



Pregled | Review

Genomski dijagnostički algoritmi u obiteljima s djecom s neurorazvojnim poremećajima

Genomic diagnostic algorithms in families with neurodevelopmental disorders

Feodora Stipoljev^{1,2}, Maja Oroz¹ , Ana Vičić^{1,3}

¹ Odjel za laboratorijsku citogenetiku, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica "Sveti Duh", Zagreb

² Medicinski fakultet, Josip Juraj Strossmayer Sveučilište u Osijeku, Osijek

³ Zdravstveno veleučilište Zagreb, Zagreb

Ključne riječi

NEURORAZVOJNI POREMEĆAJI; ACGH;
CJEOLEKSOMSKO SEKVENCIRANJE;
CJEOLEKSOMSKO SEKVENCIRANJE

Key words

NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS; ACGH;
WHOLE EXOME SEQUENCING;
WHOLE GENOME SEQUENCING

SAŽETAK. Genetska testiranja kod pacijenata s neurorazvojnim poremećajima vrlo su važna za postavljanje konačne dijagnoze. Prema trenutnim smjernicama prve metode izbora uključuju komparativnu genomsku hibridizaciju na mikropostroju te genetsko testiranje fragilnog X sindroma. Cjeloeksomsko sekvenciranje koje omogućuje detekciju jednonukleotidnih varijanti u kodirajućim regijama gena predstavlja sljedeći dijagnostički korak. Dijagnostički prinos komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju raste do 15%, a cjeloeksomskog sekvenciranja čak do 40%. Međutim, kod velikog broja pacijenata (čak do 50%) etiologija neurorazvojnih poremećaja ostaje nerazjašnjena. Danas su poznati mnogi genetski mehanizmi koje nije moguće ustanoviti rutinskim dijagnostičkim metodama, a uključuju varijante broja kopija u nekodirajućim regulacijskim DNA regijama, varijante broja kopija koje utječu na strukturu i funkciju topoloških domena, duboke intronske varijante u kodirajućim genima kao i metilacijske obrasce u genomu. Navedene genske promjene moguće je detektirati novijim tehnologijama kao što je cjelogenomsko sekvenciranje i mapiranje topoloških domena (Hi-C sekvenciranje). Cjelogenomskim sekvenciranjem moguće je odrediti i precizne točke loma u naoko balansiranim kromosomskim razmještanjima. Uvođenje cjelogenomskog sekvenciranja u rutinsku dijagnostiku genetskih bolesti svakako bi povećalo dijagnostički prinos i omogućilo postavljanje dijagnoze za velik broj pacijenata s neurorazvojnim poremećajima. S napredovanjem tehnologije i sve većom dostupnošću cjelogenomskog sekvenciranja, u skorju budućnosti se očekuje povećanje genomskih baza koje bi omogućile interpretaciju velike količine podataka koju ova metoda generira, čime bi se ubrzalo uvođenje ove moćne metode u rutinsku medicinsku skrb kod pacijenata s genetskim poremećajima.

SUMMARY. Genetic testing in patients with neurodevelopmental disorders is very important for making a final diagnosis. According to the current guidelines, the first line methods include Microarray-based Comparative Genomic Hybridization and genetic testing of Fragile X Syndrome. Whole-exome sequencing, which allows detection of single-nucleotide variants in the coding regions of genes, represents the next diagnostic step. The diagnostic yield of Comparative Genomic Hybridization is up to 15%, while for whole-exome sequencing it increases up to 40%. However, in a large number of patients (up to 50%), the etiology of neurodevelopmental disorders remains unexplained. Even though there are many familiar genetic mechanisms, some of them cannot be established by routine diagnostic methods, such as copy number variants in non-coding regulatory DNA regions, copy number variants that affect structure and function of topologically associating domains (TADs), deep intronic variants in coding genes as well as genome-wide methylation patterns. The aforementioned genetic changes can be detected with newer technologies such as whole-genome sequencing and mapping of TADs (Hi-C sequencing). With whole-genome sequencing it is possible to determine precise breakpoints in apparently balanced chromosomal arrangements. Therefore introduction of whole-genome sequencing in the routine diagnostics of genetic diseases would certainly increase the diagnostic yield and enable setting up diagnosis for a large number of patients with neurodevelopmental disorders. With the advancement of technology and the increasing availability of whole-genome sequencing, a rise in the amount of available data in genomic databases is expected in the near future. This would allow the interpretation of the large amount of data generated by this method and accelerate the introduction of this powerful method into routine medical care for patients with genetic disorders.

Neurorazvojni poremećaji (NRP) obuhvaćaju širok spektar poteškoća koje se javljaju tijekom razvojnog razdoblja, a odnose se na značajna odstupanja u postizanju i izvršavanju određenih intelektualnih, motoričkih, jezičnih i/ili socijalnih funkcija. Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti Svjetske zdravstvene orga-

✉ Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Maja Oroz, <https://orcid.org/0000-0003-0639-7320>
Odjel za laboratorijsku citogenetiku, Klinika za ginekologiju i porodništvo,
Klinička bolnica "Sveti Duh", Ul. Sv. Duh 64, 10000 Zagreb,
e-pošta: majatrupkovic@gmail.com

