

MOLEKULARNA CITOGENETIKA U DIJAGNOSTICI MIKRODELECIJSKIH SINDROMA

ISKRA PETKOVIĆ*

U ovom je radu dan kratak pregled dosadašnjih spoznaja o mikrodelecijskim sindromima, molekularnim mehanizmima njihove pojave i pridruženim poremećajima genoma. U radu je naveden pregled suvremenih metoda i tehnika koje se koriste u postavljanju dijagnoze mikrodelecijskih sindroma.

Deskriptori: MIKRODELECIJSKI SINDROMI, CITOGENETIKA, FISH

UVOD

Kromosomski poremećaji uzrokuju višak, manjak ili prestrukturiranje genetičkog materijala i zahvaćaju veće ili manje skupine gena. Aberacija može zahvatiti bilo koji kromosomski tip ili kromosomsku regiju, a kliničke posljedice ovise o prirodi genetičkog materijala i opsegu zahvaćene regije odnosno broju i prirodi zahvaćenih gena. Detekcija kromosomskog poremećaja, precizno određivanje mjesta loma te ispitivanje povezanosti kromosomske aberacije i fenotipa doprinijelo je otkrivanju specifičnih kromosomskih sindroma. Posebnu pozornost privlači skupina sindroma koji su posljedica delecije ili duplikacije sitnih segmenata genoma specifične kromosomske lokalizacije. Mogućnost detekcija takvih kromosomskih poremećaja u mnogome ovisi o danas raspoloživim citogenetičkim i molekularnim metodama ispitivanja genoma. Precizna analiza i identifikacija kromosomskog poremećaja je od praktične koristi u postavljanju dijagnoze, i od znanstvenog

interesa jer omogućuje istraživanje povezanosti genetičkog debalansa i pridruženih kliničkih osobina. U ovom radu dat je kratak pregled mikrodelecijskih sindroma uz prikaz suvremenih metoda molekularne citogenetike koje se koriste u dijagnostici takvih poremećaja.

MIKRODELECIJSKI SINDROMI

Mikrodelecijski sindromi su rezultat gubitka sitnog segmenta DNA, kojeg je veoma teško ili nemoguće otkriti metodama klasične citogenetike. Kao što i sam naziv naglašava, poremećaj genoma je kod većine danas poznatih sindroma posljedica delecije specifične kromosome regije uz gubitak skupine gena u zahvaćenom kromosomskom segmentu. Kliničke osobine sindroma su posljedica debalansa različitih gena susjedne lokalizacije te je Schmickel 1986. g. takve poremećaje nazivao "contiguous gene syndromes" ili sindromi susjednih gena (1). U literaturi se pored naziva mikrodelecijski sindromi susreće naziv segmentna aneusomija, a kako bi se naglasilo da poremećaj genoma uzrokuje strukturnu i funkcijsku monosomiju zahvaćenog kromosomskog segmenta (2).

MOLEKULARNI MEHANIZMI U NASTANKU MIKRODELECIJSKIH SINDROMA

Distribucija mikrodelecija u genomu čovjeka nije slučajna već su aberacijama

češće zahvaćene specifične kromosomske regije. To se posebno odnosi na skupinu mikrodelecijskih sindroma. Mikrodelecijski sindromi su posljedica gubitka genetičkog materijala specifične kromosomske lokalizacije i specifičnim mjestima loma. Mikrodelecije mogu biti intersticijske ili zahvatiti krajeve kromosomskih krakova. Kod većine sindroma susjednih gena deletirane regije su omeđene relativno dugim homogenim ponavljajućim nizovima nukleotida (3). Te su regije podložne rekombinaciji i u tim su regijama identificirana mjesta lomova kromosoma kod većine mikrodelecijskih sindroma. Pretpostavlja se da, nejednaki intra- i interkromosomski krosingover između graničnih ponavljajućih nizova nukleotida uzrokuje gubitak i recipročnu mikroduplikaciju intersticijskog kromosomskog segmenta (4). Ovaj mehanizam nastanka se smatra bitnim u etiologiji čestih mikrodelecijskih sindroma kao što su Smith-Magenis, Williams, Prader-Willi sindrom i drugi.

Mikrodelecije mogu biti posljedica lomova u nestabilnim kromosomskim lokusima kao što su rijetka fragilna mjesta. U takovim je slučajevima lom kromosoma popraćen gubitkom acentričnog fragmenta i *de novo* sintezom telomernih sekvenci DNA koje stabilizaciju kromosomsku strukturu. Ovaj mehanizam nastanka mikrodelecije

* Klinika za dječje bolesti Zagreb
Referentni centar Ministarstva zdravstva RH
za praćenje kongenitalnih anomalija

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Iskra Petković
Klinika za dječje bolesti Zagreb
Referentni centar Ministarstva zdravstva RH
za praćenje kongenitalnih anomalija
10000 Zagreb, Klaićeva 16

