

Molekularno citogenetička analiza sindroma nastalih zbog poremećaja genomskog utiska

Zečević, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:530758>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nina Zečević

**Molekularno-citogenetička analiza sindroma
nastalih zbog poremećaja genomskog utiska**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Odjelu za citogenetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Kristine Crkvenac Gornik te komentorstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Kristini Crkvenac Gornik na pruženoj prilici, strpljenju, svim savjetima i prenesenom znanju. Hvala i drugim djelatnicima Odjela za citogenetiku na nesebičnoj pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Veliko hvala i komentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić na stručnom vodstvu, savjetima, izdvojenom vremenu i prenesenom znanju.

Mojim roditeljima, Zlatku i Marini, najveće hvala na bezuvjetnoj podršci tijekom studija. Bez vas ovo ne bih mogla ostvariti.

Posebno hvala mom Dominiku, mom najboljem prijatelju i životnom suputniku, koji mi je pružao pomoć i podršku u svakom smislu, a osobito na tome što me poticao da uvijek slijedim svoje ambicije. Bez njega ne bih bila ovdje gdje sam sada.

Želim zahvaliti i svim prijateljima, a osobito Luni i Klari, koje su bile uz mene kroz čitavo fakultetsko doba. Hvala vam na svakom razgovoru, ohrabrenju i motivaciji koju ste mi pružale da svoj put privedem kraju.

U konačnici, želim zahvaliti svim profesorima tijekom preddiplomskog studija u Osijeku te diplomskog studija na modulu Fiziologija i imunobiologija na prenesenom znanju i vještinama. Hvala Vam što ste mi prenijeli ljubav i interes prema biologiji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularno-citogenetička analiza sindroma nastalih zbog poremećaja genomskog utiska

Nina Zečević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Metilacijski specifična metoda višestrukog umnažanja vezanih proba (MS-MLPA) omogućava preciznu dijagnostiku malformacijskih sindroma uzrokovanih genomskim utiskivanjem, a to su sindrom Prader-Willi (PWS), sindrom Angelman (AS), sindrom Beckwith-Wiedemann (BWS) i sindrom Russell-Silver (RSS). Molekularna podloga i klinička prezentacija navedenih sindroma vrlo je različita, a fenotipske razlike nastaju zbog različitog genetičkog mehanizma njihovog nastanka. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati broj kopija i metilacijski status utisnutih gena smještenih u regiji PWS/AS (15q11-q13) i regiji BWS/RSS (11p15.5, 7q32, 7p12 i 14q32) te za svakog ispitanika napraviti usporedbu fenotipa ovisno o molekularnom genetičkom mehanizmu nastanka bolesti i potvrdi uputne dijagnoze. Istraživanje je obuhvatilo 104 nesrodna ispitanika poslanih na dijagnostiku na Odjelu za pedijatriju KBC-a Zagreb. Primjenom metode MS-MLPA genetički uzrok za PWS određen je kod 37% bolesnika, za AS kod 44%, dok je kod 52% bolesnika potvrđen BWS. Svega 17% bilo je u skupini bolesnika s kliničkom slikom koja ukazuje na RSS. Nije utvrđena statistički značajna razlika fenotipova ovisno o molekularnom uzroku nastanka bolesti kod PWS-a i RSS-a. Između fenotipova potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika metodom MS-MLPA također ne postoji statistički značajna razlika. Ovim istraživanjem je potvrđena hipoteza da rano otkrivanje genetičke etiologije sindroma nastalih zbog poremećaja genomskog utiskivanja primjenom tehnika molekularne citogenetike omogućuje bolje predviđanje fenotipa bolesnika u svrhu pružanja učinkovite individualne terapije.

Ključne riječi: delecija, uniparentalna disomija, metoda MS-MLPA, metilacijski status, fenotip

(66 stranica, 30 slika, 11 tablica, 62 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Kristina Crkvenac Gornik, znanstveni suradnik

Komentor: prof. dr. sc. Zorana Grubić, znanstvena savjetnica

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Zorana Grubić

prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 04.07.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Molecular cytogenetics of syndromes caused by genomic imprinting disorders

Nina Zečević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) method enables precise diagnosis of congenital syndromes caused by genomic imprinting, including Prader-Willi syndrome (PWS), Angelman syndrome (AS), Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) and Russell-Silver syndrome (RSS). The molecular etiology and clinical presentation of these syndromes varies significantly with phenotypic differences arising from distinct genetic mechanisms. The aim of this study was to analyze the copy number and methylation status of imprinted genes located in the PWS/AS region (15q11-q13) and the BWS/RSS region (11p15.5, 7q32, 7p12, and 14q32) and to compare the phenotypes of each patient based on the molecular mechanism of the disease and confirmation of the initial diagnosis. The study included 104 unrelated patients referred for diagnostics to the Department of Pediatrics at UHC Zagreb. The genetic cause for PWS was identified in 37% of patients, for AS in 44% and for BWS in 52% of patients. The lowest confirmation rate (17%) was in the group of patients with a clinical presentation indicative of RSS. No statistically significant difference in phenotypes was found based on the molecular cause of the disease for PWS and RSS. Additionally, there was no statistically significant difference between the phenotypes of patients confirmed and not confirmed by the MS-MLPA method. This study supports the hypothesis that an early identification of the genetic etiology of syndromes caused by the genomic imprinting disorders using molecular cytogenetic techniques allows for better prediction of patient phenotypes, enabling thus a more effective individualized therapy.

Keywords: deletion, uniparental disomy, MS-MLPA method, methylation status, phenotype

(66 pages, 30 figures, 11 tables, 62 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Research Associate Kristina Crkvenac Gornik, PhD

Co-mentor: prof. Zorana Grubić, PhD

Reviewers:

prof. Zorana Grubić, PhD

prof. Mirjana Pavlica, PhD

prof. Nada Oršolić, PhD

Thesis accepted: July 04th 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Genomsko utiskivanje.....	1
1.1.1 Mehanizmi genomskog utiskivanja.....	2
1.1.2 Uzroci nastanka poremećaja genomskog utiskivanja.....	3
1.2 Bolesti uzrokovane genomskim utiskivanjem.....	6
1.2.1. Struktura i geni kromosomske regije 15q11.2-q13.....	6
1.2.1.1 Sindrom Prader-Willi.....	8
1.2.1.1.1 Molekularna osnova sindroma Prader-Willi.....	9
1.2.1.2 Sindrom Angelman.....	11
1.2.1.2.1 Molekularna osnova sindroma Angelman.....	11
1.2.2 Struktura i geni kromosomske regije 11p15.5-11p15.4.....	13
1.2.2.1 Sindrom Beckwith-Wiedemann.....	14
1.2.2.1.1 Molekularna osnova sindroma Beckwith-Wiedemann.....	15
1.2.2.2 Sindrom Russell-Silver.....	17
1.2.2.2.1 Molekularna osnova sindroma Russell-Silver.....	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1 Ispitanici.....	20
3.2 Izolacija genomske DNA.....	21
3.3 Metoda MS-MLPA.....	22
3.4 Kapilarna elektroforeza.....	25
3.5 Analiza podataka MS-MLPA.....	26
3.6 Retrospektivna analiza kliničkih slika bolesnika.....	29
3.7 Statističke metode.....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Analiza molekularne podloge nastanka istraživanih sindroma.....	30
4.2 Analiza rezultata za sindrom Prader-Willi.....	31

4.2.1 Analiza rezultata dobivenih primjenom metode MS-MLPA kod sindroma Prader-Willi	31
4.2.1.1 Prikaz bolesnika s delecijom PWS SRO kromosomske regije 15q11.2	31
4.2.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Prader-Willi	32
4.2.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Prader-Willi.....	34
4.3 Analiza rezultata za sindrom Angelman	37
4.3.1 Analiza rezultata metode MS-MLPA za sindrom Angelman.....	37
4.3.1.1 Prikaz bolesnika s delecijom od mjesta loma BP1 do mjesta loma BP5	38
4.3.1.2 Prikaz bolesnika s hipometilacijom u regiji 15q11.2q13.3 u mozaičnom obliku...39	
4.3.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Angelman.....	40
4.3.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Angelman	40
4.4 Analiza rezultata za sindrom Beckwith-Wiedemann	43
4.4.1 Analiza rezultata metode MS-MLPA za sindrom Beckwith-Wiedemann	43
4.4.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Beckwith-Wiedemann	43
4.2.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Beckwith-Wiedemann.....	43
4.5 Analiza rezultata za sindrom Russell-Silver	46
4.5.1 Analiza rezultata metode MS-MLPA za sindrom Russell-Silver.....	46
4.5.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Russell-Silver.....	47
4.5.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Russell-Silver	48
5. RASPRAVA.....	52
6. ZAKLJUČAK	58
7. POPIS LITERATURE	59
8. ŽIVOTOPIS	

POPIS KRATICA

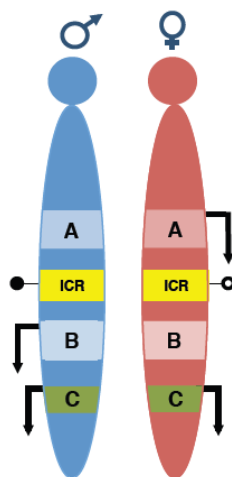
DMR	različito metilirana regija
IC	centar utiskivanja
Mb	megabaza
lncRNA	duga nekodirajuća RNA
ICR	kontrolna regija utiskivanja
kb	kilobaza
gDMR	zametna DMR (engl. <i>Germline DMR</i>)
sDMR	somatska DMR (engl. <i>Somatic DMR</i>)
<i>IGF2</i>	faktor rasta sličan inzulinu 2 (engl. <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>)
UPD	uniparentalna disomija
LOM	nedostatak metilacije (engl. <i>Lack of Methylation</i>)
GOM	dobitak metilacije (engl. <i>Gain of Methylation</i>)
CNV	varijanta broja kopija (engl. <i>Copy Number Variant</i>)
SNV	varijanta jednog nukleotida (engl. <i>Single Nucleotide Variant</i>)
PWS	sindrom Prader-Willi
AS	sindrom Angelman
LOF	gubitak funkcije (engl. <i>Loss of Function</i>)
BWS	sindrom Beckwith-Wiedemann
RSS	sindrom Russell-Silver
<i>UBE3A</i>	ubikvitin protein ligaza E3A (engl. <i>Ubiquitin-protein Ligase E3A</i>)
<i>CDKN1C</i>	inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 1C (engl. <i>Cyclin-dependent Kinase inhibitor 1C</i>)
<i>NIPA1</i>	neutisnut u Prader-Willi/Angelman regiji protein 1 (engl. <i>Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman Syndrome Region Protein 1</i>)
<i>NIPA2</i>	neutisnut u Prader-Willi/Angelman regiji protein 2 (engl. <i>Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman Syndrome Region Protein 2</i>)
<i>CYFIP1</i>	citoplazmatski FMR1 u interakciji protein 1 (engl. <i>Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 1</i>)
<i>GCP5</i>	komponenta tubulin gama kompleksa 5 (engl. <i>Tubulin Gamma Complex Component 5</i>)
<i>ATP10A</i>	prijenos fosfolipida ATPaze 10A (engl. <i>ATPase Phospholipid Transporting</i>)

	10A)
GABA	gama-aminomaslačna kiselina
SNURF-SNRPN	SNRPN uzvodni protein okvira čitanja (engl. <i>SNRPN Upstream Reading Frame Protein</i>)
NDN	protein nekdin (engl. <i>Necdin Protein</i>)
MAGEL2	MAGE član obitelji L2 (engl. <i>MAGE Family Member L2</i>)
MKRN3	makorin protein prstena 3 (engl. <i>Makorin Ring Finger Protein 3</i>)
C15orf2	otvoreni okvir čitanja 2 kromosoma 15 (engl. <i>Chromosome 15 Open Reading Frame 2</i>)
OCA2	okulokutani albinizam tipa II (engl. <i>Oculocutaneous Albinism II</i>)
HERC2	HECT i RLD domena koja sadrži E3 ubikvitin protein ligazu 2 (engl. <i>HECT and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2</i>)
SNORD116	mala jezgrina RNA 116 (engl. <i>Small Nucleolar RNA 116</i>)
LCR	smanjen broj kopija ponavljanja (engl. <i>Low Copy Repeats</i>)
ICR1	kontrolna regija utiskivanja 1
H19	majčinski izražen transkript H19 (engl. <i>H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript</i>)
DMR	diferencijalno metilirana regija utiskivanja 1
ICR2	kontrolna regija utiskivanja 2
DMR2	različito metilirana regija utiskivanja 2
KCNQ1OT1	KCNQ1 transkript preklapanja (engl. <i>KCNQ1 Overlapping Transcript 1</i>)
KCNQ1	član 1 podfamilije Q naponski upravljano kalija (engl. <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1</i>)
pUPD	očeva uniparentalna disomija
GRB10	protein vezan za receptor faktora rasta 10 (engl. <i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 10</i>)
MEST	protein homoloh transkripta specifičnog za mezoderm (engl. <i>Mesoderm-specific Transcript Homolog Protein</i>)
MEG3	majčinski izražen gen 3 (engl. <i>Maternally Expressed Gene 3</i>)
CTCF	11-cink protein
MS-MLPA	metilacijski osjetljiva metoda višestrukog umnažanja vezanih proba
PCR	lančana reakcija polimeraze

1. UVOD

1.1 Genomsko utiskivanje

Čovjek nasljeđuje dva alela, jedan od majke i jedan od oca, pri čemu su oba alela funkcionalna za većinu gena. U određenim regijama unutar ljudskog genoma, ekspresija specifičnih gena ovisi o roditeljskom podrijetlu, a epigenetički proces koji je za to odgovoran je genomsko utiskivanje (Slika 1). Prilikom genomskog utiskivanja dolazi do epigenetskih promjena koje reguliraju izražavanje pojedinih gena bez promjene slijeda u molekuli DNA (Bajrami i Spiroski, 2016). Najučestaliji epigenetski mehanizmi koji dovode do genomskog utiskivanja su de/metilacija molekule DNA, odnosno dinukleotida CpG (otoka CpG), nekodirajuće RNA te modifikacije histona. Navedeni mehanizmi dovode do promjene strukture kromatina te utišavanja gena putem metilacije promotora ili drugih različito metiliranih regija (engl. *Differentially Methylated Region*, DMR). Osim toga, DMR-ovi mogu djelovati kao kontrolne regije u centrima utiskivanja (engl. *Imprinting Center*, IC) (Berland, 2022). Proces genomskog utiskivanja ima važnu ulogu u moduliranju skupova složenih osobina, počevši od razvoja embrija i posteljice do obrasca ponašanja u starijoj životnoj dobi (Lawson i sur., 2013).