nizacije, koja je na snagu stupila 2022. godine, skupina NRP uključuje osam specifičnih kategorija: poremećaje intelektualnog razvoja, razvojne poremećaje govora ili jezika, poremećaje iz spektra autizma (PSA), razvojne poremećaje učenja, razvojne poremećaje motoričke koordinacije, poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (ADHD, engl. *attention deficit hyperactivity disorder*), poremećaj sa stereotipnim pokretima te kategoriju drugih specifičnih neurorazvojnih poremećaja.¹ Genetska analiza u pacijenata s neurorazvojnim poremećajima od iznimne je važnosti za postavljanje konačne dijagnoze, određivanje prognoze i daljnje medicinske skrbi za pacijenta, ali također i savjetovanje obitelji u vidu određivanja rizika ponavljanja utvrđene genetske promjene. Stoga genetsko testiranje danas predstavlja standardnu proceduru prilikom obrade pacijenata s NRP-om i neobjašnjenom etiologijom bolesti. Uzimajući u obzir kompleksnost kako kliničke slike tako i genetičke osnove neurorazvojnih poremećaja, određivanje genetskog uzroka bolesti još uvijek predstavlja izazov. Genetičke promjene koje nalazimo u pacijenata s NRP-om uključuju heterogenu skupinu promjena u genomu kao što su brojčane i strukturne abnormalnosti kromosoma, promjene broja kopija (CNV, engl. *copy number variants*), promjene jednog nukleotida (SNV, engl. *single nucleotide variants*), male delecije ili duplikacije (INDEL), strukturne varijante (SV) te mozaicizmi. Ovisno o utjecaju na nastanak bolesti pronađene mutacije klasificiraju se kao patogene, vjerojatno patogene, varijante nepoznatog značenja (VUS, engl. *variant of uncertain significance*), vjerojatno benigne ili benigne. U slučaju pojave novih dokaza o patogenosti ili benignosti interpretacija varijanti nepoznatog značenja može se nakon određenog vremena promijeniti.

Prednosti i ograničenja dijagnostičkih metoda

Danas se u dijagnostici NRP-a primjenjuju različite metode molekularne dijagnostike, pri čemu su najzastupljenije metoda kromosomskih mikropostroja (CMA, engl. *chromosomal microarray*), najčešće komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (aCGH, engl. *array comparative genomic hybridization*) i metode sekvenciranja novih generacija (NGS, engl. *next generation sequencing*) uključujući cjeloekzomsko sekvenciranje (WES, engl. *whole exome sequencing*), često uz primjenu analize genskih panela, i cjelogenomsko sekvenciranje (WGS, engl. *whole genome sequencing*). Prema smjernicama za genetičko testiranje u pacijenata s poremećajima intelektualnoga i globalnoga razvojnog zaostajanja, višestrukim prirođenim anomalijama te osoba s poremećajem iz spektra autizma kao prva metoda izbora još uvijek se preporučuje aCGH analiza te dijagnostika sindroma fragilnog X-kromosoma određivanjem broja ponavljanja

tripleta CGG u nekodirajućoj regiji prvog eksona gena *FMR1*.^{2–4} Metodom kromosomskih mikropostroja promjene broja kopija utvrde se u oko 10 – 20% pacijenata s intelektualnim/globalnim razvojnim zaostajanjem i PSA-om.^{3,5} Međutim, novija istraživanja prednost daju metodama sekvenciranja nove generacije kojima se genetski uzrok NRP-a utvrdi u gotovo 30 – 40% pacijenata.^{6–8} Primjenom navedenih dijagnostičkih metoda i provođenjem velikih kohortnih studija posljednjih dvadeset godina konstantno se otkrivaju novi kandidatni geni i genomske promjene odgovorne za nastanak NRP-a. Prednosti i ograničenja navedenih metoda opisane su u tablici 1.

Komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju

Metoda aCGH temelji se na kompetitivnom vezanju fluorescentno obilježene ispitivane i referentne DNA s komplementarnim oligonukleotidnim sondama smještenim na mikropostroju. Analizira se cijeli genom, dok je rezolucija metode određena udaljenošću između lokacija na genomu kojima odgovaraju konstruirane oligonukleotidne sonde. Ovisno o dizajnu mikropostroja, metodom aCGH moguće je detektirati aneuploidije, delecije i duplikacije, odnosno promjene broja kopija (CNV) veće od 50 do 200 kilobaza (kb). No, ovom metodom ne mogu se utvrditi balansirana strukturna razmještanja, povećanje broja ponavljanja tripleta, mutacije u mitohondrijskoj DNA, epigenetičke promjene te mozaicizmi s udjelom abnormalnih stanica manjim od 10 – 30%.⁹ Prilikom interpretacije rezultata dijagnostičke dileme odnose se na nalaze varijanti nepoznatog značenja. Također u obzir treba uzeti mogućnost slučajnih nalaza, npr. CNV-ova povezanih s predispozicijom za onkološke bolesti koji se nalaze u otprilike 0,2% analiza¹⁰ ili CNV-ova regija povezanih s neplodnošću. Prednost aCGH analize u usporedbi s metodama sekvenciranja odnosi se na široku dostupnost metode u kliničkim laboratorijima te znatno jednostavniju i bržu interpretaciju rezultata uslijed detekcije malog broja varijanti koje je potrebno klasificirati. Iako se aCGH smatra metodom izbora u dijagnostici NRP-a, uzimajući u obzir kliničku sliku pacijenta, obiteljsku anamnezu te rezultate aCGH-analize dodatni dijagnostički testovi preporučuju se u svrhu utvrđivanja drugih genetičkih promjena ili razjašnjenja dobivenih nalaza. Klasična citogenetska analiza i/ili fluorescentna hibridizacija *in situ* (FISH, engl. *fluorescence in situ hybridization*) preporučuje se kod pacijenata s prisutnim fenotipskim obilježjima kromosomskih sindroma, obiteljskom poviješću balansiranih ili nebalansiranih kromosomskih razmještanja te obiteljskom anamnezom opterećenom višestrukim uzastopnim pobačajima. Kod pacijenata s intelektualnim/globalnim razvojnim zaostajanjem i PSA-om te urednim nalazom aCGH analize, provodi se testiranje

TABLICA 1. PREDNOSTI I OGRANIČENJA RAZLIČITIH GENOMSKIH METODA U DIJAGNOSTICI NEURORAZVOJNIH POREMEĆAJA
 TABLE 1. ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF GENOMIC TECHNIQUES USED IN NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS DIAGNOSTICS