Tablica 1.
Mikrolelecijski sindromi

Table 1
Microdeletion syndromes

Sindrom	Kromosomska regija	Fenotipske osobine
Delecija 1p36	1p36	Kraniofacijalna anomalije, mikrocefalija, klinodaktilija, kardiomiopatija, hipotireoza, zamjedbena gluhoća, autoagresivnost, hipotonija, mentalna retardacija
Wolf-Hirschhorn	4p16.3	Pre- i postnatalni zastoj rasta, mentalna retardacija, dismorfija, mikrocefalija, kongenitalne anomalije
Delecija 4p15	4p15	Blaga mentalna retardacija, dugo trokutasto lice, dismorfija,
Cri-du-chat	5p15.2-p15.3	Mikrocefalija, dismorfija, teška mentalna retardacija
Delecija 6p22.3-p25	6p22.3-p25	Hidrocefalus, kraniofacijalne malformacije, kratak vrat, kongenitalne srčane greške, anomalije bubrega, psihomotorna retardacija, hipotonija
Williams	7q11.23	Dismorfija, hiperkalcemija, kongenitalna srčana greška, umiljata narav, preuranjeno starenje kože, mentalna retardacija
Langer-Giedion	8q24.1	Rijetka kosa, čunjaste epifize falangi, multiple egzostoze, mentalna retardacija, dismorfija
Delecija 10p13	10p13	Kraniofacijalne anomalije, kratak vrat, srčane greške, anomalije urotrakta, anomalije gornjih ekstremiteta, psihomotorna retardacija, zamjedbena gluhoća
WAGR	11p13	<u>W</u> ilms tumor, <u>A</u> niridija, <u>G</u> enitourinarna displazija, <u>R</u> etardacija
Jacobson	11q23.3	Tjelesno i duševno zaostajanje, kraniofacijalne anomalije, srčane greške, poremećaj mijelinizacije
Angelman	15q11-13	Hipotonija, mikrocefalija, hipopigmentacija, atakičan hod, epileptički napadaji, bezrazložan smijeh, mentalna retardacija
Prader-Willi	15q11-13	Hipotonija, hiperfagija, pretilost, niski rast, male šake i stopala, hipopigmentacija, mentalna retardacija
Smith-Magenis	17p11.23	Dismorfija, poremećaji ponašanja, autoagresivnost, periferna neuropatija, mentalna retardacija
Miller-Dieker	17p13.3	Lisencefalija I, dismorfija
Alagille sindrom	20p11.23-p12.2	Blaga dismorfija, kronična kolestaza, kardiovaskularne anomalije
Sindrom delecije 22q11	22q11	Dismorfija, kongenitalne srčane greške (konotrunkalne anomalije), rascjep nepca, hipoplazija timusa, hipokalcemija, blaga mentalna retardacija
Distalna 22q mikrolelecija	22q13-22qter	Hipotonija, nerazvijen govor, blaga dismorfija
Delecija Xp22.3	Xp22.3	X-vezana ihtioza, mentalna retardacija, epilepsija, očni albinizam, Kallmanov sindrom
Delecija Xp21	Xp21	Mišićna distrofija, kongenitalna adrenalna hipoplazija, mentalna retardacija
Delecija Y kromosoma	Yq13	Unilateralni kriptorhizam, infertilitet

se smatra bitnim u etiologiji Jacobsonovog sindroma (5).

Klinička manifestacija sindroma susjednih gena može, osim delecije, biti rezultat drugih tipova kromosomskih aberacija kao što su translokacije ili inverzije s mjestima loma u kritičnoj regiji (6, 7).

Pojedini mikrolelecijski sindromi uključuju gene čija je funkcionalna aktivnost ovisna o njihovom roditeljskom porijeklu. Poznato je da su pojedini geni ili skupine gena aktivni kada se nasljeđuju od jednog od roditelja, a inaktivni kada se nasljeđuju od drugog (7). Fenomen je poznat pod nazivom "genomic imprinting" ili genomski ili roditeljski upis. Genomski

upis je danas predmet mnogih ispitivanja. Poznato je da je različita ekspresija alela koji potječu od oca i od majke posljedica različite metilacije citozina. Intenzivna metilacija citozina uzrokuje inaktivaciju gena dok su aktivni geni nemetilirani (8). U genomu čovjeka je za sada poznat relativno mali broj gena koji podliježu ovom tipu regulacije. Geni su obično u skupinama, imaju specifičnu kromosomsku lokalizaciju i bogati su CG parovima baza. Proces metilacije citozina dešava se vjerojatno tijekom sazrijevanja spolnih stanica i različit je za muške i ženske gamete. Tako su pojedini geni metilirani u ženskim spolnim stanicama i stoga inaktivni, dok su isti geni u muškim spolnim stanicama nemetilirani

i stoga aktivni. Neophodno je imati na umu da je za gene koji podliježu ovom tipu genske regulacije svojstvena funkcijska monosomija uz strukturnu disomiju. Mehanizam genetskog upisa kao i mehanizmi kontrole nisu za sada dovoljno istraženi. Rezultati ispitivanja ukazuju da proces metilacije kontroliraju specifični geni u centrima za genomski upis. Prader-Willi i Angelman sindromi su posljedica genetskog upisa u regiji 15q11-13 (9). Fenotipsko očitovanje Prader-Willi i Angelman sindroma je rezultat gubitka aktivne kopije gena i stoga funkcijske nulisomije. Gubitak aktivne kopije gena može biti posljedica delecije segmenta koji sadrži aktivan alel, uniparentne disomije ili poremećaja genetskog upisa kao što je delecija ili

mutacije centra za genomski upis (10). Tako mikrolelekcija segmenta koji sadrži aktivan alel uzrokuje strukturnu monosomiju i funkcijsku nulisomiju i Prader-Willi ili Angelman sindrom. Uniparentna disomija je pojam kojim se označava da oba homologa jednog kromosomskog para potječu od jednog od roditelja (11). Uniparentna disomija je posljedica greške tijekom mejotičke diobe, formiranja trisomične zigote uz naknadni gubitak prekomjernog kromosoma. Gubitak homologa koji sadrži aktivan gen uspostavlja strukturnu disomiju i funkcijsku nulisomiju uz kliničku manifestaciju mikrolelecijskog sindroma. Kod poremećaja genomskog upisa kromosomi su biparentnog porijekla ali uniparentnog tipa DNA metilacije (12).

