeletion syndrome
429 *	EXT1 probe 15322-L17698	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
436 *	FANCC probe 04460-L22816	9q22.32	9q22.3 microdeletion syndrome
445 ¥	TERT probe 03761-L22817	5p15.33	Cri du Chat syndrome
454 *	WHSC1 probe 10633-L14379	4p16.3	Wolf-Hirschhorn syndrome
462 ¥	NSD1 probe 02600-L15191	5q35.3	Sotos syndrome
471 *	RAI1 probe 11730-L15192	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
485 *±	SATB2 probe 15318-L19750	2q33.1	2q33.1 microdeletion syndrome
499 *	PEX13 probe 09870-L15194	2p16.1	2p16.1 microdeletion syndrome

**Prilog 5. SALSA MLPA P297 Microdeletion Syndromes-2 probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Mapview position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
115	MTMR15 probe 50357-L13235	15q13.2	15-029.021220
120	MTMR15 probe 50356-L13236	15q13.2	15-029.016616
130	PDE4DIP probe 05712-L05712	1q21.1 (TAR)	01-143.657975
136	DLG1 probe 08374-L08228	3q29	03-198.509748
142	CD160 probe 08373-L08227	1q21.1 (TAR)	01-144.415431
148	AATF probe 08372-L08226	17q12	17-032.463021
154	C12orf11 probe 12941-L14450	12p11.23	12-026.972402
160	HNF1B probe 07699-L12885	17q12	17-033.173652
166	KLF13 probe 08376-L08230	15q13.3	15-029.452013
172	PPF1BP1 probe 12943-L14461	12p11.23	12-027.723735
178	HIRIP3 probe 11667-L14462	16p11.2	16-029.913975
184	PAK2 probe 08378-L08232	3q29	03-197.951598
189	PAK7 probe 12942-L14463	20p12.2	20-009.467904
196	IL21R probe 03333-L02720	16p12.2	16-027.356385
202	HNF1B probe 08969-L09065	17q12	17-033.120714
208	AATF probe 08381-L12887	17q12	17-032.419962
214	TCF4 probe 12506-L14451	18q21.2	18-051.406716
220	FM05 probe 12944-L14099	1q21.1	01-145.125385
226	DOC2A probe 13162-L12447	16p11.2	16-029.928004
238	HNF1B probe 07700-L07459	17q12	17-033.167835
244	MAZ probe 11669-L12980	16p11.2	16-029.728356
250	BCL9 probe 12945-L14100	1q21.1	01-145.562802
256	GJA5 probe 12946-L14101	1q21.1	01-145.697412
262	CNTNAP2 probe 12947-L14102	7q36.1	07-146.371999
274	HFE2 probe 08387-L08241	1q21.1 (TAR)	01-144.127825
283	GJA8 probe 12948-L14103	1q21.1	01-145.847955
289	CHRNA7 probe 12956-L14452	15q13.3	15-030.191319
296	TJP1 probe 08389-L14453	15q13.1	15-027.900944
302	MAPK3 probe 11670-L14454	16p11.2	16-030.040763
310	HNF1B probe 08968-L14455	17q12	17-033.133285
319	PRKAB2 probe 12949-L14104	1q21.1	01-145.097093
328	IL21R probe 03332-L02719	16p12.2	16-027.353180
337	PALB2 probe 07504-L07166	16p12.1	16-023.522408
344	MVP probe 00550-L00372	16p11.2	16-029.752775
355	PALB2 probe 07495-L07157	16p12.1	16-023.554974
364	LHX1 probe 08396-L08250	17q12	17-032.371736
373	TRPM1 probe 08397-L08251	15q13.3	15-029.081415
382	PEX11B probe 08398-L08252	1q21.1 (TAR)	01-144.228676
391	TCF4 probe 12522-L13572	18q21.2	18-051.045386
400	TJP1 probe 08399-L14456	15q13.1	15-027.783738
409	PALB2 probe 07496-L06744	16p12.1	16-023.548922
418	SCG5 probe 12951-L14106	15q13.3	15-030.776133
427	PAK7 probe 12952-L14107	20p12.2	20-009.572812
436	CNTNAP2 probe 12953-L14108	7q36.1	07-147.557712
445	TRPM1 probe 08404-L08258	15q13.3	15-029.149319
454	PEX11B probe 08405-L08259	1q21.1 (TAR)	01-144.229421
463	PML probe 06253-L05759	15q24.1	15-072.077776
472	ACP6 probe 13163-L14105	1q21.1	01-145.608615
481	PML probe 06258-L09341	15q24.1	15-072.125646
492	SCG5 probe 12954-L14464	15q13.3	15-030.759311

**Prilog 6. SALSA MLPA P015 MECP2 probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position			
		reference	MECP2	CDKL5	ARX
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA				
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation				
100	X-fragment: Specific for the X chromosome				
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome				
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome				
130 ±	Reference probe 00797-L21056	5q31			
136 ±	GDI1 probe 16875-L19669		Xq28		
143	CDKL5 probe 06466-L06567			Exon 12	
149 *	NTNG1 probe 18447-L24143				Exon 2
154 *	MECP2 probe 18442-L24243		Exon 4		
161 ±*	ARX probe 18440-L24338				Exon 1
166	Reference probe 08222-L24146	10q26			
172 ±	SLC6A8 probe 01879-L24147		Xq28		
178 ±	IRAK1 probe 10835-L24148		Xq28		
182 ±	MECP2 probe 10836-L23615		Exon 1		
190	CDKL5 probe 06458-L23617			Exon 5	
196	MECP2 probe 10839-L23618		Exon 3		
202 ±	MECP2 probe 03409-L16570		Exon 1		
208	Reference probe 09865-L08705	13q32			
214 ±	MECP2 probe 03770-L13387		Upstream		
221	FVIII probe 06288-L05892		Xq28		
229	MECP2 probe 18441-L12494		Exon 4		
235 ±	ARX probe 06455-L12129			Exon 5	
241	L1CAM probe 07051-L14553		Xq28		
247	Reference probe 06387-L05853	8p23			
254 ±	MECP2 probe 03768-L23833		Exon 2		
260 ±	MECP2 probe 01769-L23834		Exon 4		
266	Reference probe 01306-L23835	5q35			
274	MECP2 probe 01768-L13824		Exon 4		
280	Reference probe 16434-L24149	18q21			
286	CDKL5 probe 06462-L24150			Exon 8	
292 *	MECP2 probe 18444-L24151		Exon 4		
299	Reference probe 16621-L24152	1q32			
305 ±	MECP2 probe 02002-L24153		Exon 1		
312	NTNG1 probe 06487-L24154			Exon 5	
319	DKC1 probe 18761-L24340		Xq28		
338	Reference probe 09776-L24156	15q21			
346 ~	MECP2 probe 01347-L24157		Exon 4		
356	MECP2 probe 10841-L24158		Exon 4		
365	MECP2 probe 01348-L24159		Exon 3		
373 ±	MECP2 probe 01349-L24160		Exon 2		
383	IDH3G probe 01887-L23933		Xq28		
391 *	MECP2 probe 14737-L24161		Exon 3		
400	CDKL5 probe 06465-L05991			Exon 11	
409	Reference probe 17462-L21218	12p13			
418 ±*	MECP2 probe 18446-L23620		Exon 4		
427	NTNG1 probe 06488-L23934			Exon 6	
438	NTNG1 probe 06483-L24162			Exon 3	
448	FLNA probe 04138-L24163		Xq28		
457	VAMP7 probe 01094-L24164		Xq28-PAR2		
467	Reference probe 02674-L24165	11q22			