Vrsta dijagnostičkog testa / Diagnostic technique	Dijagnostički doprinos / Diagnostic yield	Prednosti / Advantages	Ograničenja / Limitations
Komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (aCGH) / Array Comparative Genomic Hybridization	15–20%	<ul style="list-style-type: none"> – Detekcija CNV-ova / CNV detection – Relativno jednostavna interpretacija nalaza / Fast results interpretation 	<ul style="list-style-type: none"> – Niska rezolucija / Low resolution – Nemogućnost detekcije SNV-ova / Inability of SNV detection – Nemogućnost detekcije balansiranih kromosomskih razmještanja / Inability of balanced chromosomal rearrangements detection
Testiranje broja ponavljanja CGG tripleta FMR1 / FMR1 CGG Repeat Analysis	1–2%	<ul style="list-style-type: none"> – Jednostavna, brza i jeftina metoda / Simple, fast and low-cost method 	<ul style="list-style-type: none"> – Nemogućnost detekcije drugih mutacije u FMR1 ili drugim genima / Unable to detect other mutations in FMR1 or other genes
Genski paneli / Gene panels	20%	<ul style="list-style-type: none"> – Precizna detekcija SNV i INDEL / Precise SNV and INDEL detection – Manja vjerojatnost nalaza VUS / Reduced number of potential VUS – Brža i jednostavnija interpretacija nalaza u usporedbi s metodom WES / Faster and simpler result interpretation in comparison to WES 	<ul style="list-style-type: none"> – Ograničena analiza na ciljne gene / Analysis restricted to specific genes
Cjeloeksomsko sekvenciranje (WES) / Whole Exome Sequencing	25–35%	<ul style="list-style-type: none"> – Istovremena, masivna analiza svih kodirajućih regija/gena / Massively parallel sequencing of coding regions/genes – Visoka razlučivost / High resolution 	<ul style="list-style-type: none"> – Ograničenje na kodirajuće regije / Restriction to coding regions – Ograničena analiza CNV-ova / Limited analysis of CNVs
Cjelogenomsko sekvenciranje (WGS) / Whole Genome Sequencing	30–40%	<ul style="list-style-type: none"> – Analiza kodirajućih i nekodirajućih/intronskih regija / Parallel analysis of coding and non-coding/intronic sequences – Detekcija CNV-ova / CNV detection – Precizna analiza balansiranih strukturnih razmještanja / Detailed analysis of balanced structural rearrangements 	<ul style="list-style-type: none"> – Iznimno kompleksna i dugotrajna interpretacija rezultata / Time consuming and complex result interpretation – Visoka cijena / High-priced

CNV – promjene broja kopija / *Copy Number Variants*; INDEL – male delecije ili duplikacije / *insertion/deletion polymorphism*; SNV – promjene jednog nukleotida / *Single Nucleotide Variants*; VUS – varijanta nepoznatog značenja / *Variant of uncertain significance*

broja ponavljanja CGG tripleta *FMR1*. Pune mutacije *FMR1* nalaze se u oko 1% ženskih i oko 2% muških pacijenata s intelektualnim/globalnim zaostajanjem¹¹, te u otprilike 0,23–1,2% osoba s poremećajem iz spektra autizma.¹² U pacijenata sa sumnjom na genske poremećaje preporuča se cjeloeksomsko ili cjelogenomsko sekvenciranje.

Primjenom metode SNP-mikropostroja (engl. *single nucleotide polymorphism array*) moguće je utvrditi i gubitak heterozigotnosti (LOH, engl. *loss of heterozygosity*), uniparentalnu disomiju (UPD) i triploidiju. Uniparentalna disomija kao posljedica promijenjenoga genomskog utiska kod određenih kromosoma jedan je od uzroka sindroma kao što su Silver-Russellov sindrom (majčinski UPD 7), Prader-Willyjev sindrom (majčinski UPD 15), Angelmanov sindrom (očinski UPD 15) ili Beckwith-Wiedemannov sindrom (očinski UPD 11). Gubitak heterozigotnosti može upućivati i na konsangvinitet roditelja te izražavanje recesivnih svojstava.

Metode sekvenciranja

Razvojem metoda sekvenciranja novih generacija ili masivnoga paralelnog sekvenciranja te njihovom širom primjenom i nižim cijenama, cjeloeksomsko i cjelogenomsko sekvenciranje te analiza genskih panela postaju dostupni za dijagnostičko testiranje NRP-a. Metodom cjeloeksomskog sekvenciranja analiziraju se protein-kodirajuće regije koje obuhvaćaju otprilike 1,5 – 2% čitavog genoma, dok je najveći udio genskih bolesti uzrokovan upravo mutacijama u kodirajućim sekvencama. Promjene u genomu koje se mogu detektirati ovom metodom uključuju jednonukleotidne varijante (SNV) i manje promjene u slijedu nukleotida veličine do 50 parova baza. Ovom metodom ne mogu se sa sigurnošću utvrditi promjene broja kopija (CNV).¹³ Kao i kod aCGH analize najveći problem u interpretaciji predstavlja nalaz varijanti koje je potrebno klasificirati, no kod WES analize radi se o puno većem broju detektiranih varijanti. Unatoč sve potpunijim podacima dostupnim u bazama podataka, u

slučaju nalaza VUS-a uz analizu uzorka pacijenta preporučuje se i obrada roditelja („trio analiza“). Najvažnija prednost metode WES je masivna, paralelna analiza velikog broja gena od interesa s razlučivošću od jednog nukleotida, dok se nedostaci odnose na ograničenje samo na kodirajuće regije i 5'–3' UTR regije gena te nemogućnost utvrđivanja mozaicizama, epigenetičkih promjena, mitohondrijskih varijanti i ograničenu detekciju CNV-ova.¹⁴ U obzir treba uzeti i činjenicu da ovisno o korištenoj platformi može varirati pokrivenost kodirajućih regija, odnosno da se metodom WES ne moraju otkriti sve mutacije u eksomu.