FENOTIP MIKROLELECIJSKIH SINDROMA

Većina mikrolelecijskih sindroma je posljedica gubitka kromosomskog segmenta i pridruženih genskih lokusa te je obično prisutna strukturna i funkcijska monosomija. Haploinsuficijencija uzrokuje smanjenu ukupnu količinu konačnog produkta zahvaćenog gena i ima štetne posljedice na funkcionalnu aktivnost stanice i tkiva.

Mikrolelecijski sindromi su heterogena skupina sindroma i predstavljaju prepoznatljive entitete sa specifičnom kliničkom prezentacijom. Fenotip je kod većine mikrolelecijskih sindroma posljedica poremećaja nekolicine gena, dok kod nekih može biti posljedica poremećaja, mutacije ili gubitka funkcije jednog gena uz autosomno dominantan način nasljeđivanja.

Tako, na primjer, Alagille sindrom može biti posljedica točkaste mutacije JAG1 gena, ali isto tako mikrolelekcije kratkog kraka kromosoma 20 uz gubitak čitavog JAG1 gena (13). Poznato je, također da su kliničke osobine Williamsovog, trihorinofalangealnog (Langer-Giedion) i Miller-Diekerovog sindroma posljedica gubitka skupine gena u specifičnom kromosomskom segmentu, a ne rezultat djelovanja pojedinog gena unutar zahvaćene kritične regije. Mikrolelekcija 7q11.23 uzrokuje Williamsov sindrom, gubitak gena za elastin, ali i gubitak određenog

broja susjednih gena. U kliničkoj slici dominiraju dismorfija, blaga mentalna retardacija, vaskularni poremećaji posebno stenoza velikih krvnih žila. Za razliku od mikrolelecijskog sindroma, izolirana delecija ili točkasta mutacija elastin gena očituje se izoliranom autosomno dominantnom supralvularnom stenozom aorte. Za razliku od spomenutih sindroma za sada nije poznato da li je fenotip Prader-Willi, Smith-Magenis ili sindroma delecije 22q11 posljedica gubitka jednog ili više gena.

KLINIČKE ZNAČAJKE MIKROLELECIJSKIH SINDROMA

Danas je poznato više od 20 mikrolelecijskih sindroma (Tablica 1.). Incidencija sindroma je veoma varijabilna. Pojedini su sindromi veoma rijetki, dok se drugi češće susreću u humanoj patologiji. Među češće mikrolelecijske sindrome ubrajaju se: Miller-Dieker, Smith Magenis, sindrom delecije 22q11.2, Prader-Willi, Angelman, i Williamsov sindrom.

Miller-Diekerov sindrom je rezultat mikrolelekcije 17p13.3. Kliničke značajke su lisencefalija tipa 1, teška mentalna retardacija, dismorfija, mikrocefalija i ponekad druge kongenitalne anomalije (13, 14). Miller-Diekerov sindrom je neophodno razlikovati od lisencefalije. Lisencefalija je posljedica delecije LIS1 gena, i nije udružena s dismorfijom i kongenitalnim anomalijama. Prevladava mišljenje da je fenotip Miller-Dieker sindroma posljedica mutacije drugih gena koji se nalaze u blizini LIS1 gena. Prema podacima iz literature deleciju je moguće otkriti metodama klasične citogenetike kod 50% bolesnika, dok je metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) moguće otkriti deleciju u čak 90% bolesnika s Miller-Dieker sindromom i kod 15-30% bolesnika s lisencefalijom (2, 14).

Smith-Magenisov sindrom je posljedica intersticijske delecije 17p11.2 i javlja se s incidencijom 1 na 25 000 poroda. Mikrolelekcija se povezuje s mentalnom retardacijom, dismorfijom, brahicefalijom, širokim korijenom nosa, lošije modeliranim usnama, a prisutne su i smetnje ponašanja, autoagresivnost i

poremećaj spavanja (15). Kritična regija obuhvaća segment DNA veličine 3.7 Mb. Dijagnoza Smith-Magenis sindroma se potvrđuje pomoću FISH metode uz primjenu komercijalne DNA probe.