**Prilog 7. SALSA MLPA P189 CDKL5 probemix**

**Prilog 8. SALSA MLPA P106 MRX probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	reference	Chromosomal position			
			CDKL5	NTNG1	ARX	FOXG1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
130 *	Reference probe 00797-L13645	5q31				
136 ¥ ±	CDKL5 probe 06456-L24567		Exon 1			
143	CDKL5 probe 06466-L06567		Exon 12 (10)			
149 ∞ ±	NTNG1 probe 06478-L06568		Exon 1b			
154 ±	CDKL5 probe 13667-L15127		Exon 1			
161	CDKL5 probe 06457-L06570		Exon 4 (2)			
166	Reference probe 07724-L07434	7p13				
172	CDKL5 probe 06467-L06571		Exon 13 (11)			
178	NTNG1 probe 06484-L06010		Exon 4			
185	CDKL5 probe 06458-L05984		Exon 5 (3)			
191	Reference probe 06057-L06042	4p16				
196 *±Δ	ARX probe 18790-L24442				Exon 2	
202 ±	NTNG1 probe 06479-L06005			Exon 1b		
208	NTNG1 probe 06486-L06572			Exon 5		
215 *	Reference probe 08570-L08571	17q23				
222 ±	ARX probe 02898-L04200				Exon 4	
227 ¥	CDKL5 probe 06459-L23728		Exon 6 (4)			
233 ¥ ±	ARX probe 13669-L23729				Exon 1	
239 ¥	CDKL5 probe 06474-L23730		Exon 20 (18)			
246 ¥	CDKL5 probe 06461-L23731		Exon 7 (5)			
252	CDKL5 probe 06470-L16143		Exon 16 (14)			
257 ±	NTNG1 probe 06480-L21520			Exon 2		
265 ¥ ±	ARX probe 09307-L21229				Exon 5	
269 ¥	NTNG1 probe 06485-L21230			Exon 4		
275 *	Reference probe 12494-L13538	1q32				
282 *	CDKL5 probe 17283-L20732		Intron 18			
288 ¥	CDKL5 probe 06462-L21231		Exon 8 (6)			
295 ¥	CDKL5 probe 06476-L21232		Exon 22 (20)			
302	NTNG1 probe 06487-L06013			Exon 5		
310 ±	NTNG1 probe 06481-L06007			Exon 2		
319	CDKL5 probe 06463-L05989		Exon 9 (7)			
326	CDKL5 probe 06471-L05997		Exon 17 (15)			
333 * ±	FOXG1 probe 16850-L19644				Upstream	
340 ¥	CDKL5 probe 06882-L21233		Exon 14 (12)			
348 *	Reference probe 16441-L18894	18q21				
355 ¥ ±	ARX probe 13670-L21234				Exon 3	
364	NTNG1 probe 06489-L06015			Exon 6		
373	CDKL5 probe 06464-L05990		Exon 10 (8)			
383	CDKL5 probe 06472-L05998		Exon 18 (16)			
391	NTNG1 probe 06482-L06008			Exon 3		
400	CDKL5 probe 06465-L05991		Exon 11 (9)			
409	Reference probe 09497-L09754	11q24				
418	CDKL5 probe 06473-L05999		Exon 19 (17)			
427	NTNG1 probe 06488-L06014			Exon 6		
436	NTNG1 probe 06483-L06009			Exon 3		
445	CDKL5 probe 06469-L05995		Exon 15 (13)			
454	CDKL5 probe 06460-L05986		Exon 6 (4)			
463	CDKL5 probe 06475-L06001		Exon 21 (19)			
472 * ±	FOXG1 probe 17292-L15242				Exon 1	
481 *	CDKL5 probe 17286-L20734		Exon 23 (21)			
490 *	Reference probe 09772-L21655	15q21				
500 *	Reference probe 17001-L22947	20q11				

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
118 *	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
130	<b>AGTR2 probe</b> 13917-L02320	Xq23
136 ¥ ±	<b>GDI1 probe</b> 16875-L19669	Xq28
142	<b>FMR1 probe</b> 02928-L03720	Xq27
148 ±	<b>ACSL4 probe</b> 02935-L02326	Xq23
154 ±	<b>AFF2 probe</b> 03511-L04202	Xq28
160 ±	<b>TSPAN7 probe</b> 02903-L02297	Xp11
166	<b>FMR1 probe</b> 02927-L03721	Xq27
172 ¥	<b>ARHGEF6 probe</b> 16857-L19651	Xq26
178	<b>RPS6KA3 probe</b> 02907-L02301	Xp22
184	<b>HUWE1 probe</b> 13919-L15456	Xp11
190 ~ ±	<b>ACSL4 probe</b> 02155-L15826	Xq23
196 ±	<b>ARX probe</b> 13668-L15819	Xp21
202	<b>ARHGEF6 probe</b> 02902-L04460	Xq26
208 ±	<b>SLC6A8 probe</b> 01871-L15827	Xq28
215	<b>DCX probe</b> 04123-L15828	Xq23
222 ±	<b>ARX probe</b> 02898-L04200	Xp21
229 ±	<b>ARX probe</b> 13669-L15822	Xp21
235 ¥	<b>IL1RAPL1 probe</b> 02922-L23556	Xp21
241	<b>AFF2 probe</b> 03516-L15823	Xq28
248 ¥	<b>ACSL4 probe</b> 03512-L23557	Xq23
256 ¥	<b>HUWE1 probe</b> 13920-L23672	Xp11
263 ¥	<b>AFF2 probe</b> 02933-L23673	Xq28
268 ¥ ~	<b>TSPAN7 probe</b> 02904-L23558	Xp11
275	<b>DCX probe</b> 04124-L03481	Xq23
283	<b>AFF2 probe</b> 00493-L00066	Xq28
292	<b>IL1RAPL1 probe</b> 02920-L02314	Xp21
301 ±	<b>SLC6A8 probe</b> 01876-L01445	Xq28
310	<b>PQBP1 probe</b> 02918-L02878	Xp11
319	<b>DCX probe</b> 04121-L08390	Xq23
328	<b>IL1RAPL1 probe</b> 02921-L02315	Xp21
337	<b>AFF2 probe</b> 02932-L02323	Xq28
346	<b>ARHGEF6 probe</b> 03719-L02293	Xq26
355	<b>AGTR2 probe</b> 02925-L02319	Xq23
364	<b>RPS6KA3 probe</b> 02906-L02300	Xp22
371	<b>OPHN1 probe</b> 02912-L02306	Xq12
378 ¥ ±	<b>GDI1 probe</b> 16874-L23559	Xq28
385	<b>PAK3 probe</b> 02908-L03178	Xq23
391	<b>PQBP1 probe</b> 03520-L02313	Xp11
400	<b>PAK3 probe</b> 03521-L02304	Xq23
409 ¥	<b>OPHN1 probe</b> 02913-L23560	Xq12
418	<b>PAK3 probe</b> 02909-L02303	Xq23
427 ¥	<b>IL1RAPL1 probe</b> 02923-L23561	Xp21
436	<b>OPHN1 probe</b> 02914-L02308	Xq12
443 ¥	<b>ARHGEF6 probe</b> 16856-L19650	Xq26
472	<b>OPHN1 probe</b> 02915-L02309	Xq12
481	<b>PAK3 probe</b> 02911-L02305	Xq23