Pored metode WES u dijagnostici NRP-a provodi se i sekvenciranje određenog gena te genski paneli s odabranim ciljnim genima. U usporedbi s cjeloexomskim sekvenciranjem ciljane analize gena genski paneli omogućuju bolju pokrivenost i dubinu čitanja te precizniju detekciju INDEL mutacija i analizu duplikacija/delecija. Analiza ciljanih gena olakšava i ubrzava analizu uslijed manjeg broja varijanti koje je potrebno klasificirati te smanjuje mogućnost nalaza slučajnih varijanti nepoznatog značenja. No, s druge strane analizom izabranih gena smanjuje se dijagnostički doprinos testa, prema nekim istraživanjima i do otprilike 10% u usporedbi s cjeloexomskim sekvenciranjem.¹⁵

Cjelogenomsko sekvenciranje (WGS) uključuje fragmentiranje i sekvenciranje cijelog genoma bez prethodnog odabira specifičnih sekvenci DNA, analizirajući pri tom genetske varijante kodirajućih, ali i intronskih i nekodirajućih regija. S obzirom na široku pokrivenost, u usporedbi s WES metodom, WGS ima veću osjetljivost te ujednačenu pokrivenost genoma. Cjelogenomsko sekvenciranje omogućava i detekciju strukturnih varijanti (SV) koje predstavljaju promjene u genomu veće od 50 parova baza. Takve varijante odnose se na promjene koje rezultiraju gubitkom ili dobicom genomske materijala (delecije, duplikacije), ali i razmještanja kod kojih ne dolazi do promjena u genomskoj masi (npr. inverzije, translokacije).⁸ Za razliku od WES-a, metodom WGS moguća je i detekcija promjena broja kopija (CNV). Također, cjelogenomsko sekvenciranje može se koristiti i za precizno određivanje točaka loma kod balansiranih kromosomskih razmještanja. Unatoč unaprjeđenju metode izazov u analizi još uvijek predstavlja analiza malih SV-ova s velikim brojem ponavljajućih sekvenci. Danas je dostupno i sekvenciranje RNA kojom je omogućena analiza ekspresije gena, dorade RNA te stvaranja fuzijskih transkriptata.¹⁶ Glavni nedostatak metode WGS jest izrazito kompleksna analiza i interpretacija rezultata te ograničen broj stručnjaka s iskustvom analize cijelog genoma. Unatoč brojnim novijim studijama koje ističu prednosti WGS-a u dijagnostici NRP-a, kompleksnost analize i nedovoljno poznavanje genetske osnove neurorazvojnih poremećaja još uvijek predstavljaju prepreku u implementaciji cjelogenomskog sekvenciranja kao prve metode izbora.

Klasični i rijetki mikrodelecijski i mikroduplikacijski sindromi

Analiza promjena broja kopija aCGH metodom pokazuje da je velik broj neurorazvojnih gena ovisan o prisutnosti broja kopija. Razvojem ove tehnike definirali su se klasični mikrodelecijski i mikroduplikacijski sindromi, ali isto tako i rijetke promjene broja kopija koje uključuju gene koji sudjeluju u brojnim složenim neurorazvojnim staničnim putovima i mehanizmima. Klasični mikrodelecijski/ mikroduplikacijski sindromi u pravilu su posljedica nealelne homologne rekombinacije (NAHR) posredovane prisutnošću ponavljanja malog broja kopija u određenoj regiji (LCR, engl. *low copy repeats*) (tablica 2). Ponavljanja malog broja kopija predstavljaju regije DNA veće od 1 kb unutar genoma koje su zbog međusobne visoke homologije mjesta mejotskog krivog sparivanja i rekombinacije. Heterozigotne delecije uzrokuju haploinsuficijenciju, odnosno nemogućnost održavanja normalne funkcije jedne funkcionalne kopije gena. Mikroduplikacije imaju za posljedicu povećanu ekspresiju gena unutar regije dobitka kopije. Treba uzeti u razmatranje i poziciju regulatornih elemenata u odnosu na kodirajuću regiju samoga gena kod procjene kliničkog značaja odnosno patogenosti varijante broja kopija, osobito ako se radi o transkripcijskim čimbenicima.

Regija 22q11.21 sadrži LCR-ove označene kao LCR22A do LCR22H koji posreduju u promjenama broja kopija kroz mehanizam nealelne homologne rekombinacije. U pacijenata mogu biti prisutne različite veličine delecija ovisno o tipu rekombinacije. Delecija proksimalnog dijela regije 22q11.21 s točkama loma LCR22A-D veličine 3 Mb opisuje se kao 22q11.2 delecijijski sindrom (DiGeorge/velokardiofacijalni sindrom) i prisutna je u oko 90% pacijenata¹⁷. Haploinsuficijencija *TBX1* (MIM#602054), koja kodira transkripcijski faktor i sudjeluje u regulaciji različitih razvojnih procesa, uzrokuje većinu fenotipskih osobitosti: dismorfiju lica, srčanu grešku, hipoplaziju timusa, velofaringealnu insuficijenciju s rascjepom nepca te anomalije paratireoidne žlijezde s hipokalcemijom. *TBX1* se nalazi u regiji omeđenoj LCRA-B. 22q11.2 duplikacijski sindrom (MIM#608363) obuhvaća u pravilu regiju od 1,5 – 3 Mb i najčešće je uzrokovan nealelnom rekombinacijom između LCRA i D.