Slika 1. Shematski prikaz ekspresije utisnutih gena. Na očevom (plavi) i majčinom (crveni) kromosomu prikazani su izraženi i utisnuti aleli. Izraženi aleli označeni su sa strelicama. Metilacija kontrolne regije utiskivanja (engl. *Imprinting Control Region*, ICR) dovodi do utiskivanja gena A i izražavanja gena B sa očevog alela. Odsutnost metilacije (prazan krug na ICR) na majčinom kromosomu dovodi do izražavanja gena A i utiskivanja gena B s majčinog alela. Gen C je bialelno izražen (preuzeto i prilagođeno prema Kalish i sur., 2014).

Utisnuti geni organizirani su u utisnute domene koje mogu biti duge i do nekoliko megabaza (Mb), a omogućuju koordiniranu regulaciju zajedničkim regulatornim elementima. Sadrže utisnute gene eksprimirane s očevog ili majčinog alela kao i neutisnute gene te male nekodirajuće RNA (engl. *Long Non-coding RNA*, lncRNA). Pojedina grupa utisnutih gena je pod kontrolom cis-regulacijske sekvence kontrolne regije utiskivanja (engl. *Imprinting Control Region*, ICR) ili centra utiskivanja. Utisnute domene povezane su s DMR-ovima koje su velike nekoliko kilobaza (kb) i vrlo bogate dinukleotidima CpG, a karakterizira ih različiti status metilacije DNA između pojedinih stanica, tkiva ili organizama u istom ili različitom vremenskom razdoblju. Identificirane su dvije skupine DMR-a: DMR-ovi germinativne linije ili primarni DMR (engl. *Germline DMR*, gDMR) i somatski ili sekundarni DMR (engl. *Somatic DMR*, sDMR). Metilacija gDMR-a uspostavlja se tijekom gametogeneze, a sDMR-a nakon oplodnje (Ishida i Moore, 2012).

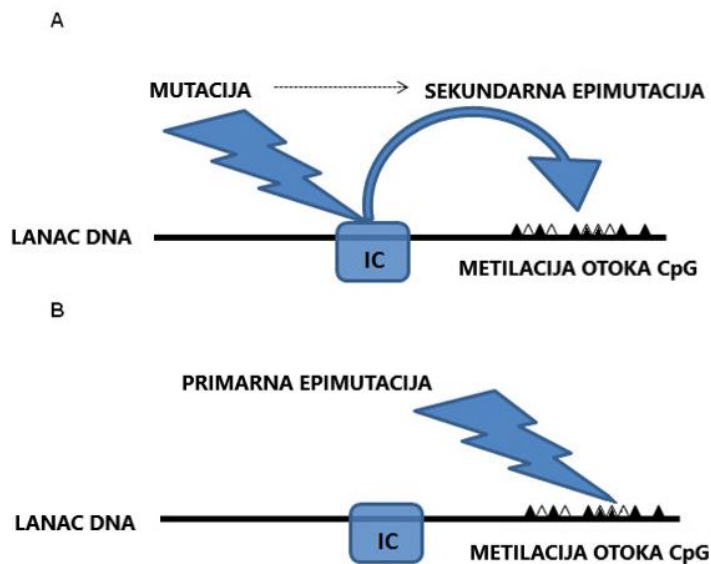
1.1.1 Mehanizmi genomskog utiskivanja

Kod većine autosoma, izražavaju se aleli majke i oca. Međutim, u < 1% alela, ekspresija alela prisutna je samo od jednog roditelja. Na primjer, ekspresija gena za inzulinu-sličan faktor rasta (engl. *Insulin-like Growth Factor 2*, *IGF2*) normalno se odvija samo s alela porijeklom od oca. Tijekom razvoja roditeljskih gameta, obrasci metilacije karakteristični za utisnute kontrolne regije se brišu i ponovno postavljaju za prijenos na potomstvo (Bajrami i Spiroski, 2016). Mnogi od utisnutih gena uključeni su u regulaciju prenatalnog i postnatalnog rasta. Najčešća epigenetička modifikacija koja uzrokuje genomski utisak je metilacija citozina u otocima CpG molekule DNA. Otoci CpG su slijedovi od najmanje 500 parova baza (pb) u kojima je udio dinukleotida CpG minimalno 55%, a čine 1-2% genoma. Nalaze se u području promotora gena pa njihova metilacija utječe na transkripciju, translaciju i posljedično ekspresiju gena. Metilacija DNA je dodavanje metilne skupine s davatelja poput S-adenozil-L-metionina na molekulu DNA, točnije na citozin koji je dio dinukleotida CpG. Prijenosom metilne skupine od davatelja nastaje homocistein S-adenozin, a od citozina citozin 5-metil. Sama metilacija označava utišavanje gena, odnosno njegovu inaktivaciju dok demetilacija gena aktivira gen. Ostale epigenetičke promjene uključene u genomsko utiskivanje su modifikacija histona, fosforilacija, ubikvitinacija i acetilacija (Berland, 2022). Za utisnute gene karakteristična je monoalelna ekspresija. S obzirom na to da imaju jednu umjesto dvije izražene kopije gena, epigenetske promjene u njihovoj ekspresiji dovode do bolesti, odnosno malformacijskih sindroma (Eggerman i sur., 2015).

1.1.2 Uzroci nastanka poremećaja genomskog utiskivanja

Kod većine poremećaja genomskog utiskivanja, razlikuju se četiri skupine molekularnih promjena: promijenjena metilacija (epimutacija), uniparentalna disomija (engl. *Uniparental Disomy*, UPD), varijacije u broju kopija (delecije/duplikacije) i unutargenske mutacije utisnutih gena. Funkcionalni rezultat u svakom slučaju je neuravnotežena ekspresija utisnutih gena, a fenotipski ishod ovisi o roditeljskom porijeklu alela zahvaćenog mutacijom.

Promijenjena metilacija citozina može rezultirati epigenetičkom promjenom koju nazivamo epimutacija koja može deaktivirati gen ili uzrokovati aktivaciju utišane kopije utisnutog gena. Ovisno o podrijetlu, mogu se podijeliti na primarne i sekundarne (Slika 2) (Czyz i sur., 2012).



Slika 2. Shematski prikaz primarne i sekundarne epimutacije. **A.** Mehanizam sekundarne epimutacije: Promjena DNA u centru za utiskivanje neizravno utječe i mijenja uzorak metilacije (crni i bijeli trokuti) na drugom lokusu, koji može biti u cis ili u trans položaju. **B.** U primarnoj epimutaciji, vanjski podražaj (bilo da je okolišni ili stohastički) izravno mijenja metilaciju (preuzeto i prilagođeno prema Czyz i sur., 2012).

Epimutacije su često primarni događaji bez prisutnosti drugih genetskih promjena. Primarne epimutacije često se javljaju nakon oplodnje i dovode do somatskog mozaicizma, a nastaju u odsutnosti bilo kakve promjene sekvence DNA. Odgovorne su za približno 50% slučajeva poremećaja genomskog utiskivanja. To su hipermetilacija, odnosno pojačanje metilacije (engl.

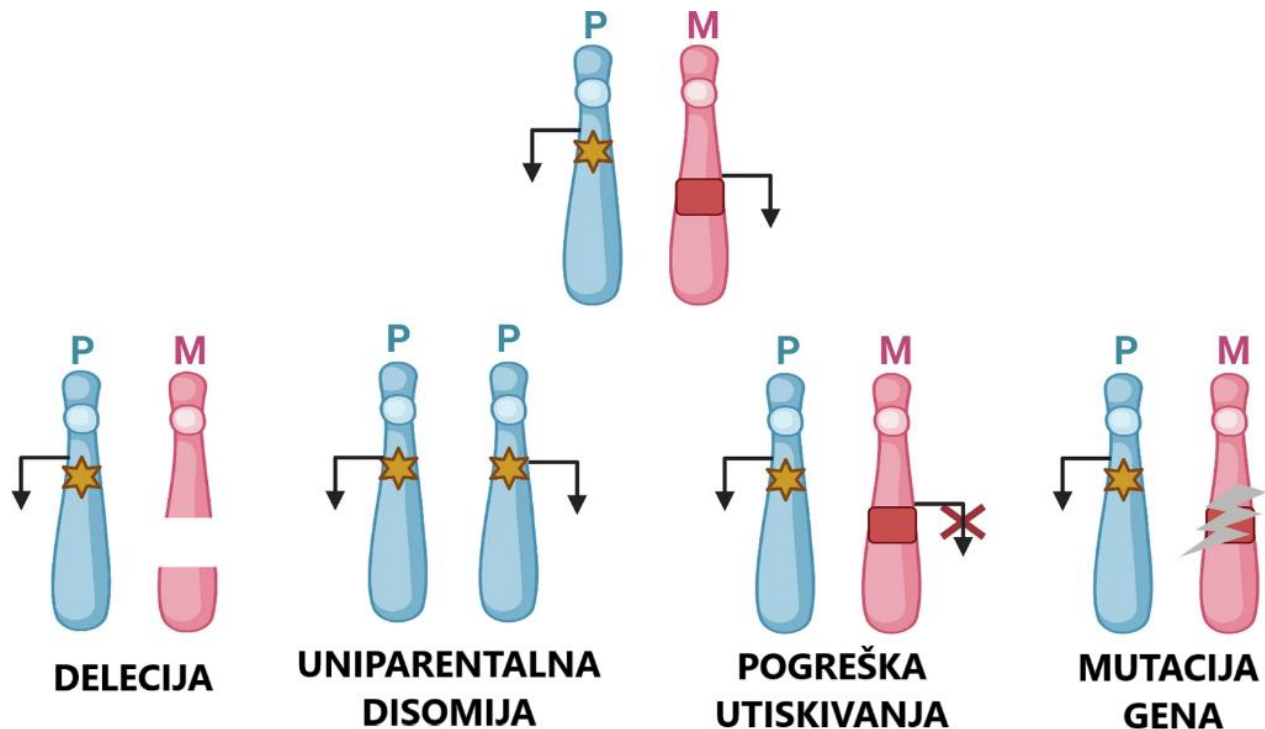
Gain of Methylation, GOM) ili hipometilacija, odnosno gubitak metilacije (engl. *Loss of Methylation*, LOM) u IC-u (Soellner i sur., 2017). Međutim, u nekim slučajevima epimutacije nastaju sekundarno zbog genetskih promjena kao što su razlike u broju kopija (engl. *Copy Number Variation*, CNV) ili razlike jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Variation*, SNV) koje obuhvaćaju utisnute gene ili različito metilirane regije (Czyz i sur., 2012).

Uniparentalna disomija nastaje kada se oba homologa kromosoma nasljeđuju od istog roditelja, a može se slučajno dogoditi tijekom formiranja jajne stanice ili spermija ili u ranom razvoju fetusa. Homolog koji sadrži neaktivan alel rezultira strukturnom disomijom, ali funkcionalnom nulisomijom (npr. majčina disomija kromosoma 15 u sindromu Prader-Willi (engl. *Prader-Willi Syndrome*, PWS) i očeva disomija kromosoma 15 u sindromu Angelman (engl. *Angelman Syndrome*, AS).

Razlike u broju kopija gena koje obuhvaćaju delecije i duplikacije također su česti mehanizam nastanka bolesti koje nastaju zbog poremećaja genomskog utiskivanja (Slika 3). Naime, delecija aktivnog nemetiliranog alela oponaša oblik bez ekspresije gena (engl. *Loss of Function*, LOF), a duplikacija dovodi do povećane razine ekspresije. Delecija neekspimiranog alela ne utječe na fenotip, ali se može prenositi na sljedeću generaciju. Kod nekih poremećaja genomskog utiskivanja delecije čine većinu slučajeva, npr. kod AS-a i PWS-a. Mogu se pojaviti „*de novo*” ili mogu biti uzrokovane naslijeđenim kromosomskim preraspodjelama (npr. Robertsonova translokacija) (Bajrami i Spiroski, 2016).