**Prilog 9. SALSA MLPA P343 Autism-1 probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position			
		reference	15q11-q13 / Exon	16p11	SHANK3
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA				
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation				
100	X-fragment: Specific for the X chromosome				
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome				
124 ±	Reference probe 09176-L09350	17q11 - salt reference probe; reduced signal → salt present!			
130	Reference probe 09727-L10077	12q24			
136	<b>ATP10A</b> probe 12964-L14669	15q12	Exon 1		
142	<b>UBE3A</b> probe 10883-L11553	15q11	Exon 9		
148	<b>GABRB3</b> probe 10872-L11542	15q12	Exon 9		
154	Reference probe 09431-L09680	11q13			
160	<b>UBE3A</b> probe 04620-L14668	15q11	Exon 7		
166	<b>KLF13</b> probe 08376-L08230	15q13	Exon 2		
172	<b>HIRIP3</b> probe 11667-L14670			Exon 3	
178	<b>NDNL2</b> probe 08377-L08231	15q13	Exon 1		
184	<b>GABRB3</b> probe 10868-L11538	15q12	Exon 7		
190	Reference probe 09979-L10438	19p13			
197	<b>UBE3A</b> probe 10880-L11550	15q11	Exon 6		
202	<b>APBA2</b> probe 01314-L00867	15q13	Exon 14		
208	<b>SEZ6L2</b> probe 11668-L12439			Exon 1	
214	<b>SNRPN-HB2-85</b> probe 12718-L13906	15q11			
220	<b>GABRB3</b> probe 01315-L09339	15q12	Exon 12		
226	<b>DOC2A</b> probe 13162-L12447			Exon 4	
232 ±	<b>SHANK3</b> probe 06787-L07383			Exon 22	
238 ±	<b>MAZ</b> probe 11669-L12440			Exon 5	
244	<b>UBE3A</b> probe 10886-L14677	15q11	Exon 12		
250	Reference probe 02658-L02125	11q22			
256	<b>UBE3A</b> probe 01317-L00864	15q11	Exon 13		
265	Reference probe 10243-L02149	1q44			
270	<b>ATP10A</b> probe 11165-L12883	15q12	Exon 16		
286	<b>CHRNA7</b> probe 12956-L08237	15q13	Exon 4		
292	<b>GABRB3</b> probe 10875-L11545	15q12	Exon 11		
300 ±	<b>TJP1</b> probe 08389-L14671	15q13	Intron 1		
309 ±	<b>SHANK3</b> probe 06784-L06376			Exon 3	
319	<b>GABRB3</b> probe 10870-L11540	15q12	Exon 8		
328	Reference probe 05297-L04685	3q11			
337	<b>CD2BP2</b> probe 11671-L12442			Exon 4	
344 ¥	<b>MVP</b> probe 00550-L22423			Exon 5	
355	<b>GABRB3</b> probe 10867-L11537	15q12	Exon 4		
364	<b>SPN</b> probe 11672-L12443			Exon 3	
373	<b>TRPM1</b> probe 08397-L14672	15q13	Exon 27		
382	<b>GABRB3</b> probe 10874-L11544	15q12	Exon 10		
391 ±	<b>SHANK3</b> probe 14190-L15800			Exon 15	
409	Reference probe 07208-L06858	7p14			
418 ±	<b>MAZ</b> probe 11673-L12444			Exon 6	
427	<b>SCG5</b> probe 12951-L14742	15q13	Exon 6		
436	<b>OCA2</b> probe 02040-L01553	15q12	Exon 22		
445	<b>OCA2</b> probe 02041-L03725	15q13	Exon 1		
454	<b>HIRIP3</b> probe 11674-L12445			Exon 4	
465	<b>MAPK3</b> probe 11675-L12446			Exon 5	
475	<b>SNRPN-HB2-85</b> probe 12720-L13795	15q11			
481	<b>LAT</b> probe 11677-L12448			Exon 4	
492	<b>SCG5</b> probe 12954-L14664	15q13	Exon 3		
500	Reference probe 10218-L14675	7q22			