Prisutnost više područja LCR-ova u regiji 16p11.2 pridonosi učestalijoj pojavi varijanti. Mikrodelecija 16p11.2 (MIM#611913) se nalazi u jednog od 100 pacijenata s autizmom. Klinička slika je slična kod pacijenata s gubitkom ili dobicom jedne kopije unutar regije 16p11.2 i uključuje neurorazvojna odstupanja, poremećaje iz spektra autizma te poremećaj razvoja govora.¹⁸ Analiza na mikročipu predstavlja metodu izbora za diferenciranje tipa promjene broja kopija. Kao i mikrodelecija, i duplikacija regije 16p11.2 može biti

TABLICA 2. MIKRODELECIJSKI / MIKRODUPLIKACIJSKI SINDROMI UZROKOVANI NEALELNOHOMOLOGNOM REKOMBINACIJOM POSREDOVANOM LCR-OVIMA

TABLE 2. MICRODELETION / MICRODUPLICATION SYNDROMS CAUSED BY NON-ALLELIC HOMOLOGOUS RECOMBINATION MEDIATED BY LCRs

Kromosomska regija / Chromosomal region	Mikrodelecija / Microdeletion	Mikroduplicacija / Microduplication	Veličina (Mb) / Size (Mb)	Tip LCR-a / Type of LCR
7q11.23	Williams-Beuren (WB) sindrom / WB syndrome (MIM#194050)	Duplikacijski sindrom WB regije / Duplication of WB region (MIM#609757)	1,5–1,8 Mb	LCR-C Mid, LCR-B Mid regija uključuje <i>ELN</i> / LCR-C Mid, LCR-B Mid region includes <i>ELN</i>
16p11.2	Mikrodelecija 16p11.2 / Microdeletion 16p11.2 (MIM#61344, MIM#611913)	Mikroduplicacija 16p11.2 / Microduplication 16p11.2 (MIM#614671)	(220 kb, 593 kb)	Distalna BP2-BP3 delecija uključuje <i>SH2B1</i> / Distal BP2-BP3 deletion includes <i>SH2B1</i> Proksimalna delecija/duplicacija, BP4-BP5 uključuje <i>TBX6</i> / Proximal deletion/duplication, BP4-BP5 includes <i>TBX6</i>
17p11.2	Smith-Magenisov sindrom / Smith Magenis syndrome (MIM#182290)	Potocki-Lupski sindrom / Potocki Lupski syndrome (MIM#610883)	3,7 Mb	uključuje <i>RAI1</i> / includes <i>RAI1</i>
22q11.2	22q11.2 delecijijski sindrom / 22q11.2 deletion syndrome (MIM#611867)	22q11.2 duplikacijski sindrom / 22q11.2 duplication syndrome (MIM#608363)	1,5–3 Mb	LCRA-H <i>Cat eye</i> sindrom tetrasomija inv dup(22) (pter-q11.2) uključuje <i>CECR2</i> / <i>Cat eye</i> syndrome: tetrasomija, inv dup(22) (pter-q11.2) includes <i>CECR2</i> Del/dup DGS/VCFS regije (proksimalna, A-B) uključuje <i>TBX1</i> / Del/dup DGS/VCFS region (proximal, A-B) includes <i>TBX1</i> Del/dup DGS/VCFS regije (proksimalna, A-D) uključuje <i>TBX1</i> / Del/dup DGS/VCFS region (proximal, A-D) includes <i>TBX1</i>

LCR – ponavljanja malog broja kopija / low copy repeats; ELN – elastin; SH2B1 – *SH2B adaptor protein 1*; TBX6 – T-Box Transcription Factor 6; RAI1 – retinoic acid-induced gene 1; CECR2 – CECR2 histone acetyl-lysine reader; TBX1 – T-Box Transcription Factor 1; DGS/VCFS – DiGeorgeov sindrom/velokardiofacijalni sindrom / DiGeorge syndrome (DGS) and velocardiofacial syndrome (VCFS)

proksimalnog ili distalnog tipa te može nastati *de novo* ili se može naslijediti od roditelja, pri čemu pokazuje nepotpunu penetraciju i varijabilnu ekspresiju.

Mikrodelecije/mikroduplicacije regija 1q21,1 uključuju razvojno zaostajanje i udružene kongenitalne anomalije, a regije 17q21.31 razvojno zaostajanje, mišićnu hipotoniju i specifične fenotipske osobitosti.

Varijacije broja kopija većim su dijelom uzrokovane slučajnim točkama loma i klinička slika pacijenata ovisi o veličini segmenta i broju uključenih morbidnih gena. Procjena kliničkog značaja daje se na osnovi broja i tipa genetskog poremećaja koji geni unutar regije uzrokuju. Genske mutacije mogu kao posljedicu imati haploinsuficijenciju ili dominantan negativan učinak, što se procjenjuje ovisno o fenotipu pacijenta. Dijagnostička osjetljivost mikročipova iznosi od 12% do 20% kod pacijenata s neurorazvojnim bolestima i ne ovisi o tipu i rezoluciji platforme.¹⁹

Molekularni mehanizmi kod neurorazvojnih bolesti

Najveći broj patogenih mutacija nalazi se u protein-kodirajućoj regiji mijenjajući strukturu proteina. Na-

stajanje strukturno abnormalnog proteina može voditi potpunom gubitku funkcije ili drugim molekularnim mehanizmima kao što su dominantno-negativni učinak i dobitak funkcije proteina. Mutacije kod autosomno recesivnih bolesti u pravilu su vezane uz haploinsuficijenciju, dok kod autosomno dominantnih mogu biti prisutni alternativni mehanizmi negativno dominantnog učinka mutacije i dobitka funkcije proteina.²⁰

Dominantan negativan učinak mutacije vodi nastajanju mutiranog polipeptida, koji interferira s aktivnošću i funkcijom normalnog proteina. Primjer su dimerni proteini gdje mutacija ruši funkcionalnu domenu, ali ostavlja domenu za dimerizaciju te nastaje hibridni dimer koji sadrži i podjedinicu divljevog i mutiranog tipa koji nema funkcionalnu domenu.²¹ Pozicija mutacije može nam pokazati da se radi o dominantno negativnom učinku, posebice ako se nalazi u funkcionalnim domenama. Povećanu ekspresiju gena u pravilu uzrokuju duplicacija gena ili poremećaji regulatorne regije i abnormalna transkripcijska regulacija, što može voditi dominantnom tipu dobitka funkcije mutiranog proteina.²²