Do danas su točkaste mutacije u utisnutim genima prijavljene samo za sindrom Beckwith-Wiedemann (engl. *Beckwith-Wiedemann Syndrome*, BWS), sindrom Russell-Silver (engl. *Russell-Silver Syndrome*, RSS) i AS. Kod AS-a točkaste mutacije u genu *UBE3A* (engl. *Ubiquitin-protein Ligase E3A*) javljaju se u približno 10–15% slučajeva, a 30% se nasljeđuje. Mutacije unutar kodirajuće sekvence gena *CDKN1C* (engl. *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1C*) mogu dovesti do razvitka fenotipova karakterističnih za BWS i RSS. U 5% sporadičnih i 20% obiteljskih slučajeva BWS-a, nađene su mutacije gena *CDKN1C* koje su raspoređene po cijelom kodirajućem području i uzrokuju gubitak njegove funkcije (Kalish i sur., 2013). Prema dosadašnjim istraživanjima mutacije gena *CDKN1C* koje rezultiraju povećanjem njegove ekspresije uzrokuju obiteljski RSS. Te se mutacije nalaze u maloj, očuvanoj regiji gena (PCNA-vezujuća domena) koja sadrži 10 aminokiselinskih ostataka (Sabir i sur., 2019). Nasuprot tome, mutacije koje uzrokuju

gubitak funkcije gena *IGF2* i kliničku sliku RSS-a obuhvaćaju cijeli gen i različite vrste mutacija (besmislene, pogrešne, pomak okvira čitanja, insercije). Važno je napomenuti da se neke molekularne promjene mogu dogoditi postzigotno, što rezultira mozaičnom raspodjelom. Mozaicizam može prikriti odnos genotip-fenotip, a također može otežati molekularnu dijagnozu ako analizirano tkivo nije ili je slabo epigenetski modificirano (Binder i sur., 2020).



Slika 3. Shematski prikaz mehanizama genomske utiskivanja. Na slici su prikazani ideogrami očevog (P, plava boja) i majčinog (M, ružičasta boja) kromosoma. Utisnuti gen ekspimiran s očevog alela prikazan je kao žuti heksagram, a utisnuti gen ekspimiran s majčinog alela prikazan je kao crveni kvadrat. Patološka stanja koja utječu na obrazac ekspresije utisnutih gena uključuju deleciju kromosoma, očevu uniparentalnu disomiju (prisutna dva kromosoma naslijeđena od oca, a gubi se kopija gena ekspimiranog s majčinog alela), pogrešku utiskivanja (rezultat epigenetske disregulacije bez promjene sekvence DNA) i mutaciju gena (preuzeto i prilagođeno prema Chao i sur., 2022).

1.2 Bolesti uzrokovane genomskim utiskivanjem

Bolesti koje nastaju zbog poremećaja genomskog utiskivanja u općoj populaciji se rijetko pojavljuju, a karakteriziraju ih vrlo teške kliničke slike prvenstveno zahvaćajući rast djeteta, metabolizam, razvitak živčanog sustava (Eggerman i sur., 2015), poremećene prehrambene navike, smanjene intelektualne sposobnosti te povećan rizik od nastanka tumora. Iako većina poremećaja dijeli slične molekularne i kliničke karakteristike, svaka bolest se smatra zasebnim entitetom. Simptomi specifični za svaki sindrom prisutni su od rođenja te u ranom djetinjstvu, ali se također mogu identificirati u prenatalnom razdoblju djetetova života (Elbracht i sur., 2020). Malformacijski sindromi koji nastaju zbog epigenetskih i genetskih promjena i koji će u ovom radu biti detaljno razrađeni su PWS i AS (posljedica poremećaja genomskog utiskivanja na kromosomu 15) te BWS i RSS (posljedica genomskog utiskivanja na kromosomu 11) (Bajrami i Spiroski, 2016).

1.2.1. Struktura i geni kromosomske regije 15q11.2-q13

Regija 15q11.2-q13 odgovorna je za nastanak PWS-a i AS-a. Može se podijeliti u četiri podregije kao što je vidljivo na Slici 4, a to su:

1. Podregija koja sadrži četiri biparentalno izražena gena:

- *NIPA1* (engl. *Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman Syndrome Region Protein 1*)
- *NIPA2* (engl. *Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman Syndrome Region Protein 2*)
- *CYFIP1* (engl. *Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 1*)
- *GCP5* (engl. *Tubulin Gamma Complex Component 5*)

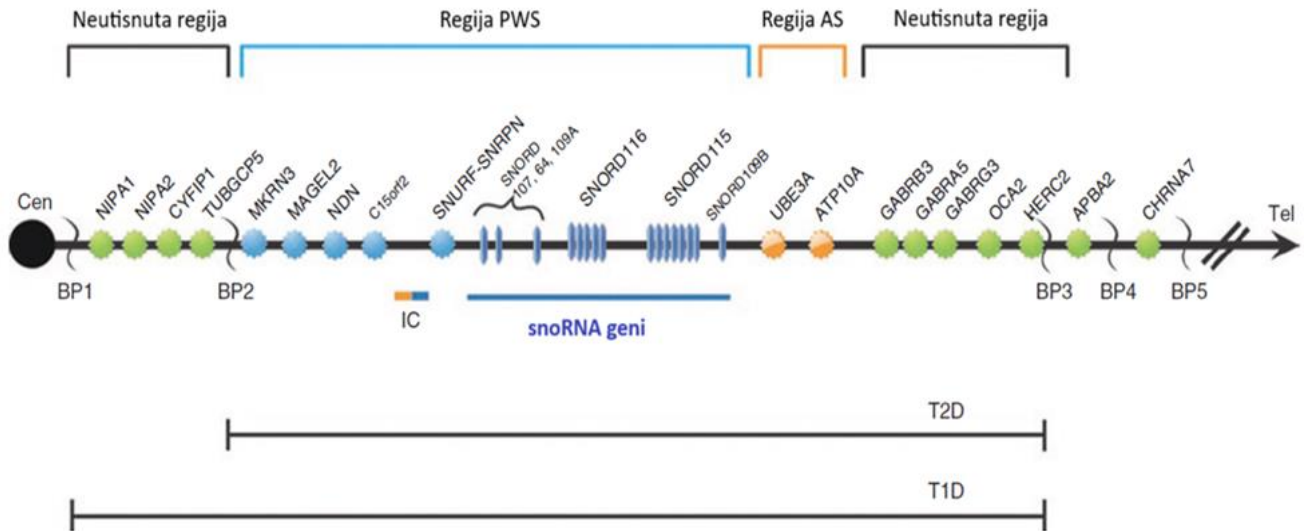
2. Podregija PWS koja sadrži gene koji se eksprimiraju s očevog kromosoma 15:

- *MKRN3* (engl. *Makorin Ring Finger Protein 3*)
- *MAGEL2* (engl. *MAGE Family Member L2*)
- *NDN* (engl. *Necdin Protein*)
- bicistronski *SNURF-SNRPN* (engl. *SNRPN Upstream Reading Frame Protein*)
- *C15orf2* (engl. *Chromosome 15 Open Reading Frame 2*)
- mali nukleolarni RNA geni (engl. *Small Nucleolar RNA, snoRNA*)
- nekoliko „antisense” transkriptata (uključujući „antisense” transkript za *UBE3A*)

3. Podregija AS koja sadrži gene *UBE3A* i *ATP10A* (engl. *ATPase Phospholipid Transporting 10A*) koji se eksprimiraju s majčinog kromosoma 15

4. Neutisnuta podregija koje sadrži grupu od:

- tri gena GABA receptora
- gen za okulokutani albinizam tipa 2 (engl. (engl. *Oculocutaneous Albinism II, OCA2*)
- gen *HERC2* (engl. engl. *HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2*) (Cassidy i sur., 2012)



Slika 4. Shematski prikaz kromosomske regije 15q11-2-q13. Podregija PWS (prikazana plavom bojom) sadrži gene *MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN* i *SNURF-SNRPN* i 6 snoRNA gena koji su eksprimirani samo s očevog alela. Geni *UBE3A* i *ATP10A* (prikazani narančastom bojom), koji se nalaze u AS podregiji, eksprimiraju se s majčinog alela. Bipartitni centar za utiskivanje nalazi se proksimalno od bicistroničkog *SNURF-SNRPN* gena i unutar 2,5 Mb PWS/AS utisnutog područja. Skupina gena GABA receptora (*GABRB3*, *GABRA5* i *GABRG3*), *OCA2* i *HERC2* nije utisnuta i imabiparentalnu ekspresiju (prikazano zelenom bojom). Valovite okomite crte označavaju 5 specifičnih mjesta loma tzv. točke loma (engl. *breakpoints*, BP), BP1 do BP5. Uobičajena mjesta loma su BP1 do BP3, a u rijetkim slučajevima delecija obuhvaća distalna mjesta loma BP4 ili BP5. Između BP1 i BP2 nalaze se četiri, neutisnuta gena, *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1* i *GCP5*. Delecija tipa I proteže se od BP1 do BP3, a delecija tipa II od BP2 do BP3 (preuzeto i prilagođeno prema Cassidy i sur., 2012).

Izražavanje utisnutih gena u regiji kromosoma 15q11.2-q13 kontrolira bipartitni centar za utiskivanje koji uključuje egzon 1 gena *SNURF-SNRPN*. U slučaju nastanka PWS-a, ovaj gen podliježe diferencijalnoj metilaciji otoka CpG, pri čemu otok CpG na očevom alelu ostaje

nemetiliran dok se regija na alelu koja se nasljeđuje od majke metilira (Chamberlain i Lalande, 2010). Nadalje, gen *NDN* je uključen u regulaciju duljine aksona središnjeg živčanog sustava te se smatra da ima ulogu u regulaciji brzine disanja. Gen *MAGEL2* kodira protein koji se nalazi u hipotalamusu mozga, a novija istraživanja pokazuju da može biti uključen u poremećaje autističnog spektra. Ovaj gen regulira pravilan cirkadijalni ritam, razvoj strukture mozga te reprodukciju i plodnost. Gen *MKRN3* stvara specifične proteine koji se nazivaju makorini, a oni su uključeni u regulaciju hormona i preuranjeni pubertet (Angulo i sur., 2015). Novija istraživanja pokazuju da je grupa gena *SNORD116* ključna za višestruke kliničke značajke PWS-a, kao što su infantilni problemi s hranjenjem, neonatalna hipotonija, brzo dobivanje na tjelesnoj težini do druge godine starosti, hiperfagija, hipogonadizam, kašnjenje u razvoju/intelektualna nesposobnost te problemi s govorom i ponašanjem. Ipak, točna funkcija svakog od gena koji su važni pri određivanju fenotipa PWS-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, dok je u slučaju AS-a poznato da su mutacije gena *UBE3A* odgovorne za nastanak gotovo svih glavnih kliničkih kriterija prema kojima se dijagnosticira sindrom (Cassidy i sur., 2012).

Kromosomska regija 15q11.2-q13 podložna je strukturnim preraspodjelama kao što su delecije, translokacije i duplikacije zbog prisutnosti ponavljanja s malim brojem kopija (engl. *Low-copy Repeats*, LCRs). Sekvence LCR dugačke su otprilike 250-400 kb te uzrokuju nehomologo uparivanje i promijenjenu rekombinaciju regije 15q11.2-q13 tijekom mejoze. Postoji pet specifičnih mjesta lomova tzv. točki lomova (engl. *breakpoints*) duž dugog kraka kromosoma 15, a to su BP1, BP2, BP3, BP4 i BP5. Dvije glavne točke loma, BP1 i BP2, nalaze se bliže centromeri. Bliže telomeri se nalazi najčešća točka loma BP3. U rjeđim slučajevima, prisutne su točke loma BP4 i BP5. Ovisno o veličini delecije i mjestu na kojem se nalazi točka loma, postoje dvije vrste karakterističnih delecija, tip I i tip II. Delecija tipa I se proteže se od BP1 do BP3 (veličine oko 6 Mb), a delecija tipa II od BP2 do BP3 (oko 5,3 Mb). Budući da je delecija tipa I veća i obuhvaća dodatna 4 neutisnuta gena, povezana je sa većim brojem poremećaja i težom kliničkom slikom (Cheon, 2016).