**Prilog 10. SALSA MLPA P080-A1 Craniofacial probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		Use for reference	x-chromosomes
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
92	Ligation dependent control fragment at 2q14		
136	Reference probe 1662-L1237	11q23.3	
142	<b>RUNX2</b> probe 2610-L2081	<b>RUNX2</b> exon 2	
148	<b>ALX4</b> probe 2606-L2077	<b>ALX4</b> exon 1	
154	<b>MSX2</b> probe 2604-L2671	<b>MSX2</b> exon 1	
160	<b>RUNX2</b> probe 2611-L2082	<b>RUNX2</b> exon 3A	
166	<b>ALX4</b> probe 2607-L2078	<b>ALX4</b> exon 2	
170 †	<b>FGFR2</b> probe 4185-L3584	<b>FGFR2</b> exon 5	
178 †	<b>FGFR1</b> probe 4184-L3583	<b>FGFR1</b> exon 5	
185 ¥	<b>RUNX2</b> probe 2612-L3899	<b>RUNX2</b> exon 4	
193	<b>TWIST</b> probe 2079-L1598	<b>TWIST</b> exon 2	
202 †	<b>FGFR3</b> probe 4182-L3904	<b>FGFR3</b> exon 6	
211	<b>RUNX2</b> probe 2613-L3903	<b>RUNX2</b> exon 5	
219	<b>ALX4</b> probe 2608-L2079	<b>ALX4</b> exon 3	
229	<b>TWISTNB</b> probe 2147-L1963	<b>TWISTNB</b> exon 2	
238	<b>RUNX2</b> probe 2614-L2085	<b>RUNX2</b> exon 6	
244 ± †	<b>FGFR2</b> probe 2618-L2090	<b>FGFR2</b> exon 7	
250 ± †	<b>FGFR3</b> probe 2620-L2094	<b>FGFR3</b> exon 7	
262	<b>RUNX2</b> probe 2615-L2086	<b>RUNX2</b> exon 7	
274	<b>TWIST</b> probe 2080-L2886	<b>TWIST</b> exon 1	
283 †	<b>FGFR3</b> probe 4183-L2497	<b>FGFR3</b> exon 10	
292	<b>TWIST</b> probe 1166-L0722	<b>TWIST</b> exon 2	
300	<b>RUNX2</b> probe 2616-L2087	<b>RUNX2</b> exon 8	
310	<b>ALX4</b> probe 2609-L2080	<b>ALX4</b> exon 4	
319	<b>TWIST</b> probe 1969-L2364	<b>TWIST</b> exon 1	
328 ¥	<b>RUNX2</b> probe 2617-L2088	<b>RUNX2</b> exon 9	
337	<b>MSX2</b> probe 2605-L2672	<b>MSX2</b> exon 2	
346 †	<b>FGFR2</b> probe 4186-L3900	<b>FGFR2</b> exon 3	
355 †	<b>FGFR4</b> probe 1311-L0859	<b>FGFR4</b> exon 18	
364	<b>EFNB1</b> probe 3763-L3901		X-chr. <b>EFNB1</b> exon 1
375 †	<b>FGFR4</b> probe 2243-L3902	<b>FGFR4</b> exon 2	
383 †	<b>FGFR1</b> probe 1046-L1837	<b>FGFR1</b> exon 2	
391	<b>EFNB1</b> probe 3764-L3225		X-chr. <b>EFNB1</b> exon 2
399 §	<b>EFNB1</b> probe 3765-L3226		X-chr. <b>EFNB1</b> exon 3
409	Reference probe 0669-L0373	11p12	
418	<b>EFNB1</b> probe 3766-L3227		X-chr. <b>EFNB1</b> exon 4
427	<b>EFNB1</b> probe 3767-L3228		X-chr. <b>EFNB1</b> exon 5

**Prilog 11. SALSA MLPA P313 CREBBP probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		Reference	CREBBP	EP300
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 *	Reference probe 11230-L11913	8q21		
139	<b>CREBBP probe</b> 03088-L11381		<b>Exon 31</b>	
144	<b>CREBBP probe</b> 09886-L10299		<b>Exon 7</b>	
150	<b>CREBBP probe</b> 09898-L11194		<b>Exon 19</b>	
154	Reference probe 09431-L09680	11q13		
160	<b>CREBBP probe</b> 09903-L10316		<b>Exon 24</b>	
166	<b>CREBBP probe</b> 09890-L10303		<b>Exon 11</b>	
172 ±	<b>CREBBP probe</b> 03087-L02487		<b>Exon 1</b>	
178 *	Reference probe 02865-L02617	17q11		
184	<b>CREBBP probe</b> 09909-L10322		<b>Exon 30</b>	
190	<b>CREBBP probe</b> 09891-L10304		<b>Exon 12</b>	
196	<b>CREBBP probe</b> 09902-L10315		<b>Exon 23</b>	
201 ±	<b>EP300 probe</b> 09925-L11195			<b>Exon 1</b>
208	<b>CREBBP probe</b> 09882-L10295		<b>Exon 3</b>	
214	<b>CREBBP probe</b> 09894-L10307		<b>Exon 15</b>	
221	<b>CREBBP probe</b> 09904-L10317		<b>Exon 25</b>	
229 *	Reference probe 05508-L04931	10q11		
237	<b>CREBBP probe</b> 09895-L10308		<b>Exon 16</b>	
247	<b>CREBBP probe</b> 09887-L10300		<b>Exon 8</b>	
255	<b>CREBBP probe</b> 09899-L10312		<b>Exon 20</b>	
265 *	Reference probe 03270-L02707	3q29		
272	<b>CREBBP probe</b> 09897-L10310		<b>Exon 18</b>	
283	<b>CREBBP probe</b> 09900-L10313		<b>Exon 21</b>	
292	<b>CREBBP probe</b> 09883-L10296		<b>Exon 3</b>	
298 *	Reference probe 13241-L21044	1p21		
308 †	<b>CREBBP probe</b> 03086-L24217		<b>Exon 4</b>	
317	<b>CREBBP probe</b> 09906-L10319		<b>Exon 27</b>	
325	<b>CREBBP probe</b> 03085-L04948		<b>Exon 2</b>	
337	<b>CREBBP probe</b> 09885-L10298		<b>Exon 6</b>	
346	<b>CREBBP probe</b> 09896-L10309		<b>Exon 17</b>	
355	<b>EP300 probe</b> 09930-L10389			<b>Exon 12</b>
364	<b>CREBBP probe</b> 09884-L10297		<b>Exon 5</b>	
373	<b>CREBBP probe</b> 09889-L10302		<b>Exon 10</b>	
382	<b>CREBBP probe</b> 09892-L10305		<b>Exon 13</b>	
391	<b>CREBBP probe</b> 09905-L10318		<b>Exon 26</b>	
400 *	Reference probe 07991-L07772	7q21		
409	<b>CREBBP probe</b> 09893-L10306		<b>Exon 14</b>	
418	<b>CREBBP probe</b> 09907-L10320		<b>Exon 28</b>	
427 ±	<b>CREBBP probe</b> 09880-L10293		<b>Exon 1</b>	
436	<b>CREBBP probe</b> 09901-L10314		<b>Exon 22</b>	
445	<b>EP300 probe</b> 09927-L10386			<b>Exon 4</b>
453	<b>CREBBP probe</b> 09881-L10294		<b>Exon 2</b>	
463	<b>CREBBP probe</b> 09908-L10321		<b>Exon 29</b>	
474	<b>CREBBP probe</b> 09888-L10301		<b>Exon 9</b>	
490 *	Reference probe 14882-L06636	14q11		