Nekodirajuća DNA i neurorazvojni poremećaji

Danas se zna da nekodirajuća DNA ima vrlo važnu ulogu u organizaciji i stabilizaciji genoma te regulaciji ekspresije kodirajuće DNA. Ljudski genom predstavlja visoko organiziranu trodimenzionalnu strukturu sastavljenu od kromatinskih vlakana koja su organizirana u nukleosome, A/B čvorove, kromosomske domene i konstitucijske topološke domene. Trodimenzionalna struktura genoma razlikuje se između staničnih linija, a smatra se da vrlo važnu ulogu u samoj organizaciji imaju i nekodirajuće regulacijske DNA regije. Općenito nekodirajuće regulacijske DNA regije dijelimo u *cis* i *trans* regulatorne elemente. *Cis* regulatorni elementi, koje čine promotori, pojačivači, utišivači i inzulatori jesu nekodirajuće DNA regije koje reguliraju transkripciju susjednih gena. U *trans* regulatorne elemente spadaju transkripcijski faktori i nekodirajuće RNA molekule koje utječu na transkripciju brojnih gena koji se mogu nalaziti na više različitim – lokacijski nepovezanih genomskih regija. Inzulatori su ključni za organizaciju kromatina u konstitucijske topološke domene. Na inzulatore se vežu CTCF transkripcijski faktori i formiraju takozvane „granice“ između topoloških domena. Topološke domene obično su veličine <1 Mb i predstavljaju genomske regije u kojima sekvence koja se nalaze unutar iste domene imaju viši afinitet za međusobnu interakciju, nego s elementima drugih topoloških domena. Unutar takve topološke domene formiraju se i manje kromatinske omče koje omogućuju interakciju između specifičnih pojačivača i promotora te na taj način reguliraju ekspresiju gena. Promotori se nalaze oko mjesta početka transkripcije gena i ključni su za pokretanje transkripcije. Pojačivači su pozitivni regulatori transkripcije, čiji položaj u odnosu na mjesto početka transkripcije gena može varirati od mnogo kilobaza uzvodno ili nizvodno, a mogu čak biti smješteni u intronima gena koje reguliraju ili nekih drugih gena. Štoviše, osim što djeluju na način neovisan o položaju, pojačivači mogu regulirati transkripciju bez obzira na njihovu orijentaciju. Konačno, jedan pojačivač može regulirati više gena, a istovremeno svaki gen može biti reguliran s više pojačivača. Precizna regulacija ekspresije gena podrazumijeva transkripciju odgovarajućeg gena u odgovarajuće vrijeme i mjesto. Kada je ta spacio-temporalna regulacija poremećena, to može utjecati na gensku ekspresiju te dovesti do razvoja genetskih poremećaja.

U nekoliko sljedećih primjera bit će prikazani slučajevi neurorazvojnih poremećaja kod kojih je ustanovljena prisutnost genomskih razmještanja u nekodirajućim DNA regijama.

Genomska razmještanja u nekodirajućim RNA molekulama

Nekodirajuće RNA utječu na regulaciju ekspresije mnogih gena te je sve više opisanih slučajeva neuro-

razvojnih poremećaja povezano upravo sa strukturalnim varijantama u nekodirajućim RNA molekulama. Mikrodelecije *PTCH1-AS*, gena za dugu nekodirajuću RNA, povezane su s razvojem autizma kod muških pacijenata.²³ Stamou i suradnici²⁴ su opisali pacijenta s Kallmanovim sindromom i balansiranom translokacijom t(7;12)(q22;q24) uslijed koje je došlo do gubitka funkcije nekodirajuće RNA *RMST*. *RMST* je odgovorna za regulaciju ekspresije gena (*SOX2*, *PAX3*, *CHD7*, *TUBB3*, *MKRN3*) važnih za razvoj gonadotropin-oslobađajućih sekrecijskih neurona. Disrupcija nekodirajućih RNA unutar utisnutih genomskih regija također je povezana s neurorazvojnim poremećajima. Primjerice, mikrodelecije diferencijalno metiliranih regija majčinog podrijetla koje se nalaze uzvodno od *MEG3* gena za nekodirajuću RNA uzrokuju gubitak funkcije i razvoj fenotipa sličnom paternalnoj uniparentalnoj disomiji 14 kromosoma.²⁵

Genomska razmještanja u cis regulatornim elementima

Jedan od najboljih primjera jest ekspanzija CGG tripleta u 5'UTR regiji *FMR1* gena koja uzrokuje hipermetilaciju promotora i utišavanje ekspresije *FMR1*, što je glavni mehanizam razvoja fragilnog X sindroma.²⁶ Ekspanzija GGC tripleta u promotoru *XYTL1* gena kod pacijenata s Baratela-Scottovim sindromom uzrokuje hipermetilaciju prvog eksona i smanjenu ekspresiju *XYTL1*.²⁷ Delecija u promotorskoj regiji *GPR56* koja onemogućuje vezanje transkripcijskog faktora *RFX* povezuje se s giralnim malformacijama u specifičnim regijama korteksa te pojavom fenotipa koji uključuje intelektualno zaostajanje, zaostajanje u govoru i napadaje.²⁸ Holoprozencefalija je uglavnom uzrokovana mutacijama u kodirajućim regijama *SHH* gena. Jeon i suradnici²⁹ su opisali pacijenta s holoprozencefalijom i točkastom mutacijom u *SBE2* pojačivaču. Funkcionalnim studijama je utvrđeno da ova mutacija uzrokuje promjene u konformaciji koje onemogućuju vezanje transkripcijskog faktora *SIX3* te posljedično smanjenu ekspresiju *SHH*. Međutim utvrđeno je da translokacije uzvodno od *SHH* koje uzrokuju gubitak interakcije između *SHH* promotora i pojačivača (*SBE6*, *SBE4*, *SBE3*, *SBE2*) uzrokuju isti fenotip.³⁰ Stoga čak i nekodirajuće regije koje ne uključuju nužno same *cis*-elemente, nego predstavljaju intergenski prostor između njih, mogu utjecati na konformaciju genoma, a njihova strukturalna razmještanja mogu utjecati na regulacijsku vezu između promotora i pojačivača ili čak mogu u potpunosti uništiti granice između susjednih topoloških domena.