1.2.1.1 Sindrom Prader-Willi

Sindrom Prader-Willi je složeni neurorazvojni poremećaj s prevalencijom nastanka 1:20 000. Ime je dobio prema švicarskim znanstvenicima Andrei Praderu i Heinrichu Williju koji su ga prvi

opisali 1956. godine (Butler, 2023). Osobe oboljele od PWS-a imaju vrlo tešku kliničku sliku, a glavni i sporedni dijagnostički kriteriji prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji za sindrom Prader-Willi*

GLAVNI KRITERIJI (N = 12)	SPOREDNI KRITERIJI (N = 6)
Neonatalna infantilna hipotonija	Smanjeno kretanje fetusa i slab plač u djetinjstvu
Problemi s hranjenjem u djetinjstvu	Problemi u ponašanju (izljevi bijesa, agresivnost)
Prekomjerno dobivanje na tjelesnoj težini	Poremećaj spavanja
Dolichocefalija	Niski rast (nedostatak hormona rasta)
Usko lice	Hipopigmentacija (svjetla kosa i koža)
Uski bifrontalni promjer	Male šake i stopala
Bademaste oči	
Mala usta s tankom gornjom usnicom	
Spušteni kutevi usana	
Hipogonadizam	
Blaga do umjerena mentalna retardacija	
Opsjednutost hranom	

*preuzeto i prilagođeno prema Holm i sur., 1993

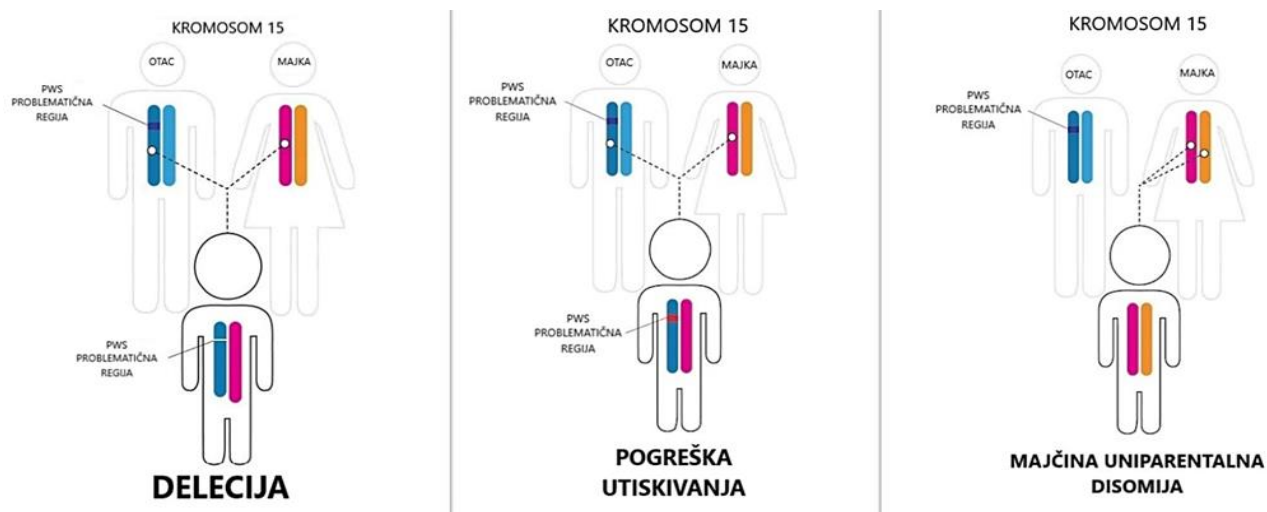
Kratice: N – broj glavnih i sporednih kliničkih kriterija za sindrom Prader-Willi

1.2.1.1.1 Molekularna osnova sindroma Prader-Willi

Sindrom Prader-Willi, odnosno, nedostatak funkcionalne očeve kopije regije 15q11-13 (Slika 5), može biti posljedica:

- de novo delecije 15q11-q13 očevog podrijetla
- majčine uniparentalne disomije
- poremećaja utiskivanja (očev kromosom ispoljava majčin utisak)

Najčešći uzrok nastanka PWS-a je delecija očevog kromosoma 15 u regiji 15q11.2-q13, veličine 5-6 Mb, što pogađa 65-75% oboljelih. Kod približno 8% PWS-a prisutna je delecija atipične veličine (tj. nije tipa I ili II) različite etiologije. Na primjer, rijetki uzrok takve delecije može biti rezultat nebalansirane translokacije (Kim i sur., 2012). Delecije koje se veličinom razlikuju od tipičnih delecija nađenih kod PWS-a mogu uzrokovati drugačiji fenotip što je od važnosti u određivanju odnosa genotip-fenotip (Butler, 2023).



Slika 5. Shematski prikaz molekularnih uzroka nastanka sindroma Prader-Willi. A. Delecija: dio kromosoma 15 naslijeđen od oca nedostaje ili je izbrisan u PWS problematičnoj regiji. B. Pogreška utiskivanja: mutacija u regiji PWS uzrokuje neaktivnost genetskog materijala očevog kromosoma 15. C. Majčina uniparentalna disomija: osoba naslijeđi dvije kopije kromosoma 15 od majke, a nijednu od oca (preuzeto i prilagođeno prema Web1).

Također, do nastanka bolesti može doći zbog majčine UPD-e na kromosomu 15 što je slučaj kod 20-30% pacijenata. Istraživanja su pokazala da je nastanak majčine UPD-e povezan s poodmaklom dobi majke (Cassidy i sur., 1997). Majčina UPD u PWS-u je karakterizirana nasljeđivanjem obje kopije homologa 15 od majke, umjesto jedne majčine, a jedne očeve kopije. Ona je u većini slučajeva heterodisomična i posljedica je greške u mejozi u majčinim gametama. Javlja se kao posljedica nerazdvajanja tijekom mejoze I u gametama majke i zatim gubitka očevog kromosoma 15 nakon oplodnje, u tzv. „rescue” (spašavajućem) događaju, kojim se izbjegava spontani pobačaj ranog embrija kojeg bi uzrokovala trisomija kromosoma 15 (Angulo i sur., 2015). Jedan od uzroka UPD-e kromosoma 15 može biti mali prekobrojni marker porijeklom od kromosoma 15, koji sadrži kritičnu regiju PWS/AS. Procjenjuje se da je oko 5% malih prekobrojnih marker kromosoma povezano s UPD-om.

Otprilike 1–3% slučajeva PWS-a je uzrokovan poremećajem utiskivanja u užem smislu. U većini slučajeva uzrok je epimutacija koju karakterizira biparentalno nasljeđivanje kromosoma 15,

ali s majčinim obrascem metilacije. U navedenim epimutacijama nisu nađene promjene u sekvenci DNA i smatraju se slučajnim pogreškama u procesu utiskivanja ili u ranoj embriogenezi u rijetkim slučajevima somatskog mozaicizma (Kalsner i Chamberlain, 2015).

Međutim, kod oko 15% slučajeva utvrđena je vrlo mala delecija (7,5 do >100 kb) u PWS IC regiji smještenoj na 5' kraju *SNRPN* gena i promotora. Kod otprilike 50% takvih slučajeva delecija IC-a naslijeđena je od zdravog oca koji ima deleciju IC na kromosomu 15 naslijeđenom od njegove majke. Drugih 50% slučajeva čine delecije IC-a na kromosomu 15 naslijeđenom od oca koje nastaju „*de novo*“, a mogu nastati tijekom spermatogeneze ili nakon oplodnje (Ohta i sur., 1999).

1.2.1.2 Sindrom Angelman

Ovaj sindrom prvi je opisao znanstvenik Harry Angelman 1965. godine, a učestalost bolesti je 1:12 000. Klinička slika bolesnika vrlo je kompleksna (Tablica 2) (Bird, 2014).

Tablica 2. Dijagnostički kriteriji za sindrom Angelman*

GLAVNI KRITERIJI (N = 10)	SPOREDNI KRITERIJI (N = 5)
Intelektualne poteškoće	Skolioza
Poremećaji u kretanju (širok hod , ruke uzdignute u vis)	Hipopigmentacija
Nerazvijen govor	Pojačana osjetljivost na toplinu
Karakteristično ponašanje (izražen smijeh, uzbuđenost)	Poremećaji u rastu
Napadaji	Široka i velika usta
Mikrocefalija	Široko razmaknuti zubi
Poremećeni elektroencefalogram	
Problemi s hranjenjem	
Fascinacija vodom i zgužvanim predmetima	
Poremećaji spavanja	

*preuzeto i prilagođeno prema Bird, 2014

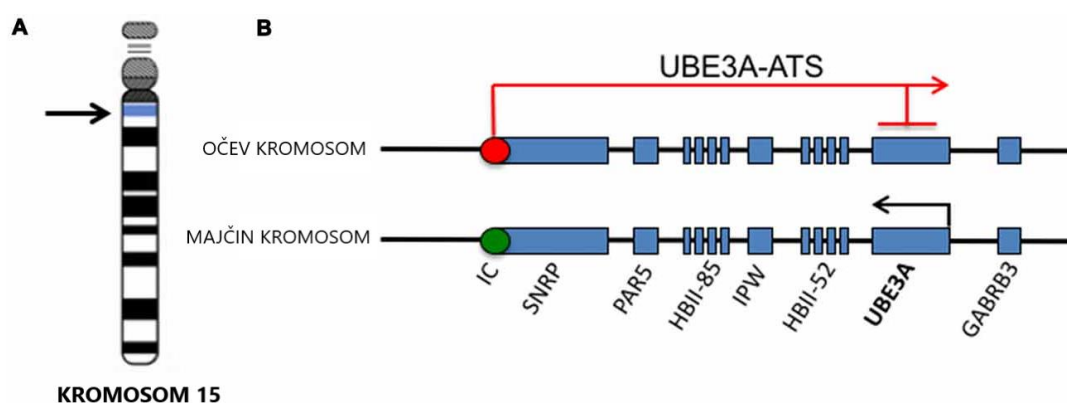
Kratice: N –broj glavnih i sporednih kliničkih kriterija za sindrom Angelman

1.2.1.2.1 Molekularna osnova sindroma Angelman

Sindrom Angelman, odnosno, nedostatak funkcionalne majčine kopije regije 15q11-13 (Mabb i sur., 2011), može nastati kao rezultat:

- „*de novo*” delecije 15q11-13 majčinog podrijetla
- točkaste mutacije gena *UBE3A* unutar regije 15q11-q13
- očev metilacijski obrazac na majčinom kromosomu 15
- očeve uniparentalne disomije

Gen *UBE3A* je u zdravim neuronima utisnut, odnosno transkripcijski inaktiviran na alelu koji potječe od oca, a aktivan je samo na alelu koji potječe od majke. Dakle, izražava se s majčinog alela u zrelih neuronima (Slika 6), dok se bialelno izražava u perifernim stanicama, glji i nezrelim neuronima. Ovaj gen kodira za E3 ubikvitin ligazu koja spaja ubikvitinske skupine u jedinstveni skup proteina. Takvi ubikvitirani proteini razgrađuju se kroz sustav ubikvitin-proteasom (Sell i Margolis, 2015).



Slika 6. Shematski prikaz utiskivanja gena *UBE3A* kod sindroma Angelman. **A.** Unutar kromosomske regije 15q11-q13 gen *UBE3A* majčinski je utisnut u mozgu. **B.** Očinski eksprimirani „*antisense*” transkript (*UBE3A-ATS*) započinje u nemetiliranom centru za utiskivanje (crveni krug) očinskog alela i preklapa se s *UBE3A*, utišavajući očinsko izražavanje gena u mozgu. Utiskivanje rezultira izražavanjem isključivo majčinskog alela u mozgu jer je majčinski centar za utiskivanje metilirani (zeleni krug) (preuzeto i prilagođeno prema Khatri i Man, 2019).

Put ubikvitin-proteasom važan je za pravilan prijenos signala u stanicama, napredovanje staničnog ciklusa, regulaciju transkripcije i popravak molekule DNA. Također, važan je za regulaciju sinaptičke plastičnosti te regulaciju rasta dendrita (Dagli i sur., 2011). Međutim, zbog mutacije gena *UBE3A*, kod AS-a ne dolazi do pravilne ubikvitinacije što dovodi do smanjene razine

protein supstrata za *UBE3A*. Takva promjena u razini supstrata povezana je s raznolikošću fenotipova AS-a te razvojem autizma (Sell i Margolis, 2015). Postoji više od 60 mutacija gena *UBE3A*, a njih čak 60-70% uključuje duplikacije i mikrolelecije koje dovode do pomicanja okvira čitanja. Oko 25% mutacija ovog gena uključuje „*missense*” i „*nonsense*” mutacije, velike delecije i složene preraspodjele (Dagli i sur., 2011).

1.2.2 Struktura i geni kromosomske regije 11p15.5-11p15.4

Kromosomska regija 11p15.5-11p15.4 obuhvaća sljedeće domene:

- telomerna domena koja obuhvaća gene:
 - *H19* (engl. *H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript*)
 - *IGF2* (engl. *Insulin Like Growth Factor 2*)
- centromerna domena koja obuhvaća gene:
 - *KCNQ1OT1* (engl. *KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*)
 - *KCNQ1* (engl. *Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1*)
 - *CDKN1C* (engl. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C*)

Sindrom Beckwith-Wiedemann i sindrom Russell-Silver uzrokuju molekularne promjene unutar grupa utisnutih gena kromosomske regije 11p15.5-11p15.4. U toj regiji postoje dvije funkcionalno neovisne domene – telomerna i centromerna, a svaka ima vlastitu kontrolnu regiju utiskivanja. Monoalelnu ekspresiju utisnutih gena, ovisno o roditeljskom porijeklu) reguliraju DMR-ovi. Svaka domena kontrolirana je svojom ICR (kontrolna regija utiskivanja 1 (engl. *Imprinting Control Region 1*, ICR1) u telomernoj regiji i kontrolna regija utiskivanja 2 (engl. *Imprinting Control Region 2*) u centromernoj regiji) i različito je metilirana.