**Prilog 12. SALSA MLPA probemix P336 UBE3A**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position				
		reference	1p36 MTHFR	15q11 UBE3A	15q12 GABRB3	16p13
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
129	Reference probe 11622-L12379	10q25				
138	Reference probe 06026-L07190	11p13				
142	<b>UBE3A probe</b> 10883-L11553			<b>Exon 9</b>		
148	<b>MTHFR probe</b> 12083-L12971			<b>Exon 5</b>		
155	Reference probe 07144-L06756	19q13				
172 §	<b>MTHFR probe</b> 12084-L12972			<b>A222V mutation</b>		
179	<b>UBE3A probe</b> 10882-L11552			<b>Exon 9</b>		
184	<b>GABRB3 probe</b> 10868-L11538				<b>Exon 7</b>	
191 ±	<b>AXIN1 probe</b> 10188-L16066				<b>Exon 2</b>	
197	<b>UBE3A probe</b> 13727-L15208			<b>Exon 2</b>		
203	<b>GABRB3 probe</b> 10873-L11543				<b>Exon 10</b>	
208 ⓐ	Reference probe 09865-L08705	13q32				
215	<b>UBE3A probe</b> 10885-L11555			<b>Exon 11</b>		
220	<b>MTHFR probe</b> 12085-L14676			<b>Exon 10</b>		
226 ⓐ	Reference probe 13598-L15056	9q21				
232	<b>UBE3A probe</b> 13728-L15209			<b>Exon 7</b>		
238	<b>AXIN1 probe</b> 10189-L13393				<b>Exon 11</b>	
244	<b>UBE3A probe</b> 10886-L14677			<b>Exon 12</b>		
250	<b>GABRB3 probe</b> 10866-L11536				<b>Exon 3</b>	
258	<b>UBE3A probe</b> 01317-L14678			<b>Exon 13</b>		
265	<b>MTHFR probe</b> 12086-L13395			<b>Exon 3</b>		
272	<b>CREBBP probe</b> 09897-L10310				<b>Exon 18</b>	
283	<b>UBE3A probe</b> 10879-L11549			<b>Exon 5b</b>		
292	<b>UBE3A probe</b> 13729-L15210			<b>Exon 1</b>		
301	Reference probe 09031-L09285	2q37				
310	<b>UBE3A probe</b> 10884-L11554			<b>Exon 10</b>		
319	<b>MTHFR probe</b> 12087-L13396			<b>Exon 8</b>		
328	Reference probe 08543-L08544	3q24				
341 ⓐ	<b>UBE3A probe</b> 14083-L15682			<b>Exon 14</b>		
349	Reference probe 13442-L14897	17p13				
359 †	<b>UBE3A probe</b> 13731-SP0136-L15212			<b>Exon 8</b>		
365	<b>UBE3A probe</b> 13732-L16039			<b>Exon 3</b>		
372	<b>UBE3A probe</b> 14012-L15214			<b>Exon 6</b>		
379 ⓐ	Reference probe 09142-L09953	10q26				
390	<b>UBE3A probe</b> 14490-L16067			<b>Exon 4</b>		
400	Reference probe 07678-L06854	7p14				
409	<b>UBE3A probe</b> 13735-L15216			<b>Exon 2</b>		
418	<b>UBE3A probe</b> 14489-L16371			<b>Exon 1</b>		
427	Reference probe 08046-L07827	5p15				
436	<b>UBE3A probe</b> 14085-L15684			<b>Exon 14</b>		
445 ±	<b>TSC2 probe</b> 02445-L01409				<b>Exon 41</b>	
454	Reference probe 08579-L08580	17q23				

**Prilog 13. SALSA MS-MLPA probemix ME028-B2 PRADER-WILLI/ANGELMAN**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Ref.	Chromosomal region			HhaI site	Methylated in blood (%)
			UBE3A	SNRPN	Other 15q		
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA						
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation						
100	X-fragment: Specific for the X chromosome						
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome						
130	Reference 03896-L00020	11q13					
136	Reference 09824-L10234	10q26					
142	<b>SNRPN</b> 04103-L02951		CpG island (PWS-SRO)		+	50% imprinted	
148	Reference 08372-L08226	17q12					
154 ^	<b>TUBGCP5</b> 02018-L00865			BP1-BP2 region			
160	<b>UBE3A</b> 04620-L00863		Exon 7				
166	Reference 08020-L07801	11q24					
172	<b>MKRN3</b> 02020-L12922			15q11.2			
178	<b>SNRPN</b> 04106-L13905		CpG island (PWS-SRO)		+	50% imprinted	
184	<b>UBE3A</b> 04641-L04293		Exon 1		+	0%	
190	<b>SNRPN</b> 04104-L04294		CpG island (PWS-SRO)		+	50% imprinted	
197	<b>UBE3A</b> 10880-L11550		Exon 6				
202 ↵	<b>APBA2</b> 01314-L00867			15q13.1			
208	Reference 07404-L07051	12q13					
214	<b>SNRPN</b> 12719-L13907		SNORD116 snoRNA cluster#				
220	<b>GABRB3</b> 01315-L09339			15q12			
226	<b>ATP10A</b> 11159-L11843			15q12			
232 ±	Reference 08335-L08267	17q21					
238 ^	<b>SNRPN</b> 12178-L13090		exon u1B*				
244	Reference 08051-L07832	5p15					
250	<b>SNRPN</b> 11181-L13997		CpG island (PWS-SRO)		+	50% imprinted	
256	<b>SNRPN</b> 02027-L12881		exon u5 (AS-SRO)				
264	Reference 09533-L09943	7q22					
270	<b>SNRPN</b> 12182-L13094		intron u2				
278	<b>SNRPN</b> 12179-L13383		intron u2				
287 ^	<b>SNRPN</b> 11178-L11862		exon u1B				
294	<b>SNRPN</b> 01318-L13088		SNURF-SNRPN exon 3				
301	<b>UBE3A</b> 12082-L13474		Exon 8				
309	Reference 01576-L01148	22q12					
319	Reference 08018-L07799	11q24					
328 §	<b>SNRPN</b> 12723-L13798		SNORD116 snoRNA cluster#		+	(100%)	
337	Reference 01590-L01162	13q14					
346 ¶	Digestion 01709-L12924	15q26 Digestion Control Probe. Signal <10% upon digestion.			+	0%	
355	<b>UBE3A</b> 02034-L12925		Exon 13				
366 †	<b>ATP10A</b> 11162-L11846			15q12			
373	<b>UBE3A</b> 10878-L11548		Exon 5				
382	<b>GABRB3</b> 10874-L11544			15q12			
391	<b>SNRPN</b> 12477-L13519		exon U5 (AS-SRO)				
400	<b>SNRPN</b> 11177-L11861		SNURF-SNRPN exon 7				
409 ±	<b>MAGEL2</b> 11155-L11839			15q11.2			
419 T ±	<b>NDN</b> 04027-L13937			15q11.2	+	30-50% imprinted	
427	Reference 05330-L04717	1p21					
434 ^	<b>NIPA1</b> 06249-L05755			BP1-BP2 region			
445 †	<b>NDN</b> 11149-L11833			15q11.2			
454	Reference 08947-L09042	11p15					
463 ±	Digestion 02260-L01747	3p22 Digestion Control Probe. No signal upon digestion.			+	0%	
472	<b>SNRPN</b> 12721-L13796		SNORD116 snoRNA cluster#				
480	Reference 08586-L13087	17q23					