Sindrom delecije 22q11.2 je najčešći mikrolelecijski sindrom s incidencijom od 1 na 4000 poroda. Sindrom karakterizira složen spektar anomalija organa koji se razvijaju iz trećeg i četvrtog škržnog luka. Mikrolelekcija del(22) (q11.2) se povezuje s nekoliko sindroma i to: DiGeorge sindrom, velokardiofacijalni sindrom, konotrunkalna anomalija-lice sindrom, Opitz/GBBB sindrom, Cayler sindrom, Kenny-Caffey sindrom (16). Klinička slika je veoma varijabilna. Srčane greške su česta pojava, uz hipokalcemiju, hipoplaziju timusa, rascjep nepca, poteškoće u učenju, dismorfiju, mikrocefaliju i imunodeficijenciju. Srčana greška (najčešće su konotrunkalne anomalije) otkrivena je kod 75% bolesnika, hipokalcemija kod 60%, anomalija bubrega kod 30% i rascjep nepca kod 9% pacijenta s dokazanom delecijom 22q11.2 (17). Veličina zahvaćenog segmenta je varijabilna. Kod većine bolesnika dokazana je delecija DNA segmenta veličine 3-Mb, a u manjem broju ispitanika delecija obuhvaća segment DNA veličine 1.5-Mb (18). Dijagnoza se u 90-95% bolesnika postavlja pomoću FISH metode uz upotrebu komercijalne DNA probe.

Prader-Willi sindrom se javlja s incidencijom od 1 na 10000-15000 novorođenčadi i posljedica je poremećaja regije 15q11-q13. U kliničkoj prezentaciji prisutni su hipotonija, hiperfagija, hipogonadizam, hipopigmentacija, mentalna retardacija i dismorfija (9, 10). Sindrom može biti posljedica delecije kromosoma očevog porijekla, uniparentne disomije uz gubitak očevog kromosoma, te rezultat poremećaja genomskog upisa. Tako je de novo delecija otkrivena kod 70% bolesnika, uniparentna disomija kod 25% ispitanika, a poremećaj genomskog upisa u manje od 5% bolesnika (9, 10). Kritična regija obuhvaća segment DNA veličine 4-Mb i brojne gene. Unatoč do sada provedenih ispitivanjima nije jasna povezanost funkcionalne aktivnosti

pojedinih gena i kliničkog očitovanja sindroma.

Angelmanov sindrom se prema danas prihvaćenim procjenama javlja u 1 / 15000 poroda. U kliničkoj slici prisutni su mikrocefalija, dismorfija, hipopigmentacija, hipotonija trupa uz hipertoniju i hiperrefleksiju udova, teška mentalna retardacija, nerazvijen govor, epilepsija uz specifične promjene elektroencefalograma, paroksizmi smijeha i poremećaji spavanja (10, 19). Genetika Angelmanovog sindroma je složena. Kod 65-75% bolesnika prisutna je de novo intersticijska delecija 15q11-13. Veličina deletiranog DNA segmenta iznosi oko 4 Mb. Poremećaj je majčinog porijekla, i otkriva se FISH metodom. Procjenjuje se da je uniparentna disomija uz gubitak kromosoma 15 majčinog porijekla prisutan u 3-7% ispitanika, poremećaj genetskog upisa u 3-9%, a točkasta mutacija UBE3A gena za ubikvitin ligazu 3A kod 4-6% bolesnika. Kod otprilike 10% bolesnika s kliničkom slikom Angelmanovog sindroma nije moguće odrediti mehanizam nastanka poremećaja genoma.

Williamsov sindrom se javlja s incidencijom od 1 na 10000-20000 novorođenčadi. Sindrom je posljedica mikrolelecije regije q11.23 kromosoma broj 7. Osnovne kliničke značajke su dismorfija, hiperkalcemija, kardiovaskularne mane (supravulvarna stenoza aorte, stenoza perifernih plućnih arterija, poremećaji građe valvule, atrijski septalni defekt, ventrikulski septalni defekt i dr.), anomalije bubrega, zaostajanje u tjelesnom i duševnom razvoju, poremećaji ponašanja (13). Identifikacija mikrolelecije 7q11.23 nije moguća metodama klasične citogenetike već se rutinski koristi FISH metoda ispitivanja.

DIJAGNOSTIČKE METODE

Većina mikrolelecijskih sindroma ima varijabilnu kliničku sliku te ih je ponekad teško prepoznati na temelju fenotipa. Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničkih obilježja i laboratorijske obrade. Laboratorijska obrada obuhvaća ispitivanje metodama klasične i molekularne citogenetike, a često se koriste složene metode

molekularne DNA analize. Svrha takvih ispitivanja jest precizno postavljanje dijagnoze i otkrivanje mehanizma nastanka poremećaja genoma, a kako bi se omogućilo odgovarajuće praćenje bolesnika i davanje genetičke informacije.

Klasična citogenetika

Analiza morfološkog izgleda kromosoma odigrala je važnu ulogu u otkrivanju kritičnih regija za mnoge danas poznate mikrolelecijske sindrome. Analiza je u mnogim slučajevima omogućila identifikaciju delecija ili identifikaciju mjesta lomova kromosoma u bolesnika s translokacijom ili inverzijom. Za analizu kromosoma rutinski se koristi kultura stanica periferne krvi uz metodu sinkronizacije stanica kojom je moguće ispitati kromosome slabijeg stupnja kontrahiranoosti te Q-, G- i R- metode pruga za preciznu identifikaciju specifičnih kromosomskih tipova (20-23). G- metoda pruga je naišla na široku primjenu u citogenetici i omogućuje identifikaciju pojedinih kromosoma na temelju raspreda svjetlije i tamnije obojenih regija uzduž krakova kromosoma. Metode pruga omogućuju sveobuhvatan uvid u promjene genoma i identifikaciju aberacija različitih kromosomskih tipova u jednoj stanici. Pomoću G-metode pruga moguće je otkriti poremećaje segmenata kromosoma veličine 5Mb (2). Aberacije koje zahvaćaju manje segmente DNA nije moguće sa sigurnošću otkriti metodama klasične citogenetike. Identifikaciju poremećaja otežava heteromorfizma kromosomskih segmenata, različita i varijabilna kondenzacija homologa.