Telomerna domena sadrži ICR1, koja se nalazi 2 kb uzvodno od gena. Ona regulira ekspresiju gena *H19*, koji kodira lncRNA i eksprimira se s majčinog alela i gena *IGF2*, a on kodira faktor rasta i eksprimira se s očevog alela. Regija ICR1 je metilirana isključivo na očevom alelu. CCCTC-vezujući faktor (CTCF) visoko je očuvan protein cinkovog prsta i najpoznatiji je kao transkripcijski faktor. Može funkcionirati kao aktivator transkripcije, represor ili izolatorski protein, blokirajući komunikaciju između pojačivača i promotora. Ima važnu ulogu u utišavanju gena *IGF2*, tako što se veže na ICR1. Na majčinom alelu, ICR1 je nemetilirana i na nju se može vezati izolator protein CTCF koji sprječava aktivaciju promotora *IGF2*, a to rezultira utišavanjem *IGF2* i aktivacijom

H19 gena. Na očinskom alelu, CTCF koji je osjetljiv na metilaciju ne može se vezati na metilirani ICR1, što rezultira aktivacijom *IGF2* i utišavanjem *H19* (Maeda i sur., 2014). Gen *H19* kodira lncRNA koja se eksprimira s majčinog alela u embriju i posteljici, dok je u većini tkiva utišana nakon rođenja (osim u srčanom i skeletnom mišiću). Također, može imati ulogu u supresiji i stvaranju tumora. Gen *IGF2* je čimbenik rasta koji se eksprimira s očevog alela u embriju i posteljici, a bialelno je ekspimiran u jetri nakon djetetova rođenja (Wang i sur., 2020). Povećana ekspresija *IGF2* tijekom fetalnog i ranog djetinjstva dovodi do prekomjernog rasta, što je jedna od glavnih značajki BWS-a (Choufani i sur., 2013).

Centromerna domena uključuje ICR2 koja regulira ekspresiju nekoliko gena, uključujući *KCNQ1OT1*, *KCNQ1* i *CDKN1C*. Također se može nazivati različito metiliranom regijom 2 (engl. *Differentially Methylated Region 2*, DMR2) (Fontana i sur., 2021). Centromernu domenu kontrolira DMR početnog mjesta transkripcije *KCNQ1OT1*, a nalazi se na 5' kraju *KCNQ1OT1* i uključuje regiju promotora za *KCNQ1* (Choufani i sur., 2013). Gen *KCNQ1* se izražava s alela porijeklom od majke tijekom rane embriogeneze, a kodira α -podjedinicu kalijevog kanala. Postaje bialelno izražen tijekom fetalnog razvoja. Gen *KCNQ1OT1* kodira lncRNA koja je izražena s očevog alela te predstavlja „*antisense*” transkript za *KCNQ1* (Fontana i sur., 2021). Zajedno s ICR2 kontrolira ekspresiju gena unutar svoje domene. Gen *CDKN1C* kodira G1 inhibitor kinaze ovisan o ciklinu te regulira rast i proliferaciju stanica, a izražava se u embriju i posteljici, kao i u postnatalnom razdoblju (Choufani i sur., 2013). Na majčinom alelu je ICR2 metilirana, a na očevom alelu je nemetilirana. Ekspresija utišnutog gena *KCNQ1OT1* je majčinski utišana, a očinski izražena, a *CDKN1C/KCNQ1* su majčinski izraženi i očinski utišani. Dakle, kod zdravih osoba, alel ICR1 oca je metiliran dok je alel ICR1 majke nemetilirana. Očev ICR2 alel je nemetilirana dok je majčin ICR2 alel metiliran. Stoga se putem alela oca izražavaju *IGF2* i *KCNQ1OT1*, dok se putem alela majke izražavaju *H19* i *CDKN1C*.

1.2.2.1 Sindrom Beckwith-Wiedemann

Sindrom Beckwith-Wiedemann je tzv. sindrom prekomjernog rasta kojeg su prvi put klinički opisali američki pedijatrijski patolog John Bruce Beckwith 1963. godine i njemački pedijatar Hans-Rudolf Wiedemann 1964. godine, neovisno jedan o drugome. Molekularna etiologija ove bolesti je vrlo složena pa je sindrom redefiniran kao Beckwith-Wiedemannov spektar (BWSp). Stoga, bolest obuhvaća pojedince koji ispunjavaju kriterije BWSp-a s molekularnim nalazom, ali

može uključivati i pojedince s atipičnom prezentacijom bolesti (ispunjavaju kriterije prema kliničkoj slici, ali bez potvrđene molekularne dijagnoze BWS-a). Naposljetku, treću skupinu obuhvaćaju pojedinci koji prema kliničkoj slici (osim prekomjernog rasta) ne ispunjavaju kriterije, ali je kod njih otkrivena molekularna anomalija u regiji kromosoma 11p15.5p15.4. Prevalencija nastanka bolesti je 1:10 000 (Wang i sur., 2020). Klinička slika BWS-a vrlo je teška, što je prikazano u Tablici 3 (Berland, 2023).

Tablica 3. Dijagnostički kriteriji za sindrom Beckwith-Wiedemann*

GLAVNI KRITERIJI (N = 7)	SPOREDNI KRITERIJI (N = 9)
Makroglosija	<i>Naevus flammeus</i> na čelu
Makrosomija	Neonatalna hipoglikemijaa
Omfalokela	Velika porođajna težina
Embrionalni tumori	Dijastaza rektusa
Zarezi na ušnim resicama	Umbilikalna hernija
Poremećaji u radu bubrega i mokraćnog sustava	Kardiomiopatija
Poteškoće trbušnog zida	Organomegalija
	Karakteristične grube crte lica
	Polidaktilija

*preuzeto i prilagođeno prema Fontana i sur., 2021)

Kratice: N – broj glavnih i sporednih kliničkih kriterija za sindrom Beckwith-Wiedemann

Djeca oboljela od BWS-a podložna su nastanku embrionalnih tumora, a koji će se tumor razviti ovisi o molekularnom uzroku nastanka bolesti pa tako bolesnici s pojačanom metilacijom IC1 imaju predispoziciju za nastanak Wilmsovog tumora bubrega, dok bolesnici s hipometilacijom IC2 imaju predispoziciju za nastanak hepatoblastoma. Osobe s mutacijom gena *CDKN1C* predisponirani su nastanak neuroblastoma (Eggerman i sur., 2022).

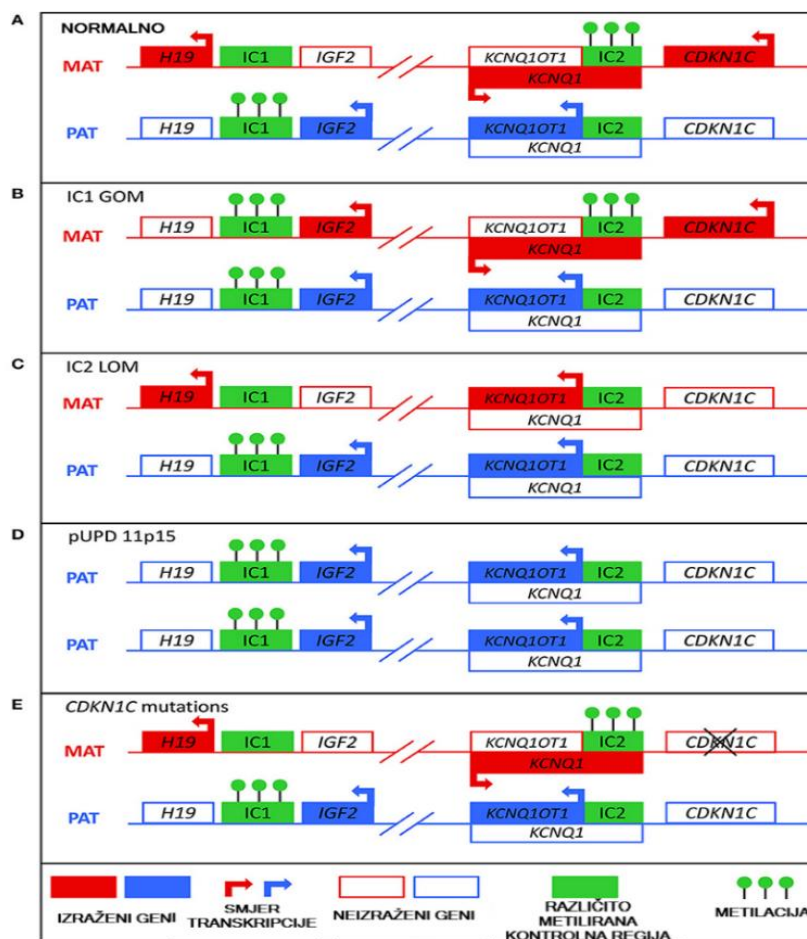
1.2.2.1.1 Molekularna osnova sindroma Beckwith-Wiedemann

Sindrom Beckwith-Wiedemann može nastati kao rezultat:

- promijenjene metilacije DNA u regiji 11p15
 - hipometilacija majčine ICR2 (50-60%)

- hipermetilacija majčine ICR1 (5-10%)
- očeve uniparentalne disomije (20%)
- točkaste mutacije gena *CDKN1C* na majčinom alelu (5%)
- delecije, duplikacije i translokacije u regije 11p15 (< 5%)

Molekularni mehanizmi koji dovode do nastanka BWS-a prikazani su na Slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka sindroma Beckwith-Wiedemann. **A.** U normalnim stanicama, očinski alel je metilirani u IC1, a majčinski alel je metilirani u IC2. **B.** U IC1 pojačanju metilacije (IC1 GOM) i majčin i očevo alel su metilirani na IC1, što dovodi do smanjene regulacije *H19* i prekomjerne ekspresije *IGF2*. **C.** Kod IC2 gubitka metilacije, majčini alel gubi metilaciju na IC2, što dovodi do prekomjerne ekspresije *KCNQ1OT1* i smanjene regulacije *CDKN1C*. **D.** Kod očinske uniparentalne disomije 11p15 postoje dvije kopije očovog kromosoma, što dovodi do prekomjerne ekspresije *IGF2* i smanjene ekspresije *CDKN1C*. **E.** Mutacije gena *CDKN1C* majke mogu dovesti do gubitka funkcije (preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur., 2020).

1.2.2.2 Sindrom Russell-Silver

Ovaj sindrom opisali su Henry Silver 1953. godine te Alexander Russell 1954. godine, neovisno jedan o drugome, a glavni i sporedni dijagnostički kriteriji RSS-a prikazani su u Tablici 4 (Őunap, 2016).

Tablica 4. Dijagnostički kriteriji za sindrom Russell-Silver*

GLAVNI KRITERIJI (N = 6)	SPOREDNI KRITERIJI (N = 11)
Maleni za gestacijsku dob	Trokutasto lice
Postnatalni zastoj u rastu	Odgođeno zatvaranje prednje fontanele
Relativna mikrocefalija	Mikrognatija
Frontalno ispupčenje i istaknuto čelo	Loša denticija
Asimetrija dijelova tijela	Spušteni kutevi usana
Poteškoće s hranjenjem (nizak indeks tjelesne mase)	Visok i piskutav glas
	Klinodaktilija 5. prsta
	Skolioza
	Pretjerano znojenje
	Nerazvijen govor
	Nerazvijena motorika

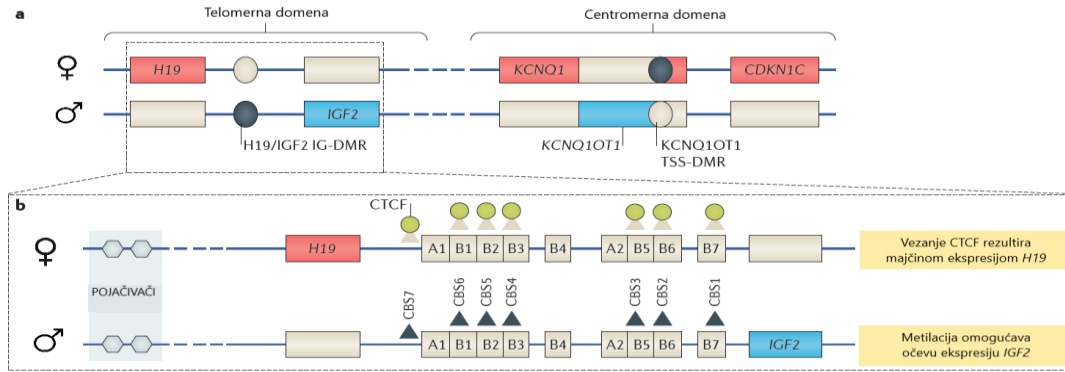
*preuzeto i prilagođeno prema Ishida, 2016

Kratice: N – broj glavnih i sporednih kliničkih kriterija za sindrom Russell-Silver

1.2.2.2.1 Molekularna osnova sindroma Russell-Silver

Sindrom Russell-Silver je klinički i genetički heterogeni poremećaj jer su u nastanak bolesti uključeni kromosomi 7, 11 i 14. Genetski i epigenetski poremećaji mogu se dijagnosticirati kod 50% pacijenta sa specifičnim kliničkim obilježjima za RSS (Eggerman i sur., 2010). Molekularni uzroci nastanka ovog sindroma vidljivi na slici su:

- epigenetske promjene u kontrolnoj regiji za utiskivanje *H19/IGF2* (38%) (Slika 8)
- majčina uniparentalna disomija kromosoma 7 (10%)
- submikroskopske kromosomske aberacije (1%)



Slika 8. Shematski prikaz utisnutih domena kromosomske regije 11p15 odgovornih za nastanak sindroma Russell-Silver. **a.** Plavi pravokutnici predstavljaju očinski izražene gene *IGF2* i *KCNQ1OT1*. Crveni pravokutnici predstavljaju majčinski izražene gene *CDKN1C*, *KCNQ1* i *H19*. Elipse označavaju DMR-ove – tamnosive elipse predstavljaju metilirane DMR-ove, dok elipse bež boje predstavljaju nemetilirane DMR-ove. **b.** Struktura *H19/IGF2* IG-DMR. Ova DMR sadrži kratke ponavljajuće blokove sekvenci i sadrži sedam veznih mjesta za CTCF (zeleni krugovi). Vežanje CTCF-a na nemetilirani majčin DMR blokira interakcije između *IGF2* promotora i pojačivača nizvodno od *H19*, što rezultira majčinom ekspresijom *H19*. Metilacija ICR1 na očinskom alelu sprječava vežanje CTCF-a, omogućujući interakciju između *IGF2* promotora i pojačivača, a time i očinsku ekspresiju *IGF2*. Bež trokuti označavaju nemetilirana mjesta vezanja CTCF-a. Tamnosivi trokuti označavaju metilirana CTCF mjesta vezanja (preuzeto i prilagođeno prema Wakeling i sur., 2016).