**Prilog 14. SALSA MS-MLPA probemix ME029-B2 FMR1/AFF2**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position			HhaI site	% methylated in normal blood-derived DNA	% expected signal reduction
		other	FMR1	AFF2			
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA						
88-92-96 ¶	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation						
100	X-fragment: Specific for the X chromosome						
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome						
118 *	Y-fragment: Specific for the Y chromosome						
129 ±	Reference probe 01690-L00423	Xq12					
136	MTM1 probe 12647-L11339	Xq28					
142 *	<b>FMR1</b> probe 12915-L14360		Exon 1		+	1%	
148	<b>AFF2</b> probe 04036-L03198		Exon 1		+	11%	
154	<b>AFF2</b> probe 03734-L03194		Exon 1		+	12%	
160 *	<b>FMR1</b> probe 03722-L03182		Exon 1		+	1%	
167 *	<b>FMR1</b> probe 12918-L12030		Exon 1		+	1%	
172	Reference probe 06467-L06571	Xp22					
178 *	<b>FMR1</b> probe 12916-L14361		Exon 1		+	0%	
184	FANCB promoter probe 03644-L03057	Xp22			+	2%	
190 *	<b>FMR1</b> probe 04037-L03722		Exon 1		+	0%	
195 *	<b>FMR1</b> probe 03727-L03187		Exon 1		+	0%	
202 †	<b>AFF2</b> probe 12917-L21245		Exon 1		+	1%	
208	Reference probe 06794-L06386	Xq27					
212 *	<b>FMR1</b> probe 03725-L13188		Exon 1		+	1%	
220	<b>AFF2</b> probe 04029-L14362		Exon 21				
226	<b>FMR1</b> probe 03728-L14363		Exon 3				
232	Reference probe 03047-L14364	Xp21					
238	<b>AFF2</b> probe 03516-L02322		Exon 6				
245	<b>AFF2</b> probe 03736-L03196		Exon 1		+	0%	
259	<b>AFF2</b> probe 03733-L14365		Exon 1		+	0%	
265	Reference probe 05875-L05275	Xq22					
274 ‡	Reference probe 05186-L04567	Xp22					
283 †	<b>AFF2</b> probe 00493-L00066		Exon 3				
292	<b>FMR1</b> probe 04031-L00833		Exon 17		+	100%	
301	<b>AFF2</b> probe 03739-L03199		Exon 5				
310	ID5 exon 5 probe 05244-L04624	Xq28					
319	<b>FMR1</b> probe 05311-L03189		Exon 5				
328	Reference probe 02566-L10170	Xp22			+	100%	
337	<b>AFF2</b> probe 12914-L03200		Exon 8b				
346	MITF probe 10794-L11434	3p13					
355	<b>AFF2</b> probe 03741-L03201		Exon 9				
364	<b>FMR1</b> probe 03730-L14537		Exon 7		+	100%	
371	Reference probe 02912-L02306	Xq12					
382	<b>FMR1</b> probe 13214-L14539		Exon 15a				
391	Reference probe 05195-L04576	Xp22					
400	<b>FMR1</b> probe 12913-L14366		Exon 9				
409	<b>AFF2</b> probe 03742-L14538		Exon 11				
418	<b>FMR1</b> probe 03731-L03191		Exon 14				
427	Reference probe 02923-L02317	Xp21					
436	<b>AFF2</b> probe 03743-L03203		Exon 15				
445	FLNA exon 28 probe 04138-L03495	Xq28					
453 #	Digestion control probe 04046-L02172	3p24			+	2%	
463 #	Digestion control probe 08843-L08965	17q21			+	0%	
472	Reference probe 02915-L02309	Xq12					



**Tablica 13.**

Ispitanik	#	Start-Stop(bp)	Veličina	Pruga	Amp/Del	Simbol gena	OMIM	Gen	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena	Postavljena dijagnoza
CRZ-002	chr1	16713074-17124610	411.537	p36.13	del	NBPF1	610501	Neuroblastoma breakpoint family, member 1		
	chr2	175227206-175285747	58.542	q31.1	dup	<b>WIPF1</b>	602357	WAS/WASL-interacting protein family, member 1	Wiskott-Aldrich syndrome-2 (WAS2; 614493)	
	chr15	20316992-20731389	414.398	q11.2	del	<b>NIPA1</b>	608145	Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 1	Spastic paraplegia 6, autosomal dominant (phenotype 600363 (3))	<i>15q11.2 mikrolelecijski sindrom</i>
					NIPA2	608146	Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 2			
ST-162	chr22	18513609-18612982	99.374	q11.21	dup	<b>RTN4R</b>	605566	NOGO receptor (reticulon 4 receptor)	{Schizophrenia, susceptibility to} (phenotype 181500 (3))	
ST-163	chr3	101837302-101928155	90.854	q12.2	dup	<b>TFG</b>	602498	TRK-fused gene	?Spastic paraplegia 57, autosomal recessive (phenotype 615658 (3)) Chondrosarcoma, extraskeletal myxoid (phenotype 612237 (1)) Hereditary motor and sensory neuropathy, proximal type (phenotype 604484 (3))	
	chr17	41527705-41700815	173.111	q21.31	dup	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
ST-164	chr16	83607894-83633401	25.508	q24.1	del	<b>KIAA0513</b>	611675	KIAA0513 gene		
CRZ-009	chr12	19340049-19494087	154.039	p12.3	dup	<b>PLEKHA5</b>	607770	Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding PH domain protein 2		
	chr14	62852058-62930440	78.383	q23.2	dup	<b>GPHB5</b>	609652	glycoprotein hormone beta 5		
						<b>PPP2R5E</b>	601647	Protein phosphatase-2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform		
chrX	148694272-148835590	141.319	q28	dup	<b>MAGEA8</b>	300341	Melanoma antigen, family A, 8			
CRZ-034	chr12	93149-114660	21.512	p13.33	del	<b>IQSEC3</b>	612118	IQ motif- and SEC7 domain-containing protein 3		
CRZ-052	chr1	16713074-17094530	381.457	p36.13	del	NBPF1	610501	Neuroblastoma breakpoint family, member 1		
CRZ-035	chr6	150599529-150817374	217.846	q25.1	dup	<b>PPP1R14C</b>	613242	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 14C		
CRZ-053	chr16	2167977-2203639	35.663	p13.3	del	<b>CASKIN1</b>	612184	CASK-interacting protein 1		
ST-029	chr7	7990771-13269023	5.278.253	p21.3	del	<b>THSD7A</b>	612249	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A		
						<b>TMEM106B</b>	613413	Transmembrane protein 106B		<i>mikrolelecija 7p21.3</i>
						<b>SCIN</b>	613416	Scinderin		
						<b>ARL4A</b>	604786	ADP-ribosylation factor-like 4		