Kromosomska razmještanja u topološkim domenama

Struktura i organizacija ljudskog genoma u konformacijske topološke domene postala je vrlo dobro po-

znata s napredovanjem i pojavom novih tehnologija koje daju informacije na osnovi masivnog paralelnog sekvenciranja bliskih genomskih regija (Hi-C kromosomsko mapiranje). Stoga je postalo neupitno da strukturalne varijante koje remete njihovu organizaciju mogu biti u pozadini brojnih genskih, ali i neurorazvojnih poremećaja. FOXG1 transkripcijski faktor povezan je s razvojem kongenitalnog oblika Rettovog sindroma. Gen za FOXG1 nalazi se u velikoj topološkoj domeni složene strukture koja sadrži mnogobrojne interakcijske čvorove. Opisano je više pacijenata s fenotipom nalik Rettovom sindromu kod kojih su pronađene translokacije i delecije regulatornih struktura koje se nalaze distalno od FOXG1, a pretpostavlja se da ove strukturne promjene uzrokuju deleciju/translokaciju pojačivača ili pak disrupciju granica između topoloških domena.^{31,32} Jedan klinički primjer strukturalne varijante koja mijenja 3D genomsku konformaciju pronađen je i kod pacijenta s adultnim oblikom demijelinizacijske leukodistrofije. Giorgio i suradnici³³ su pokazali da delecija granica između topoloških domena kod LMNB1 lokusa uzrokuje formiranje nove topološke domene i dovodi do interakcije pojačivača s genom koji inače ne stupaju u interakciju. Translokacije i mikrodelecije uzvodno od SOX9 pronađene su kod pacijenata s Robinovom sekvencom, dok su duplikacije koje obuhvaćaju granice između topoloških domena ustanovljene kod pacijenata s Cooksovim sindromom.^{34,35}

Zaključak

Danas je poznat velik broj neurorazvojnih gena u genomskim bazama podataka s detaljnim opisom varijanti od interesa koji omogućuje razumijevanje mehanizama razvoja bolesti i uspostavljanje dijagnoze. Klinički značaj strukturalnih varijanti poput varijanti broja kopija (mikrodelecije i mikroduplikacije) i većih strukturalnih genomskih promjena koje se detektiraju aCGH metodom jest neosporan. Za razliku od varijanti broja kopija, jednonukleotidne varijante i male delecije/duplikacije u genima mogu se detektirati samo cjeloeksomskim sekvenciranjem. Jednonukleotidne varijante kao i strukturalne varijante u nekodirajućim regulacijskim DNA regijama mogu biti ključne za poremećaj regulacije ekspresije gena i pojavu raznih neurorazvojnih poremećaja. Analizirajući samo kodirajuće elemente ljudskog genoma mnogi slučajevi neurogenetskih poremećaja ostat će neotkriveni. WES analizom pokrivaju se samo kodirajuće regije genoma, koje obuhvaćaju 1 – 2% ljudskog genoma. Preostalih 98% nazivaju se nekodirajućim DNA regijama koje su donedavno smatrane suvišnim i nefunkcionalnim dijelovima genoma koji ne podliježu nikakvom selekcijskom pritisku. Cjelogenomsko sekvenciranje omogućuje i detekciju varijanti u nekodirajućim regijama i precizno određivanje točaka loma kod naoko balansi-

ranih strukturalnih kromosomskih razmještanja. Nova znanstvena istraživanja pokazuju da strukturalne promjene u nekodirajućem dijelu genoma mogu utjecati na broj kopija i poziciju regulatornih elemenata ili pak poremetiti organizaciju kromatinskih struktura, uključujući konstitucijske topološke domene i njihove međusobne granice. Razvojem područja neurogenomike i neurotranskriptomike omogućit će se otkrivanje novih gena i varijanti, odnosno mehanizama odgovornih za nastajanje različitih tipova neurorazvojnih poremećaja.

LITERATURA

1. World Health Organization, International classification of diseases for Mortality and Morbidity Statistics (ICD-11, 11th Revision). 2022 Feb [pristupljeno 2023 Jan 31]. Dostupno na: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>.
2. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417–25.
3. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP i sur. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749–64.
4. 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. Erratum in: *Genet Med.* 2013;15(8):669.
5. Lee JS, Hwang H, Kim SY, Kim KJ, Choi JS, Woo MJ i sur. Chromosomal Microarray With Clinical Diagnostic Utility in Children With Developmental Delay or Intellectual Disability. *Ann Lab Med.* 2018;38(5):473–80.
6. Lindstrand A, Eisfeldt J, Pettersson M, Carvalho CMB, Kvarnung M, Grigelioniene G i sur. From cytogenetics to cytogenomics: whole-genome sequencing as a first-line test comprehensively captures the diverse spectrum of disease-causing genetic variation underlying intellectual disability. *Genome Med.* 2019;11(1):68.
7. Martinez-Granero F, Blanco-Kelly F, Sanchez-Jimeno C, Avila-Fernandez A, Artech A, Bustamante-Aragones A i sur. Comparison of the diagnostic yield of aCGH and genome-wide sequencing across different neurodevelopmental disorders. *NPJ Genom Med.* 2021;6(1):25.
8. Lin X, Yang Y, Melton PE, Singh V, Simpson-Yap S, Burdon KP i sur. Integrating Genetic Structural Variations and Whole-Genome Sequencing Into Clinical Neurology. *Neurol Genet.* 2022;8(4):e200005.
9. Carey L, Scott F, Murphy K, Mansfield N, Barahona P, Leigh D i sur. Prenatal diagnosis of chromosomal mosaicism in over 1600 cases using array comparative genomic hybridization as a first line test. *Prenat Diagn.* 2014;34(5):478–86.
10. Adams SA, Coppinger J, Saitta SC, Stroud T, Kandamuru M, Fan Z i sur. Impact of genotype-first diagnosis: the detection of microdeletion and microduplication syndromes with cancer predisposition by aCGH. *Genet Med.* 2009;11(5):314–22.