Majčina UPD kromosoma 7 uzrok je nastanka bolesti kod 10% oboljelih. Pretpostavlja se da je postnatalni zastoj u rastu oboljelih povezan sa utisnutim genima na kromosomu 7. Gen koji podliježe utiskivanju u kromosomskoj regiji 7p12.1 je *GRB10* (engl. *Growth Factor Receptor-Bound Protein 10*). Mutacija gena *GRB10* uzrokuje zastoj u postnatalnom rastu, makrocefaliju i kašnjenje u razvoju, što se smatraju glavnim fenotipskim karakteristikama RSS-a. Osim *GRB10*, postoji utisnuti gen *MEST* (engl. *Mesoderm-specific Transcript Homolog Protein*) u kromosomskoj regiji 7q32. Smatra se da ovaj gen igra ključnu ulogu u prenatalnom rastu djeteta te se može povezivati fenotipskim karakteristikama poput trokutastog lica te kašnjenja u razvoju (Eggerman i sur., 2019). Predmet proučavanja je i kromosomska regija 14q32 gdje se nalazi gen *MEG3*, a u kojoj dolazi do mikrolecija i hipometilacije. Rezultat toga je nastanak Temple sindroma koji se klinički preklapa sa RSS-om uključujući nisku tjelesnu masu pri rođenju, kašnjenje u razvoju, hipotoniju i nedostatak motoričkih vještina (Wakeling i sur., 2016).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Analizirati broj kopija i metilacijski status gena *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3* i *OCA2* kod ispitanika sa sumnjom na PWS.
2. Analizirati broj kopija i metilacijski status gena *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3* i *OCA2* kod ispitanika sa sumnjom na AS.
3. Odrediti broj kopija i metilacijski status gena *H19*, *IGF2*, *CDKN1C*, *KCNQ1* kod ispitanika sa sumnjom na BWS.
4. Odrediti broj kopija i metilacijski status gena *H19*, *IGF2*, *CDKN1C*, *KCNQ1* kod ispitanika sa sumnjom na RSS.
5. Analizirati broj kopija i metilacijski status gena *GRB10*, *MEST* i *MEG3* kod ispitanika sa sumnjom na RSS.
6. U skupini ispitanika s promijenjenim brojem kopija gena i/ili metilacijskim statusom, za svaki od navedenih sindroma napraviti usporedbu fenotipa ovisno o molekularnom mehanizmu nastanka bolesti.
7. Usporediti fenotip ispitanika kod kojih nije nađena promjena u broju kopija gena i/ili metilacijskog statusa sa skupinom ispitanika kod kojih je ista otkrivena.
8. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima iz literature.

Hipoteza ovog istraživanja je da rano i pouzdano otkrivanje točnog genetičkog uzroka (delecija, UPD i greške utiskivanja) sindroma nastalih zbog poremećaja genomskog utiskivanja primjenom tehnike molekularne citogenetike omogućuje bolje praćenje i genetsko savjetovanje bolesnika u svrhu pružanja učinkovite individualne terapije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 104 nesrodnih ispitanika s uputnom dijagnozom za PWS, AS, BWS i RSS upućenih iz Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Tablica 5). Za sve je ispitanike pribavljen informirani pristanak roditelja (skrbnika) te pohranjen u arhiv laboratorija.

Svim bolesnicima uzeto je 5 ml periferne venske krvi s antikoagulansom EDTA iz koje se izolirala molekula DNA. Uzorci su prikupljeni u svrhu analize broja kopija i metilacijskog statusa gena koji podliježu procesima genomske utiskivanja, a koji su specifični za pojedini sindrom (detaljno su navedeni u poglavlju 2) te su pohranjeni u laboratoriju Odjela za citogenetiku KBC-a Zagreb do analize primjenom metode MS-MLPA.

Tablica 5. Ispitanici uključeni u istraživanje s uputnim dijagnozama za sindrom Prader-Willi, sindrom Angelman, sindrom Beckwith-Wiedemann i sindrom Russell-Silver

	DIJAGNOZA	DJEVOJČICE	DJEČACI
PWS	(N = 41)	18	23
AS	(N = 10)	1	9
BWS	(N = 23)	13	10
RSS	(N = 30)	12	18
UKUPNO	104	43%	57%

Kratice: N – ukupan broj ispitanika za pojedini sindrom, PWS – sindrom Prader-Willi, AS – sindrom Angelman, BWS – sindrom Beckwith-Wiedemann, RSS – sindrom Russell-Silver

3.2 Izolacija genomske DNA

Kod svih bolesnika je za potrebe metode MS-MLPA izolirana genomska DNA iz 1 ml periferne venske krvi upotrebom komercijalnog seta prema protokolu proizvođača (FlexiGene DNA kit, Qiagen, Hilden, Njemačka).

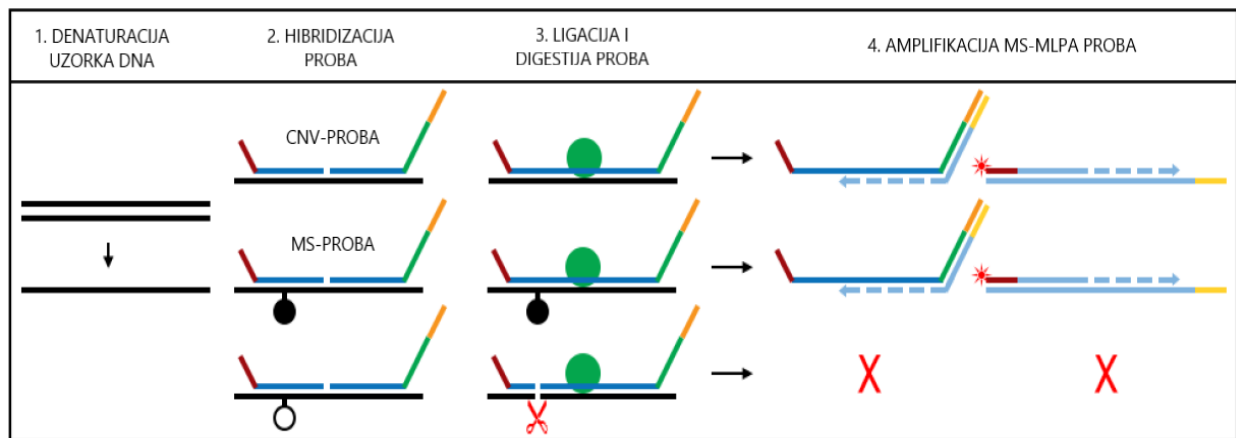
Postupak izolacije provela sam u trinaest koraka:

1. Pipetirala sam 0,5 mL pufera FG1 u epruvete za centrifugu volumena 15 mL. U svaku epruvetu sam dodala 1 mL periferne venske krvi te promiješala okretanjem epruvete pet puta.
2. Sve uzorke sam centrifugirala 5 minuta na 2000 rpm.
3. Dekantirala sam supernatant te ostavila epruvete okrenute na čistoj staničevini 2 minute, pri tome pazeći da talog ostane u epruveti.
4. U svaku epruvetu sam dodala 0,5 mL pufera peoteaze FG2/Qiagen, zatvorila te odmah vorteksirala jednu po jednu epruvetu dok se talog u potpunosti homogenizira.
5. Inkubirala sam epruvete u vodenoj kupelji na 65 °C/10 minuta.
6. U svaku epruvetu sam dodala 0,5 mL 100% izopropanola te temeljito promiješala okretanjem sve dok talog nije postao vidljiv kao nit ili gruda.
7. Sve sam uzorke centrifugirala 3 minute na 2000 rpm.
8. Dekantirala sam supernatant i nakratko okrenula epruvete na čisti komad staničevine, pazeći da talog ostane u epruveti.
9. U svaku epruvetu sam dodala 0,5 mL 70% etanola te vorteksirala 5 sekundi odmah nakon dodavanja alkohola.
10. Sve sam uzorke ponovno centrifugirala 3 minute na 2000 rpm.
11. Dekantirala sam supernatant i okrenula epruvete na čisti komad staničevine u razdoblju od 5 minuta, pazeći da talog ostane u epruveti.
12. Osušila sam talog DNA u epruvetama na zraku sve dok tekućina nije isparila (barem 5 minuta).

13. U svaku sam epruvetu dodala 0,2 mL pufera FG3 te sam vorteksirala jednu po jednu epruvetu. Otopila sam DNA inkubiranjem u vodenoj kupelji na 65 °C/1h te sam pohranila uzorke do provedbe analize MS-MLPA.

3.3 Metoda MS-MLPA

Laboratorijska metoda koja se koristi za procjenu hipermetilacije promotora ili metilacije utisnutih regija u ljudskoj DNA naziva se metilacijski osjetljiva metoda višestrukog umnažanja vezanih proba (engl. *Methylation-specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*, MS-MLPA). Koristi se u dijagnostici genetskih poremećaja jer omogućava istodobno otkrivanje promjene u broju kopija i metilacijskog profila. Svaki set MS-MLPA za analizu metilacije utisnutih regija sadrži probe koje su osmišljene tako da se vežu za regije u genomu za koje je poznato da nose metilacijske promjene (jedna kopija je metilirana u uzorcima periferne krvi). Uz navedene probe, svaki set MS-MLPA sadrži kontrolne probe za koje je poznato da se nalaze na mjestima na kojima ne postoji metilacijska modifikacija u uzorcima periferne krvi (Moelans i sur., 2017). Metoda se zasniva na hibridizaciji proba MS-MLPA, nakon čega slijedi njihovo povezivanje termostabilnom ligazom te digestija restrikcijским enzimima. Naposljetku, provodi se umnažanje proba lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) uz primjenu univerzalnog para početnica. Specifičnost ove metode je to što se umnažaju probe dodane uzorcima (Slika 9), a ne testirana DNA što omogućava amplifikaciju i kvantifikaciju oko 60 različitih sekvenci koristeći samo jedan par proba (Anđelić, 2016). Primjenom metode MS-MLPA moguće je otkriti navedene promjene genoma za koje se koristi određeni set MS-MLPA proba. Za otkrivanje ostalih promjena, kao malih (točkastih) mutacija, potrebna je analiza drugim metodama.



Slika 9. Metoda MS-MLPA provedena u četiri koraka: 1) denaturacija DNA, 2) hibridizacija specifičnih proba MS-MLPA, 3) ligacija i digestija proba, 4) amplifikacija proba MS-MLPA (preuzeto i prilagođeno prema Web2)

Provela sam MS-MLPA analizu primjenjujući specifične setove MS-MLPA proizvođača MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska). Set MS-MLPA ME28 proba koristila sam za određivanje broja kopija i metilacijskog statusa gena odgovornih za nastanak sindroma PWS i AS. Set MS-MLPA ME30 koristila sam za određivanje broja kopija i metilacijskog statusa gena odgovornih za nastanak sindroma BWS i RSS. Set ME32 koristila sam za određivanje broja kopija i metilacijskog statusa gena odgovornih za nastanak RSS-a u kromosomskim regijama 7q32, 7p12 i 14q32 (uniparentalna disomija kromosoma 7 i 14).

Postupak metode MS-MLPA:

1. dan:

A. Pripremila sam radnu koncentraciju te sam uz broj uzoraka uzela 3 referentna uzorka. Referentni uzorci su uzorci DNA dobiveni od zdravih pojedinaca s normalnim brojem kopija i statusom metilacije. Oni bi trebali biti što sličniji ispitivanim uzorcima u svim drugim aspektima, uključujući metodu izolacije DNA i izvor uzorka (periferna krv). U svaku MS-MLPA reakciju preporuča se uključiti kontrolu bez DNA. Zamijenila sam 5 μ L DNA s TE puferom (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA) kako bih provjerila postoji li kontaminacija TE pufera, MLPA reagensa,

reagensa za elektroforezu ili kapilara. Pomiješala sam uzorke i pufer ($V(\text{DNA}) + V(\text{TE}) = 5 \mu\text{L}$).

B. Provela sam denaturaciju DNA tako što sam postavila epruvete u PCR uređaj (program MLPA 1) na $98^\circ\text{C} / 5 \text{ min}$ te sam uzorke stavila na hlađenje pri temperaturi od 25°C .

C. Provela sam hibridizaciju uzoraka gdje je prvi korak bila priprema hibridizacijske glavne mješavine (engl. *master mix*): mješavina pufera i probe (po uzorku: $1,5 \mu\text{L}$ pufera MLPA + $1,5 \mu\text{L}$ set proba MLPA). Upisala sam datum, lot i rok trajanja probe s kojom sam radila te sam dodala za jedan uzorak više. Zatim sam dodala po $3 \mu\text{L}$ glavne mješavine u svaki uzorak. Naposljetku sam stavila tubice u PCR uređaj gdje se provela hibridizacijska reakcija ($95^\circ\text{C} / 1 \text{ min}$) te sam ostavila uzorke na 60°C preko noći.