Ispitanik	#	Start-Stop(bp)	Veličina	Pruga	Amp/Del	Simbol gena	OMIM	Gen	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena	Postavljena dijagnoza
	chr12	3377865-5091624	1.713.760	p13.32	del	<b>FGF23</b>	605380	Fibroblast growth factor 23	Hypophosphatemic rickets, autosomal dominant (phenotype 193100 (3)) Osteomalacia, tumor-induced (1) Tumoral calcinosis, hyperphosphatemic, familial (phenotype 211900 (3))	
						<b>NDUFA9</b>	603834	NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex, 9	Leigh syndrome due to mitochondrial complex I deficiency (phenotype 256000 (3))	
						<b>KCNA1</b>	176260	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	Episodic ataxia/myokymia syndrome (phenotype 160120 (3))	
						<b>KCNA5</b>	612240	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	<i>mikrodelecija 12p13.32</i>
						PRMT8	610086	protein arginine methyltransferase 8		
						CCND2	123833	Cyclin D2		
						C12orf5	610775	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator		
						GALNT8	606250	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 8		
						KCNA6	176257	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6		
CRZ-036	chr7	30639966-30918968	279.003	p15.1	del	CRHR2	602034	Corticotropin releasing hormone receptor-2		
	chrX	131640161-132050467	410.307	q26.2	dup	HS6ST2	300545	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2		
ST-099	chr3	101837302-101928155	90.854	q12.2	dup	<b>TFC</b>	602498	TRK-fused gene	?Spastic paraplegia 57, autosomal recessive (phenotype 615658 (3)) Chondrosarcoma, extraskeletal myxoid (phenotype 612237 (1)) Hereditary motor and sensory neuropathy, proximal type (phenotype 604484 (3))	
ST-306	chr6	162647400-162875221	227.822	q26	del	<b>PARK2</b>	602544	Parkin	Adenocarcinoma of lung, somatic (phenotype 211980 (3)) Adenocarcinoma, ovarian, somatic (phenotype 167000 (3)) Parkinson disease, juvenile, type 2 (phenotype 600116 (3)) {Leprosy, susceptibility to} (phenotype 607572 (3))	<i>6q26 mikrodelecijski sindrom</i>
CRZ-058	chr5	32146491-32194186	47.696	p13.3	dup	PDZD2	610697	PDZ domain containing 2		
CRZ-011	chr6	30737615-30765105	27.491	p21.33	del	PPP1R18	610990	Phostensin		
						DDR1	600408	Neuroepithelial tyrosine kinase		
						VAR2	612802	Valyl-tRNA synthetase 2		
CRZ-021	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	dup	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
CRZ-003	chr3	23644411-23979033	334.623	p24.3-p24.2	dup	NR1D2	602304	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2		
CRZ-064	chr10	45489823-46558331	1.068.509	q11.21-q11.22	del	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		

Ispitanik	#	Start-Stop(bp)	Veličina	Pruga	Amp/Del	Simbol gena	OMIM	Gen	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena	Postavljena dijagnoza
ST-036	chr7	78769896-78798999	29.104	q21.11	del	MAGI2	606382	Atrophin 1-interacting protein 1		
	chr17	41527705-41700815	173.111	q21.31	dup	KIAA1267	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
ST-108	chr19	52230861-52266743	35.883	q13.32	del	NPAS1	603346	Neuronal PAS domain protein 1		
	chr22	17274835-17422043	147.209	q11.21	del	PRODH	606810	Proline dehydrogenase (proline oxidase)	Hyperprolinemia, type I (phenotype 239500 (3)) {Schizophrenia, susceptibility to, 4} (phenotype 600850 (3))	22q11.21 mikrodelecijski sindrom
	chrX	47766391-47817921	1,320,528	p11.23	dup	DGCR6	601279	DiGeorge syndrome critical region 6		
						FTSJ1	300499	FTSJ homolog 1	Mental retardation, X-linked 9 (phenotype 309549 (3))	
					WDR45	300526	WD repeat-containing protein 45	Neurodegeneration with brain iron acculation 5 (phenotype 300894 (3))	Xp11.23 mikroduplicacijski sindrom	
					SYP	313475	Synaptophysin	Mental retardation, X-linked 96 (phenotype 300802 (3))		
ST-016	chr20	40613964-40675217	61.254	q12	del	PTPRT	608712	Protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, T		
ST-004	chr9	70851104-71044695	193.592	q21.11	dup	FXN	606829	Frataxin	Friedreich ataxia (phenotype 229300 (3)) Friedreich ataxia with retained reflexes (phenotype 229300 (3))	
ST-014	chr10	45489823-47172593	1.682.771	q11.21-q11.22	dup	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr22	43529970-44492989	963.020	q13.31	dup	FBLN1	135820	Fibulin 1	Synpolydactyly, 3/3/4, associated with metacarpal and metatarsal synostoses (phenotype 608180 (3))	
						ATXN10	611150	Ataxin 10	Spinocerebellar ataxia 10 (phenotype 603516 (3))	
						ARHGAP8	609405	GTPase-activating protein, RHO, 8		
					NUP50	604646	Nucleoporin, 50 kD			
ST-015	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	dup	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
ST-220	chr8	3724590-3779194	54.605	p23.2	del	CSMD2	608397	Cub and Sushi multiple domains 1		
CRZ-032	chr3	13889300-13918252	28.953	p25.1	del	WNT7A	601570	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	Fuhrmann syndrome (phenotype 228930 (3)) Ulna and fibula, absence of, with severe limb deficiency (phenotype 276820 (3))	
	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	del	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr17	41577520-41700815	123.296	q21.31	dup	KIAA1267	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
CRZ-007	chr5	37178277-37574217	395.941	p13.2	dup	C5orf42	614571	Chromosome 5 open reading frame 42	Joubert syndrome 17 (phenotype 614615 (3))	5p13 mikroduplicacijski sindrom
CRZ-025	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	dup	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
CRZ-076	chr12	19366442-19483375	116.934	p12.3	dup	PLEKHA5	607770	Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding PH domain protein 2		
CRZ-028	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	del	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
CRZ-072	chr11	99032916-99074611	41.696	q22.1	del	CNTN6	607219	Contactin 5		
ERF-003	chr1	16713074-17124610	411.537	p36.13	del	NBPF1	610501	Neuroblastoma breakpoint family, member 1		