Molekularna citogenetika

Metode molekularne citogenetike dale su značajan doprinos u ispitivanju i otkrivanju submikroskopskih poremećaja genoma kao što su poremećaji vezani za sindrome susjednih gena. Molekularna citogenetika obuhvaća danas širok spektar različitih metoda ispitivanja kao što je fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) za identifikaciju specifičnih dijelova genoma, multikolor FISH (SKY,

COBRA) za istovremenu identifikaciju svakog pojedinog kromosomskog tipa u genomu čovjeka, komparativna genomna hibridizacija (CGH) za otkrivanje viška ili manjka specifičnih kromosomskih segmenata i druge. Svaka od spomenutih metoda ima svojih prednosti i manjkavosti i korisno nadopunjuju rezultate ispitivanja dobivene metodama klasične citogenetike.

Fluorescentna in situ hibridizacija je metoda molekularne citogenetike koja sjedinjuje prednosti citogenetičkih i molekularnih metoda ispitivanja, a osniva se (kao i sve metode molekularne genetike) na hibridizaciji komplementarnih sekvenci nukleinskih kiselina (24). Razlikujemo dvije komponente i to: obilježene sekvence nukleinskih kiselina poznate kao probe (sonde) i homologne sekvence koje su predmet ispitivanja i nalaze se u interfaznim stanicama ili metafaznim kromosomima fiksirane na citogenetičkom preparatu. DNA sonde su obilježene fluorokromom i rezultati hibridizacije se analiziraju pomoću fluorescentnog mikroskopa. Prisutnost ili odsutnost fluorescentnog signala upotrijebljene DNA probe ukazuje na prisutnost ili odsutnost specifičnih DNA sekvenci u genomu pojedinih stanica.

FISH metodom se mogu identificirati različite sekvence DNA, a identifikacija ovisi o upotrijebljenoj DNA sondi (24). Danas se na raspolaganju citogenetičara nalaze različiti tipovi DNA sonde (25). Široku primjenu u dijagnostici našle su sonde za obilježavanje čitavih kromosoma, centromerične, subtelomerne i lokus specifične sonde (26). Centromerične sonde, su građene od ponavljajućih DNA sekvenci, najčešće α -satelitne DNA. Omogućuju identifikaciju centromeričnih regija pojedinih kromosomskih tipova metafaznih kromosoma i interfaznih stanica. Koriste se za procjenu numeričkih poremećaja pojedinih kromosomskih tipova i preciznu identifikaciju strukturnih aberacija. Sonde za obilježavanje čitavih kromosoma, su kromosom-specifične sonde koje otkrivaju eukromatske regije uzduž krakova pojedinih kromosomskih tipova. Sonde se koriste za ispitivanje metafaznih kromosoma, identifikaciju

kromosoma u složenim strukturnim poremećajima, analizu marker kromosoma, otkrivanje translokacija i duplikacija. Subtelomerne DNA sonde omogućuju identifikaciju subtelomernih regija svakog pojedinog kromosomskog tipa. Subtelomerne regije imaju važnu ulogu u etiologiji mentalne retardacije. To su regije bogate genima, a precizna analiza poremećaja nije moguća metodama klasične citogenetike. Danas se na raspolaganju nalaze FISH metode za probir subtelomernih regija i rutinski se koriste u dijagnostici bolesnika s mentalnom retardacijom nepoznate etiologije (27). Lokus-specifične sonde omogućuju detekciju jedinstvenih DNA nizova, te se koriste za identifikaciju specifičnih kromosomskih lokusa, submikroskopskih delecija i duplikacija metafaznih kromosoma i interfaznih stanica. FISH metoda je veoma osjetljiva i specifična, a identifikacija regije ovisi o upotrijebljenoj DNA sondi, dok se istovremeno ne mogu dobiti podaci o drugim dijelovima genoma. Metoda ne daje sveobuhvatan uvid u poremećaje genoma, te mnogi možda dijagnostički i prognostički važni poremećaji ostaju neidentificirani. Za analizu strukturnih kromosomskih poremećaja često je neophodno koristiti različite tipove DNA sonde, a kako bi se precizno identificirao aberantan kromosom, mjesta lomova i ustanovio mehanizam njegova nastanka (28, 29). FISH metoda nije ovisna o proliferativnoj aktivnosti stanica, već je identifikacija specifičnih segmenata genoma moguća u interfaznim stanicama. Ispitivanjem je stoga moguće obuhvatiti veći broj stanica te se metoda koristi za ispitivanje i procjenu mozaicizma.

U dijagnostici mikrodelecijskih sindroma koristi se FISH metoda i lokus specifične DNA sonde. To je ciljana analiza poremećaja specifične regije genoma čije postojanje se pretpostavlja na temelju kliničkih pokazatelja. Danas se u razvijenim svjetskim centrima pa tako i u nas u dijagnostici čestih mikrodelecijskih sindroma koriste komercijalne DNA sonde (26, 30). Komercijalne sonde se sastoje od dvije lokus specifične DNA sonde, obilježene različitim fluorokromom od kojih jedna omogućuje identifikaciju kritične regije određenog mikrodelecijskog sindroma, a



Slika 1.
Parcijalna metafaza nakon hibridizacije s DNA probom (TUPLE1) za identifikaciju delecije 22q11.2. Odstustvo crvenog signala u proksimalnom segmentu dugog kraka kromosoma 22 ukazuje na deleciju lokusa (strelica).