11. *de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K i sur.* Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):660–7.
12. *Tassone F, Choudhary NS, Tassone F, Durbin-Johnson B, Hansen R, Hertz-Picciotto I i sur.* Identification of expanded alleles of the FMR1 Gene in the CHildhood Autism Risks from Genes and Environment (CHARGE) study. *J Autism Dev Disord.* 2013;43(3):530–9.
13. *Marchuk DS, Crooks K, Strande N, Kaiser-Rogers K, Milko LV, Brandt A i sur.* Increasing the diagnostic yield of exome sequencing by copy number variant analysis. *PLoS One.* 2018; 13(12):e0209185.
14. *Bowling KM, Thompson ML, Amaral MD, Finnilla CR, Hiatt SM, Engel KL i sur.* Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome Med.* 2017;9(1):43.
15. *Saudi Mendeliome Group.* Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol.* 2015;16:134. [published correction appears in *Genome Biol.* 2015;16:226].
16. *Murdock DR, Dai H, Burrage LC, Rosenfeld JA, Ketkar S, Müller M i sur.* Transcriptome-directed analysis for Mendelian disease diagnosis overcomes limitations of conventional genomic testing. *J Clin Invest.* 2021;131(1):e141500.
17. *Vervoort L, Vermeesch JR.* The 22q11.2 Low Copy Repeats. *Genes.* 2022; 13(11):2101.
18. *Atli EI, Yalcintepe S, Atli E, Demir S, Mail C, Gurkan H.* Clinical Implications of Chromosome 16 Copy Number Variation. *Mol Syndromol.* 2022;13(3):184–92.
19. *Yamamoto T.* Genomic Aberrations Associated with the Pathophysiological Mechanisms of Neurodevelopmental Disorders. *Cells.* 2021;10(9):2317.
20. *Backwell L, Marsh JA.* Diverse Molecular Mechanisms Underlying Pathogenic Protein Mutations: Beyond the Loss-of-Function Paradigm. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2022; 23:475–98.
21. *Gerasimavicius L, Livesey BJ, Marsh JA.* Loss-of-function, gain-of-function and dominant-negative mutations have profoundly different effects on protein structure. *Nat Commun.* 2022;13(1):3895.
22. *Veitia RA, Caburet S, Birchler JA.* Mechanisms of Mendelian dominance. *Clin Genet.* 2018;93:419–28.
23. *Ross PJ, Zhang WB, Mok RSF, Zaslavsky K, Deneault E, D'Abate L i sur.* Synaptic Dysfunction in Human Neurons With Autism-Associated Deletions in PTCHD1-AS. *Biol Psychiatry.* 2020;87(2):139–49.
24. *Stamou M, Ng SY, Brand H, Wang H, Plummer L, Best L i sur.* A Balanced Translocation in Kallmann Syndrome Implicates a Long Noncoding RNA, RMST, as a GnRH Neuronal Regulator. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):e231–44.
25. *Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M i sur.* Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet.* 2008;40(2):237–42.
26. *Poeta L, Drongitis D, Verrillo L, Miano MG.* DNA Hypermethylation and Unstable Repeat Diseases: A Paradigm of Transcriptional Silencing to Decipher the Basis of Pathogenic Mechanisms. *Genes (Basel).* 2020;11(6):684.
27. *LaCroix AJ, Stabley D, Sahraoui R, Adam MP, Mehaffey M, Kernan K i sur.* GGC Repeat Expansion and Exon 1 Methylation of XYLT1 Is a Common Pathogenic Variant in Baratela-Scott Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):35–44.
28. *Perenthaler E, Yousefi S, Niggel E, Barakat TS.* Beyond the Exome: The Non-coding Genome and Enhancers in Neurodevelopmental Disorders and Malformations of Cortical Development. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:352.
29. *Jeong Y, Leskow FC, El-Jaick K, Roessler E, Muenke M, Yocum A i sur.* Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. *Nat Genet.* 2008;40(11):1348–53.
30. *Benabdallah NS, Gautier P, Hekimoglu-Balkan B, Lettice LA, Bhatia S, Bickmore WA.* SBE6: a novel long-range enhancer involved in driving sonic hedgehog expression in neural progenitor cells. *Open Biol.* 2016;6(11):160197.
31. *Redin C, Brand H, Collins RL, Kammin T, Mitchell E, Hodge JC i sur.* The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. *Nat Genet.* 2017;49(1):36–45.
32. *Mehrjouy MM, Fonseca ACS, Ehmke N, Paskulin G, Novelli A, Benedicenti F i sur.* Regulatory variants of FOXP1 in the context of its topological domain organisation. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(2):186–96.
33. *Giorgio E, Robyr D, Spielmann M, Ferrero E, Di Gregorio E, Imperiale D i sur.* A large genomic deletion leads to enhancer adoption by the lamin B1 gene: a second path to autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy (ADLD). *Hum Mol Genet.* 2015;24(11):3143–54.
34. *Gordon CT, Attanasio C, Bhatia S, Benko S, Ansari M, Tan TY i sur.* Identification of novel craniofacial regulatory domains located far upstream of SOX9 and disrupted in Pierre Robin sequence. *Hum Mutat.* 2014;35(8):1011–20.
35. *Franke M, Ibrahim DM, Andrey G, Schwarzer W, Heinrich V, Schöpflin R i sur.* Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature.* 2016; 538(7624):265–9.