2. dan:

A. Provela sam ligaciju i digestiju proba MS-MLPA. Za početak sam pripremila digestijske PCR tubice te sam izvadila uzorke iz PCR uređaja. U svaki uzorak sam dodala $3 \mu\text{L}$ ligacijskog pufera A i $10 \mu\text{L}$ visoko pročišćene H_2O . Prebacila sam po $10 \mu\text{L}$ od ukupnog sadržaja iz primarnih u sekundarne PCR tubice. Zatim sam stavila primarne i sekundarne uzorke u PCR uređaj na 48°C . Nadalje sam pripremila ligacijski i digestijski mix (Ligase-65 glavna mješavina – po uzorku: $8,25 \mu\text{L}$ visoko pročišćena H_2O , $1,5 \mu\text{L}$ ligacijskog pufera B, $0,25 \mu\text{L}$ enzima Ligase-65, $0,5 \mu\text{L}$ enzima HhaI). Napravila sam mješavinu za uzorak više. U PCR uređaju sam dodala $10 \mu\text{L}$ glavne mješavine Ligase-65 u primarne i sekundarne PCR tubice. Ligacijska i digestijska reakcija provedene su na $48^\circ\text{C}/30 \text{ min}$, $98^\circ\text{C}/5 \text{ min}$ i $20^\circ\text{C} - \infty$.

B. Provela sam umnažanje proba MS-MLPA. Za početak sam napravila glavnu mješavinu po uzorku – $3,75 \mu\text{L}$ visoko pročišćene H_2O , $1 \mu\text{L}$ mješavine početnica (engl. *primer mix*) SALSA PCR, $0,25 \mu\text{L}$ SALSA Polimeraze. Program umnažanja vidljiv je u tablici 6. U svaki uzorak sam dodala $5 \mu\text{L}$ glavne mješavine.

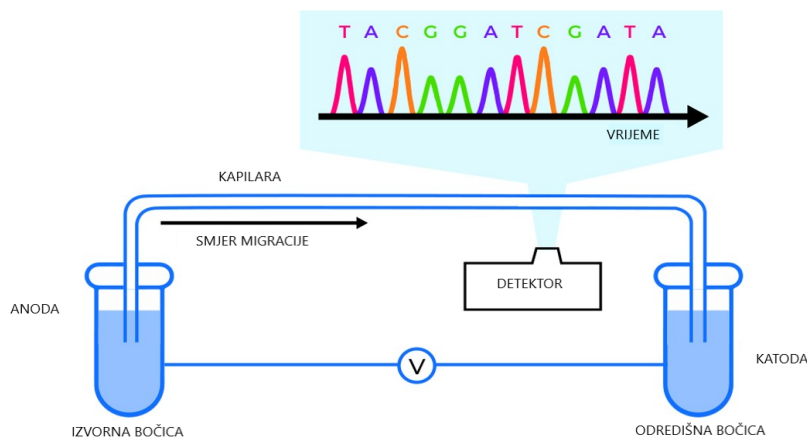
Tablica 6. Program umnažanja za provedbu metode MS-MLPA*

FAZA REAKCIJE PCR	TEMPERATURA (°C)	TRAJANJE (s)	BROJ CIKLUSA
Denaturacija	95	30	35
Sparivanje početnica	60	30	
Elongacija	72	60	
Završna sinteza	72	20	1
Hlađenje uzoraka	15		∞

*preuzeto i prilagođeno prema Web2

3.4 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza smatra se posljednjom fazom laboratorijskog postupka za dijagnostiku malformacijskih sindroma koji nastaju zbog poremećaja genomskog utiskivanja. Ova se metoda temelji na razdvajanju nukleinskih kiselina koje su fluorescentno označene prema naboju i veličini dok migriraju kroz kapilaru ispunjenu polimerom (Slika 10). Velika površina u kapilari učinkovito raspršuje toplinu, što omogućava elektroforezu pri visokome naponu te ubrzanje postupka (Dangerfield i sur., 2021).



Slika 10. Princip rada kapilarne elektroforeze (preuzeto i prilagođeno prema Web3)

U ovome istraživanju koristi se uređaj ABI3500XL (Applied Biosystems, Foster City, SAD), genetički analizator sa 24 kapilare. Pomoću njega se razdvajaju i detektiraju sve probe MS-MLPA.

Postupak provođenja kapilarne elektroforeze:

1. U „safe lock” tubicu od 1,5 mL pripremila sam smjesu formamida i LIZ-a. Po uzorku: 9 μ L Hi-Di formamida (potrebno ga je unaprijed izvaditi iz ledenice), 0,2 μ L GeneScan-500LIZ.
2. U jažicu mikrotitarske pločice odpipetirala sam 9,2 μ L smjese i 0,7 μ L PCR produkta (obavezno se zabilježava koje kolone se pune).
3. Pločicu sam prekrila gumenom septom.
4. Provela sam PCR denaturaciju (86 °C/3 min), a zatim stavila uzorke hladiti na 4 °C.
5. Centrifugirala sam uzorke u centrifugi za mikrotitarske pločice (1000 rpm/1 min).
6. Epruvete sam stavila u uređaj za kapilarnu elektroforezu gdje se razdvajaju i detektiraju sve probe MS-MLPA u trajanju od 40 minuta.

3.5 Analiza podataka MS-MLPA

Za analizu podataka MS-MLPA bolesnika koristila sam računalni program Coffalyser omogućen od proizvođača MRC Holland (Amsterdam, Nizozemska) koji je dostupan je za slobodno korištenje na mrežnoj stranici (web stranica: www.mrc-holland.com). Svaki sam uzorak analizirala u usporedbi s tri referentna uzorka.

Analiza MLPA fragmenata dobivenih kapilarnom elektroforezom sastoji se od dva koraka:

1. Analiza fragmenata – standardne postavke računalnog paketa kroz filtriranje omogućuju detekciju uzoraka koji ne zadovoljavaju parametre kvalitete. Kvaliteta reakcije MS-MLPA određuje se provjerom kvalitete uzorka DNA, reakcije MS-MLPA i odvajanja kapilarnom elektroforezom. Zbog varijabilnosti tehnike PCR (veća učinkovitost umnažanja kraćih fragmenata te moguće varijabilnosti među samim uzorcima) prije same analize potrebno je napraviti normalizaciju podataka. Standardna metoda normalizacije koja se koristi je populacijska normalizacija (engl. *Population Normalization*). Populacijska metoda normalizacije koristi sve probe u uzorku za ispravljanje preferencijalnog učinka umnažanja.

2. Usporedna analiza produkata (engl. *Comparative Analysis*) – usporedba inteziteta dobivenih signala proba kontrolnih uzoraka s testiranim uzorcima. Rezultati su dostupni za interpretaciju u nekoliko oblika – grafom (engl. *Ratio Chart*), elektroferogramom (engl. *Electropherogram*) te tablicom s brojčanim rezultatima (engl. *Sample Report Chart*).

Određivanje promjena u broju kopija (delecija, duplikacija) temelji se na rezultatima dobivenim ligacijskom reakcijom. Radi se usporedba signala proba čiji je intezitet ovisan o broju kopija određene sekvence koja je prisutna u reakciji. Intezitet signala proba testiranog uzorka uspoređuje se s intezitetom signala odgovarajućih proba u kontrolama te se na taj način izračunava omjer MLPA. U slučaju kada je omjer MLPA manji od 0,65 tada je riječ o deleciji, dok MLPA omjer viši od 1,35 odgovara duplikaciji. U Tablici 7 prikazane su vrijednosti omjera MLPA u odnosu na status CNV (Web2).

Tablica 7. Odnos vrijednosti omjera MLPA u odnosu na broj kopija*

STATUS CNV	OMJER MLPA
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

*preuzeto i prilagođeno prema Web2

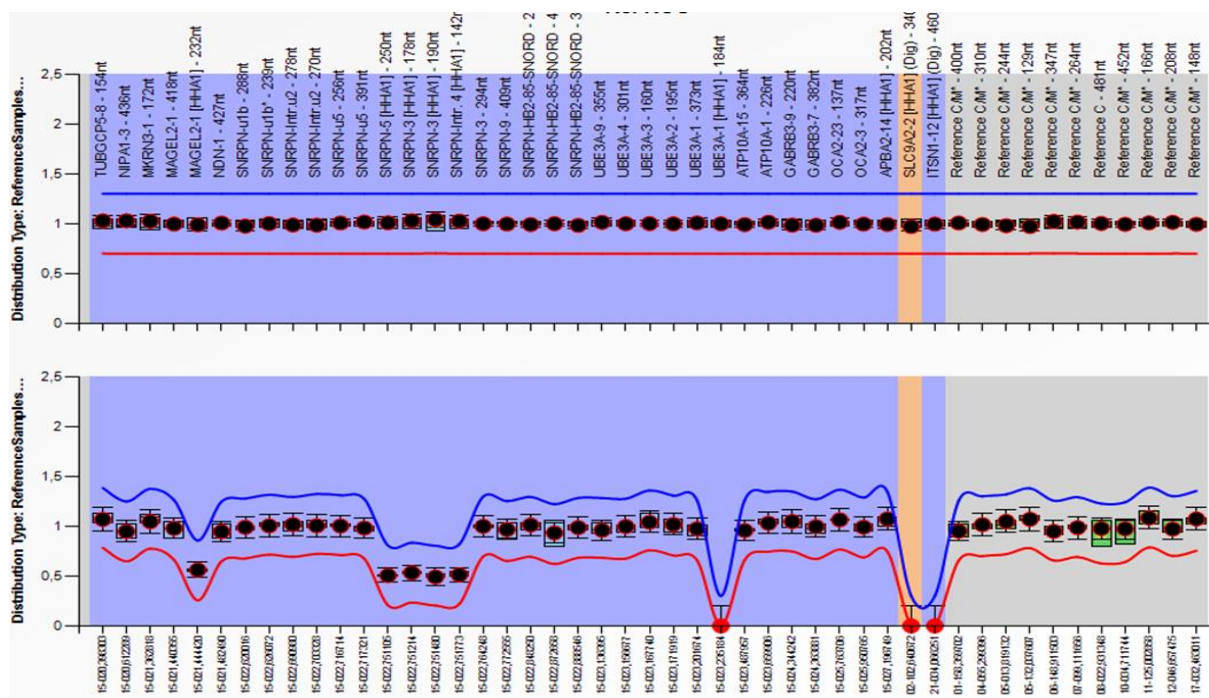
U metilacijskom testu prvi dio analize odnosi se na utvrđivanje broja kopija gdje se za ligacijski dio uzorka računa MLPA omjer. Za drugi dio analize koriste se podaci dobiveni ligacijsko-digestijskom reakcijom. Metilacijski profil utvrđuje se usporedbom visine proba dobivenih u ligacijsko-digestijskoj reakciji s visinom proba u ligacijskoj reakciji istog uzorka (Slika 11). Metilacijskim profiliranjem moguće je odrediti genomsko utiskivanje te metilaciju promotora gena. Omjeri ligacijsko-digestijske/ligacijske reakcije za metilacijske probe u MS-MLPA setu za određivanje genetskog utiska nalaze se u Tablici 8.

Tablica 8. Odnos ligacijsko-digestijske i ligacijske reakcije za metilacijske probe u setu MS-MLPA*

METILACIJSKI STATUS KOPIJA GENA OMJER LIGACIJSKO-DIGESTIJSKE I LIGACIJSKE REAKCIJE

Dvije metilirane kopije	$2/2 = 1$
Jedna metilirana i jedna nemetilirana kopija	$1/2 = 0,5$
Dvije nemetilirane kopije	$0/2 = 0$

* preuzeto i prilagođeno prema Web2



Slika 11. Grafički prikaz seta SALSA MLPA ME028 Prader Willi/Angelman. Korištene su probe specifične za gene u PWS/AS kritičnoj regiji 15q11-q12: probe koje sadrže Hha1 restrikcijsko mjesto za otkrivanje promijenjenog metilacijskog obrasca, probe koje ne sadrže Hha1 restrikcijsko mjesto za otkrivanje promijenjenog metilacijskog obrasca te referentne probe koje su izvan PWS/AS regije. Gornja slika prikazuje produkte ligacijske reakcije, donja slika prikazuje produkte ligacijsko-digestijske reakcije (preuzeto i prilagođeno prema Web4).

3.6 Retrospektivna analiza kliničkih slika bolesnika

Provela sam retrospektivnu analizu kliničkih slika 104 bolesnika koji su poslani na dijagnostiku malformacijskih sindroma PWS, AS, BWS i RSS u razdoblju od 2016. do 2023. godine. Prema izračunatoj aritmetičkoj sredini i standardnoj devijaciji, prosječna dob bolesnika koji su poslani na dijagnostiku za PWS bila je ~6 godina, dok je za AS prosječna dob bolesnika bila ~2 godine. Nadalje, prosječna dob bolesnika koji su poslani na dijagnostiku za BWS iznosila je ~3 godine, dok je za RSS prosječna dob bolesnika iznosila ~2 godine.

Provela sam bodovanje prema glavnim i sporednim kriterijama raspodjele kliničke slike za svaki od četiri sindroma prema Tablicama 1-4.

Prema literaturnim podacima je poznato kako specifičan genotip uzrokuje specifičan fenotip bolesnika. Stoga sam analizirala odnos genotip-fenotip kod bolesnika kojima je metodom MS-MLPA potvrđen PWS i RSS.