Figure 1
Partial metaphase hybridized with DNA probe (TUPLE1) that identifies deletion 22q11.2. Absence of proximal red signal on one of the chromosome 22 indicate the deletion of the locus.

druga predstavlja kontrolnu sondu za identifikaciju kromosomskog tipa. Uredan nalaz je popraćen identifikacijom 4 signala od toga su dva kontrolna i dva signala identificiraju kritičnu regiju na oba homologa, dok prisutnost jednog signal za kritičnu regiju ukazuje na mikrodeleciju (Slika 1.).

Premda je klinička slika pojedinih mikrodelecijskih sindroma specifična, prisutna je značajna fenotipska varijabilnost. Poznato je da pojedini klinički simptomi nisu izraženi u ranoj životnoj dobi ili mogu biti nespecifični što otežava postavljanje dijagnoze i pravilno usmjeravanje dijagnostičke obrade. U takvim se slučajevima dijagnostička obrada pacijenta produžuje i upotpunjuje dodatnim laboratorijskim testovima. Usavršena je, stoga višebojna FISH metoda probira koja omogućuje simultanu detekciju većeg broja kromosomskih regija odgovornih za pojavu mikrodelecijskih sindroma (31). Budući da se ne radi o komercijalnom multilokusnom testu za mikrodelecijske

sindrome primjena je u nas povezana s brojnim tehničkim problemima. Istražili smo, stoga, mogućnost simultane upotrebe 6 različitih komercijalnih DNA sonde za mikrodelecijske sindrome u jednoj hibridizaciji. Pilot ispitivanje je dalo zadovoljavajuće rezultate i potvrdilo mogućnost probira, uz simultanu analizu 6 različitih kritičnih regija i detekciju mikrodelecije (32). Kombinacija komercijalnih sonde može biti različita i omogućiti istovremeno ispitivanje mikrodelecija koje predstavljaju diferencijalno dijagnostički problem i time omogućiti bržu i efikasniju dijagnostičku obradu bolesnika.

Za probir mikrodelecija može se koristiti metoda komparativne genomske hibridizacije. CGH metoda se zasniva na kohibridizaciji ispitne i kontrolne DNA (koje su prethodno obilježene različitim fluorescentnim bojama) za normalnu metafazu (33). Dinamika hibridizacije ovisi o kvantitativnim razlikama između dva DNA uzorka. Segmenti genoma koji su u ispitnoj DNA prisutni u većem

broju kopija u odnosu na normalu, intenzivnije će se hibridizirati za odgovarajuću regiju metafaznog kromosoma u odnosu na kontrolnu DNA i obrnuto. Normalna metafaza služi, stoga kao sredstvo za identifikaciju regija koje su vezale ispitnu odnosno kontrolnu DNA od onih koje su jednakom dinamikom vezale obje DNA. Rezultat hibridizacije se obrađuje pomoću kompjutorskog programa i prikazuje kao omjer hibridizacije ispitne i kontrolne DNA uzduž krakova svakog pojedinog kromosomskog tipa. Na ovaj je način moguć probir čitavog genoma stanice i identifikacija duplikacija ili delecija specifične kromosomske regija. Osjetljivost klasične CGH metode je mala i omogućuje detekciju poremećaja veličine od 5-10 Mb, a to je osjetljivost analize metafaznih kromosoma. Nedavno su usavršene metode obrade rezultata hibridizacije koje omogućuju detekciju poremećaja veličine 3Mb (34). CGH metoda visoke osjetljivosti uspješno je upotrijebljena u dijagnostici mikrolelecijskih sindroma i pruža mogućnost probira intersticijskih mikroleleccija ili mikroduplikacija (35).

Poznato je da se u dijagnostici čestih mikrolelecijskih sindroma koristi FISH metoda i komercijalne DNA sonde, međutim za mnoge mikrolelecijske sindrome danas nisu raspoložive komercijalne DNA sonde te se traže alternativna rješenja kao što je PRINS (PRImed IN-Situ labeling) metoda. Metodu je prvi opisao Koch i sur. 1989. godine (36). Ona sjedinjuje principe PCR (lančana reakcija polimerazom) i FISH metode, a to znači mogućnost citološke lokalizacije specifičnog segmenta DNA umnoženog pomoću in situ PCR tehnike. Umjesto DNA sonde koriste se lokus specifične oligonukleotidne klince koje se hibridiziraju za komplementarne sekvence ispitne DNA (metafazni kromosomi fiksirani na citogenetičkom preparatu) i amplificiraju in situ uz pomoću obilježenih nukleotida i DNA polimeraze. Ispitna DNA služi kao kalup, a obilježeni nukleotidi kao supstrat za DNA polimerazu. Rezultati se analiziraju pomoću fluorescentnog mikroskopa. PRINS metoda ima široku primjenu i omogućuje identifikaciju centromera, telomera, marker kromosoma i pojedinih gena (37).

Metoda je upotrijebljena za otkrivanje mikroleleccije kod bolesnika s Prader-Willi, DiGeorge i WAGR sindromom (38,39).