Ispitanik	#	Start-Stop(bp)	Veličina	Pruga	Amp/Del	Simbol gena	OMIM	Gen	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena	Postavljena dijagnoza
CRZ-044	chr3	101837302-101928155	90.854	q12.2	dup	<b>TFG</b>	602498	TRK-fused gene	?Spastic paraplegia 57, autosomal recessive (phenotype 615658 (3)) Chondrosarcoma, ekstraskeletal myxoid (phenotype 612237 (1)) Hereditary motor and sensory neuropathy, proximal type (phenotype 604484 (3))	
CRZ-073	chr1	16713074-17104404	391.331	p36.13	dup	<b>NBPF1</b>	610501	Neuroblastoma breakpoint family, member 1		
	chr7	145857191-145998341	141.151	q35	dup	<b>CNTNAP2</b>	604569	Contactin-associated protein-like 2	Pitt-Hopkins like syndrome 1 (phenotype 610042 (3)) {Autism susceptibility 15} (phenotype 612100 (3))	
	chr17	41527705-41700815	173.111	q21.31	dup	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
ERF-002	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	del	<b>GPRIN2</b>	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr17	41577520-42143107	565.588	q21.31-q21.32	del	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	<i>17q21.31 mikrolelecijski sindrom - Koolen-De Vries sindrom</i>
ERF-004	chr10	117153302-117361858	208.557	q25.3	dup	<b>ATRNL1</b>	612869	Attractin-like 1		
ERF-005	chr17	41566540-42166911	600.372	q21.31-q21.32	del	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	<i>17q21.31 mikrolelecijski sindrom - Koolen-De Vries sindrom</i>
ERF-006	chr10	46396163-46568552	172.39	q11.22	dup	<b>GPRIN2</b>	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr22	17289044-17390508	101.465	q11.21	dup	<b>PRODH</b>	606810	Proline dehydrogenase (proline oxidase)	Hyperprolinemia, type I (phenotype 239500 (3)) {Schizophrenia, susceptibility to, 4} (phenotype 600850 (3))	
ERF-007	chr3	101837302-101928155	90.854	q12.2	dup	<b>TFG</b>	602498	TRK-fused gene	?Spastic paraplegia 57, autosomal recessive (phenotype 615658 (3)) Chondrosarcoma, ekstraskeletal myxoid (phenotype 612237 (1)) Hereditary motor and sensory neuropathy, proximal type (phenotype 604484 (3))	
ERF-007	chr17	41527705-41700815	173.111	q21.31	dup	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
ERF-008	chr7	54403122-55590899	1,187,778	p11.2	dup	<b>LANCL2</b>	612919	LanC-like 2		
ERF-009	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	del	<b>GPRIN2</b>	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr17	41527705-41635595	107.891	q21.31	dup	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
ERF-011	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	dup	<b>GPRIN2</b>	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr17	41566540-42143107	576.568	q21.31-q21.32	del	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	<i>17q21.31 mikrolelecijski sindrom - Koolen-De Vries sindrom</i>
ERF-010	chr10	46396163-47172593	776.431	q11.22	dup	<b>GPRIN2</b>	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
CRZ-012	chrX	20967600-21310300	342.701	p22.12	del	<b>CNKSR2</b>	300724	connector enhancer of KSR 2		
CRZ-043	chr16	15399818-18069668	2.669.851	p13.11-p12.3	dup	<b>NDE1</b>	609449	Nude, A. nidulans, homolog of, 1	?Microhydranencephaly (phenotype 605013 (3)) Lissencephaly 4 (with microcephaly) (phenotype 614019 (3))	<i>mikroduplicacija 16p13.11-p12.3</i>
						<b>NOMO3</b>	609159	Nodal modulator 3		

Ispitanik	#	Start-Stop(bp)	Veličina	Pruga	Amp/Del	Simbol gena	OMIM	Gen	OMIM Sindromi povezani s mutacijama detektiranih gena	Postavljena dijagnoza
ERF-014	chr6	56285681-56459877	174,197	p12.1	dup	<b>DST</b>	113810	Dystonin (bullous pemphigoid antigen 1)	Epidermolysis bullosa simplex, autosomal recessive 2 (phenotype 615425 (3)) Neuropathy, hereditary sensory and autonomic, type VI (phenotype 614653 (3))	
	chr10	46396163-47172593	776,431	q11.22	del	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
ERF-016	chr10	45478103-47161291	1,683,189	q11.21-q11.22	dup	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
ERF-017	chr20	14747098-14772431	25,334	p12.1	del	MACROD2	611567	Macro domain-containing 2		
ERF-018	chr5	37178277-37552419	374,143	p13.2	dup	<b>C5orf42</b>	614571	Chromosome 5 open reading frame 42	Joubert syndrome 17 (phenotype 614615 (3))	<i>5p13 mikroduplicacijski sindrom</i>
ERF-018	chr7	145920565-146055248	134,684	q35	del	<b>CNTNAP2</b>	604569	Contactin-associated protein-like 2	Cortical dysplasia-focal epilepsy syndrome (phenotype 610042 (3)) Pitt-Hopkins like syndrome 1 (phenotype 610042 (3)) {Autism susceptibility 15} (phenotype 612100 (3))	<i>mikrodelecija 7q35</i>
	chr20	1232355-1265564	33,21	p13	del	SNPH	604942	Syntaphilin		
ERF-022	chr10	46396163-47172593	776,431	q11.22	dup	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr17	41527705-41652920	125,216	q21.31	dup	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
ERF-021	chr10	46396163-47172593	776,431	q11.22	del	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
	chr17	41527705-41652920	125,216	q21.31	dup	<b>KIAA1267</b>	612452	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	Koolen-De Vries syndrome (phenotype 610443 (3))	
CRZ-004	chr3	30086105-35076243	4,990,139	p24.1-p22.3	del	<b>STT3B</b>	608605	STT3B, subunit of the oligosaccharyltransferase complex (catalytic)	?Congenital disorder of glycosylation, type Ix (phenotype 615597 (3))	<i>mikrodelecija 3p24.1-p22.3</i>
						<b>GLB1</b>	611458	Galactosidase, beta-1	GM1-gangliosidosis, type I (phenotype 230500 (3)) GM1-gangliosidosis, type II (phenotype 230600 (3)) GM1-gangliosidosis, type III (phenotype 230650 (3)) Mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio) (phenotype 253010 (3))	
						CLASP2	605853	CLIP-associated protein 2		
	chr4	190676708-191153672	476,965	q35.2	dup	FRG1	601278	Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1		
	chr10	46396163-46558331	162,169	q11.22	del	GPRIN2	611240	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2		
CRZ-012	chr1	1147238-1436736	289,499	p36.33	del	<b>B3GALT6</b>	615291	UDP-Gal:beta-Gal beta-1,3-galactosyltransferase polypeptide 6	Ehlers-Danlos syndrome, progeroid type, 2 (phenotype 615349 (3)) Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, type 1, with or without fractures (phenotype 271640 (3))	
						CCNL2	613482	Cyclin L2		
	chr4	5839643-5874047	34,405	p16.1	dup	<b>EVC</b>	604831	Ellis-van Creveld syndrome gene	Ellis-van Creveld syndrome (phenotype 225500 (3)) Weyers acrodermal dysostosis (phenotype 193530 (3))	