Metode molekularne genetike

Prader Willi i Angelmanov sindrom mogu biti posljedica mikroleleccije, uniparentne disomije ili poremećaja centra za genomski upis. U dijagnostici ovih sindroma značajnu ulogu imaju metode molekularne genetike za dokazivanje gubitka aktivnih lokusa u proksimalnom segmentu dugog kraka kromosoma 15. Kritične regije koje potječu od oca i majke se, zbog genomskog upisa, međusobno razlikuju na temelju razlika u metilaciji pojedinih lokusa kao što je primjer SNRPN gen (40). SNRPN gen se nalazi u kritičnoj regiji za Prader-Willi sindrom na kromosomu 15q11-q13, ima 10 eksona od kojih je prvi bogat različito metiliranim CG dinukleotidima. Funkcijski inaktivan alel je metiliran i majčinog porijekla dok je funkcijski aktivan alel nemetiliran i očevog porijekla. Testovi za ispitivanje metilacije koriste specifične restriksijske enzime za cijepanje DNA koji prepoznaju metilirana od nemetiliranih restriksijskih mjesta stvarajući pritom fragmente različitih veličina koje je moguće otkriti Southern blot metodom (41). Kod zdrave osobe detektirati će se dva fragmenta. Jedan fragment odgovara majčinom, nefunkcionalnom i metiliranom alelu, dok drugi fragment DNA nastaje kao posljedica djelovanja enzima na nemetiliranim restriksijskim mjestima u očevom aktivnom alelu. Kod pacijenata s Prader-Willi sindroma i mikroleleccijom ili majčinom uniparentnom disomijom ili poremećajem genomskog upisa detektira se samo metiliran fragment DNA dok će drugi fragment nedostajati. Kod bolesnika s Angelmanovim sindromom i mikroleleccijom ili očevom uniparentnom disomijom ili poremećajem genomskog upisa biti će detektiran samo nemetiliran fragment, dok će dugi nedostajati. Smatra se da je ispitivanje metilacije pouzdan dijagnostički test kojim se može postaviti dijagnoza u otprilike 95% bolesnika s Prader-Willi sindromom i u otprilike 80% bolesnika s

Angelmanovim sindromom. Kada je nalaz testa pozitivan, analizu je neophodno nadopuniti citogenetičkim ispitivanjem i /ili ispitivanjem DNA polimorfizma, a kako bi se razlikovale delecije od uniparentne disomije. Pored Southern blot metode danas su usavršene PCR metode za ispitivanje metilacije pojedinih genskih lokusa (42, 43).

Dijagnoza sindroma delecije 22q11.2 se kod većine bolesnika postavlja pomoću FISH metodom uz upotrebu komercijalnih DNA sonda. Kod 10% bolesnika s uvjerljivom kliničkom slikom, delecija zahvaća znatno manji segment DNA. Poremećaj nije, stoga moguće otkriti rutinskom FISH metodom već su neophodne molekulske metode ispitivanja DNA (44).

Iz ovog kratkog pregleda je očito da se, za postavljanje dijagnoze mikrolelecijskih sindroma, pored kliničkih ispitivanja, koriste različite metode analize genoma kao klasične metode pruga za analizu kromosoma, FISH i molekularne metode ispitivanje. Metode se međusobno ne isključuju već se korisno nadopunjuju i omogućuju precizniji uvid u poremećaje genoma bolesnika s mikrolelecijskim sindromima.

LITERATURA

- Schmickel RD. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. *J Pediatr* 1986; 109: 231.
- Dallapiccola B, Mingarelli R, Novelli G. The link between cytogenetics and mendelism. *Biomed & Pharmacother* 1995; 49: 83-93.
- Chen KS, Manian P, Koeuth T et al. Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat genet* 1997; 17: 154-63.
- Shaw CJ, Bi W, Lupski RJ. Genetic proof of unequal meiotic crossover in reciprocal deletion and duplication of 17p11.2. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1072-81.
- Jones C, Slijepcevic P, Marsh S, Baker E, Langdon WY, Richards RI, Tunnacliffe A. Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2123-30.
- Bartsch O, Nemeckova M, Kocarek E, Wagner A, Puchmajerova A, Poppe M et al. DiGeorge/velocardiofacial syndrome: FISH studies of chromosome 22q11 and 10p14,

- and clinical reports on the proximal 22q11 deletion. Am J Med Genet 2003; 117A: 1-5.
7. Niikawa N. Genomic imprinting and its relevance to genetic diseases. Jpn J Hum Genet 1996; 41: 351-61.
8. Feil R, Khosla S. Genomic imprinting in mammals an interplay between chromatin and DNA methylation? TIG 1999; 15: 431-5.
9. Cassidy SB, Dykens E, Williams C. Prader-Willi and Angelman syndromes: Sister imprinted disorders. Am J Hum Genet 2000; 97: 136-46.
10. Vogels A, Fryns PJ. The Prader-Willi syndrome and the Angelman Syndrome. Genetic Counsel 2002; 13: 385-96.
11. Cassidy SB. Uniparental disomy and genomic imprinting as causes of human genetic disease. Environmental Mol Mutat 1995; 25:13-20.
12. Horsthemke B, Dittrich BN, Buiting K. Imprinting mutation on chromosome 15. Hum Mutat 1997; 10: 329-37.
13. Shapira SK. An update on chromosome deletion and microdeletion syndromes. Current Opinion in Pediatrics 1998; 10: 622-7.
14. Kohler A, Hain J, Muller U. Clinical and molecular genetic findings in five patients with Miller-Dieker syndrome. Clin Genet 1995; 47: 161-4.
15. Smith ACm McGavran L, Robinson J et al. Interstitial deletion of (17) (p11.2 p11.2) in nine patients. Am J Med genet 1986; 24: 393-414.
16. Schinzel A: Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. New York: WdeG., 2nd ed. 2001; 846.
17. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletion: a European collaborative study. J Med Genet 1997; 34: 798-4.
18. McDermid HE, Morrow BE. Genomic disorder on 22q11. Am J Hum Genet 2002; 70: 1077-88.
19. Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J et al. Neurogenetics '99: Genetics of Angelman syndrome. Am J Hum Genet 1999; 65: 1-6.
20. Yunis JJ, Lewandowski RC. High-resolution cytogenetics. Birth Defects 1983; 19: 11-37.
21. Caspersson T, Zech L, Johanson C: Analysis of human metaphase chromosomes by aid of DNA binding fluorescent agents. Exp Cell Res 1970; 49: 219-22.
22. Seabright M: A rapid banding technique for human chromosome. Lancet 1971; 2: 971.
23. Latt SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 1973;70: 3395-9.
24. Pergament E: New molecular techniques for chromosome analysis. Ballieres Clinical Obstetrics and Gynecology 2000;14: 677-90.
25. Kearney L. molecular cytogenetics. Best Practice & Research Clinical Haematology 2001;14: 645-68.
26. Petković I, Barišić I. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) in clinical genetics. Paediatr Croat 2001; 45: 175-8.
27. Petković I, Barišić I. Evaluation of subtelomeric chromosome regions using multicolour FISH assay. Paediatr Croat 2003; 47: 1-4.
28. Petković I, Barišić I, Bago R. Cytogenetic evaluation, fluorescence in situ hybridization, and molecular study of psu idic(X) (pter→q22.3::q22.3→pter) chromosome aberrations in a girl with moderate growth retardation. Croat Med J 2003; 44: 494-9.
29. Petković I, Barišić I, Bastić M, Hečimović S, Bago R. Paternal origin of der(X) t(X;6) in a girl with trisomy 6p and unbalanced t(6;10) mosaicism in her mother. Am J Med Genet 2003; 120: 266-71.
30. Petković I, Barišić I, Morožin L. Diagnosis of microdeletion syndromes using the FISH method in Croatia. Ann Genet 2003; 46: 255.
31. Ligon AZ, Beaudet AL, Shaffer GL. Simultaneous, multilocus FISH analysis for detection of microdeletion in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. Am J Hum Genet 1997; 61: 51-9.
32. Petković I. Barišić I. Metoda probira mikrolelekcija. Paediatr Croat (u tisku).
33. duManoir S, Speicher MR, Joos S et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Hum Genet 1993; 90: 590.
34. Kirchhoff M, Gerde T, Rose H et al. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. Cytometry 1998; 31: 163-73.
35. Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M et al. High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced karyotypes. Eur J Hum Genet 2000; 8: 661-8.
36. Koch J, Kolvræ S, Petersen KB, Gregersen M, Bolund L. Oligonucleotide-priming method for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA in situ. Chromosoma 1989; 98: 259-65.
37. Satinover DI, Schwartz S. Clinical application of PRINS. Am J Med Genet 2002; 107: 95-6.
38. Tharapel AT, Kadandale JS, Martens PR, Wachtel SS, Sid Wilory R. Prader-Willi/Angelman and DiGeorge/velocardiofacial syndromes deletions: diagnosis by primed in situ labeling (PRINS). Am J Med Genet 2002; 107: 119-22.
39. Coullin P, Roy L, Pellestor F, Candelier JJ, Bed-Hom B et al. PRINS, the other in situ DNA labeling method useful in cellular biology. Am J Med Genet 2002; 107: 127-35.
40. Glenn CC, Nicholls RD, Saitoh S, Niikawa N, Robinson WP, Schinzel A et al. Modification of 15q11-q13 methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. Hum Mol Genet 1993; 2: 1377-82.
41. Glenn CC, Saitoh S, Jong MTC, Filbrandt MM, Surti U et al. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. Am J Hum Genet 1996; 58: 335-46.
42. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet 1997; 5: 94-8.
43. Runte m, Farber C, Lich C Zeschnigk M, Buchholz T, Smith A et al. Comprehensive methylation analysis in typical and atypical PWS and AS patients with normal biparental chromosomes 15. Eur J Hum Genet 2001;9:519-26.
44. Yamagishi H, Garg V, Matsuoka R, Thomas T, Srivastava D. A molecular pathway revealing a genetic bases for human cardiac and craniofacial defects. Science 1999; 283: 1158-61.

Summary

MOLECULAR CYTOGENETICS IN THE DIAGNOSIS OF MICRODELETION SYNDROMES

I. Petković

This review summarizes the data on microdeletion syndromes, molecular mechanisms of origin, involved genomic unbalances with special attention to the diagnostic value of cytogenetic and molecular investigations. In addition, the description of various types of conventional cytogenetic, fluorescent in situ hybridization, and molecular diagnostic methods are described.

Descriptors: MICRODELETION SYNDROMES, CYTOGENETICS, FISH