3.7 Statističke metode

U istraživanju sam koristila deskriptivnu statističku analizu. Podatke istraživanja unijela sam u tablice i obradila pomoću programa za tablično računanje Microsoft Excel.

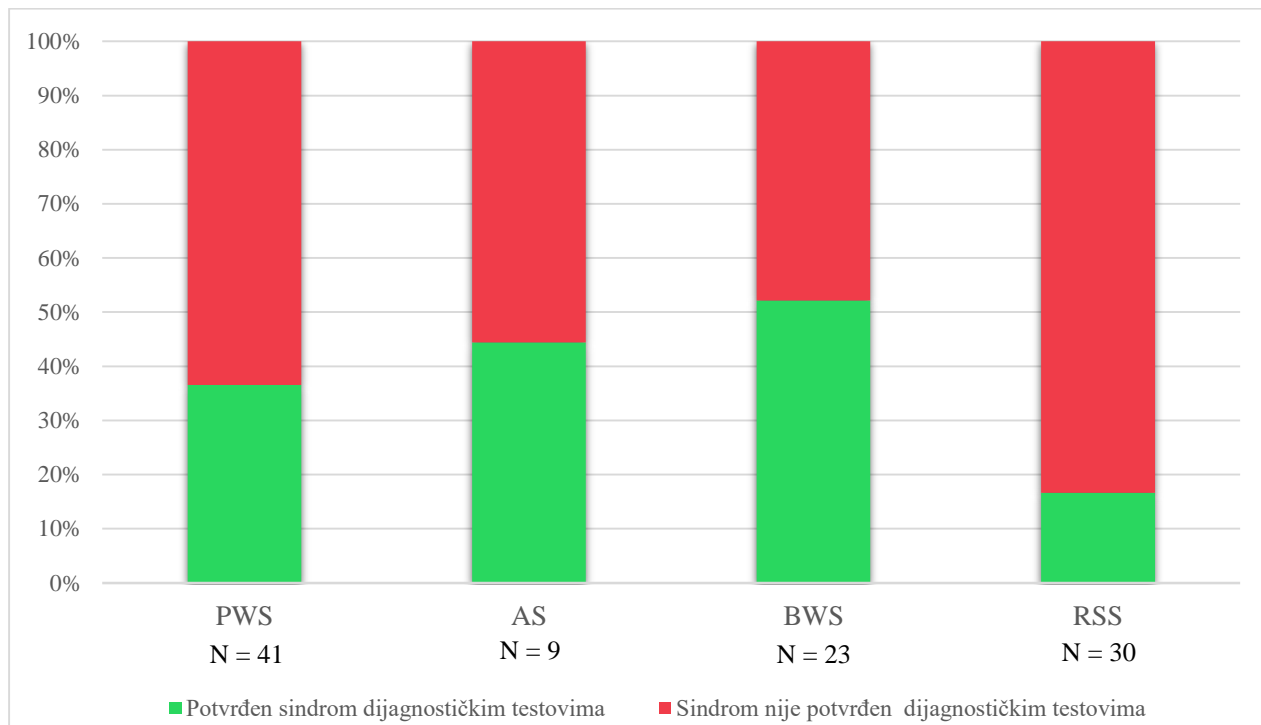
Za izračunavanje statističke značajnosti frekvencije pojave simptoma s obzirom na genotip bolesnika kojima metodom MS-MLPA nije potvrđen sindrom i onih kod kojih je sindrom potvrđen, koristila sam „GraphPad by Dotmatics” kalkulator omjera dostupan za slobodno korištenje na mrežnoj stranici: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>.

Fisherov egzaktni test koristi se ako je promatrani broj ispitanika u skupini < 5 . Test χ^2 s Yatesovom korekcijom koristi se kada je promatrani broj ispitanika u skupini > 5 . Kalkulator računa iznos vrijednosti p . Ako je $p = 0,05 - 0,01$, tada postoji statistički značajna razlika između promatranih skupina. Ako je vrijednost $p = 0,01 - 0,001$, tada postoji visoka statistička značajnost između promatranih skupina. Naposljetku, ako je vrijednost $p < 0,0001$, tada postoji vrlo visoka statistička značajnost između promatranih skupina.

4. REZULTATI

4.1. Analiza molekularne podloge nastanka istraživanih sindroma

Metodom MS-MLPA je PWS potvrđen kod manje od polovice ukupno poslanih bolesnika na dijagnostiku (37%). Potvrđenih bolesnika za AS je 44%, dok je za BWS otprilike podjednak broj potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika (52%). Najmanji postotak (17%) potvrđenih bolesnika određen je za RSS. Navedeni podaci vidljivi su na Slici 12.



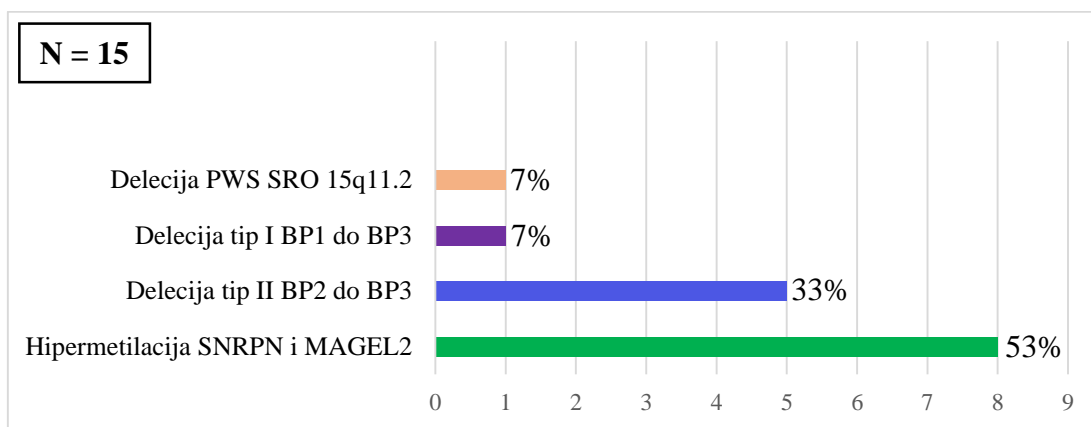
Slika 12. Prikaz raspodjele bolesnika prema potvrdi uputnih dijagnoza za sindrom Prader-Willi, sindrom Angelman, sindrom Beckwith-Wiedemann i sindrom Russell-Silver

Kratice: PWS – sindrom Prader-Willi, AS – sindrom Angelman, BWS – sindrom Beckwith-Wiedemann, RSS – sindrom Russell-Silver, N – ukupan broj bolesnika poslanih na molekularnu dijagnostiku za svaki od četiri sindroma

4.2 Analiza rezultata za sindrom Prader-Willi

4.2.1 Analiza rezultata dobivenih primjenom metode MS-MLPA kod sindroma Prader-Willi

Od ukupno 15 bolesnika, kojima je metodom MS-MLPA potvrđen PWS, kod 7 je nađena delecija u PWS kritičnoj regiji. Kod 8 bolesnika određena je promjena u metilacijskom statusu, hipermetilacija gena *SNRPN* i *MAGEL2* (Slika 13). Kod jednog bolesnika sa sumnjom na PWS određena je duplikacija PWS/AS kritične regije, što odgovara sindromu duplikacije 15q koji može imati kliničke značajke PWS-a i AS-a.



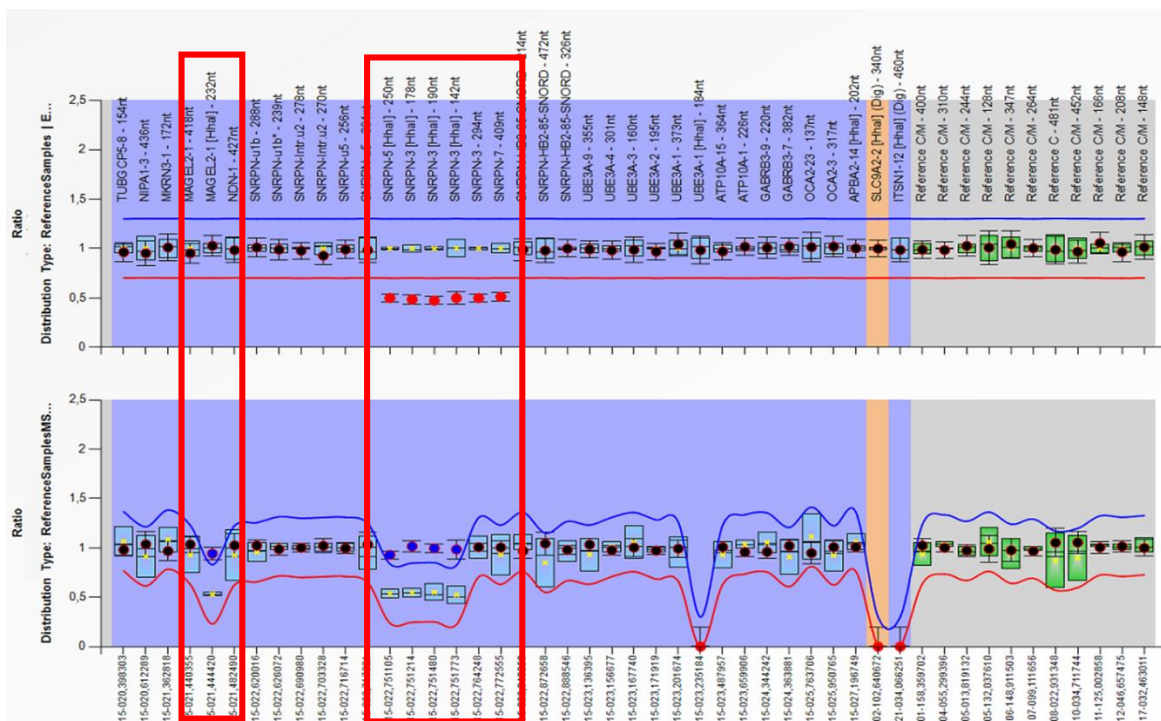
Slika 13. Prikaz uzroka bolesti određenih primjenom metode MS-MLPA kod bolesnika sa sindromom Prader-Willi

Kratice: N - ukupan broj ispitanika, PWS - sindrom Prader-Willi

4.2.1.1 Prikaz bolesnika s delecijom PWS SRO kromosomske regije 15q11.2

Kod bolesnika pod šifrom 132 metodom MS-MLPA uz pomoć seta ME028 PWS/AS je potvrđena delecija kromosoma u kromosomskoj regiji q11.2. Navedeni set sadrži četiri probe za *SNRPN* egzon 1/promotor/intron 1, regiju koja predstavlja najmanju regiju preklapanja delecija u bolesnika s PWS (PWS-SRO) i deleciju IC. Nadalje, uključene su i dvije probe za egzone 3 i 7 gena *SNRPN*, koji su deletirani u većini slučajeva delecija IC. Deletirana regija kod našeg bolesnika obuhvaća probe *SNURF-SNRPN* 5, 3 i 7 smještene u PWS-SRO regiji (engl. *Small Region of Overlap*, SRO) (Slika 14), veličine 4,3 kb, koja obuhvaća promotor gena *SNRPN* i i egzon 1.

Posljedica navedene delecije je hipermetilacija u rasponu 93-100% u regiji za gen *SNRPN* i *MAGEL2* (metilacija u istoj regiji kod zdravih osoba iznosi 50%). Time je potvrđen PWS.



Slika 14. Grafički prikaz analize bolesnika pod šifrom 132 kojem je određena mikrodelecija 15q11.2 primjenom MS-MLPA seta ME028 PWS/AS. Crvenim okvirima označena je hipermetilacija (u rasponu 93-100%) u regiji za gen *SNRPN* i *MAGEL2* (plave točke na donjoj slici) koja nastaje kao posljedica delecije PWS SRO. Crvene točke na gornjoj slici prikazuju deleciju 6 *SNRPN* proba.

4.2.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Prader-Willi

Glavna fenotipska obilježja analizirana su prema međunarodnim kliničkim dijagnostičkim kriterijima za PWS (glavni i sporedni kriteriji raspodjele) i uspoređena s genotipom (Tablica 9). Bolesnici kod kojih je nađena delecija (ukupno 7) ubrajaju se u grupu A. Bolesnici kod kojih je nađena hipermetilacija gena *SNRPN* i *MAGEL2* (ukupno 8) ubrajaju se u grupu B.

S obzirom na glavne kliničke kriterije, u obje grupe bolesnika izraženiji su dismorfizam lica (grupa A 71%/grupa B 88%), neonatalna hipotonija (grupa A 71%/grupa B 88%) te zastoje u razvoju/intelektualne poteškoće (grupa A 57%/grupa B 63%).

U grupi A najčešći sporedni klinički kriterij su male šake i stopala (71%) iza kojeg slijedi niski rast (29%). U grupi B najčešći sporedni klinički kriterij je nerazvijen govor (25%). Od sporednih kliničkih kriterija prisutni su još male šake i stopala (25%) i niski rast (13%). Kriteriji hipopigmentacija kože i kose i problem sa spavanjem nisu prisutni u grupi B, za razliku od grupa A u kojoj su prisutni u 14%. Prema izračunu Fisherovog egzaktnog testa i testa χ^2 utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u usporedbi genotipa i fenotipa grupe A i grupe B za PWS.

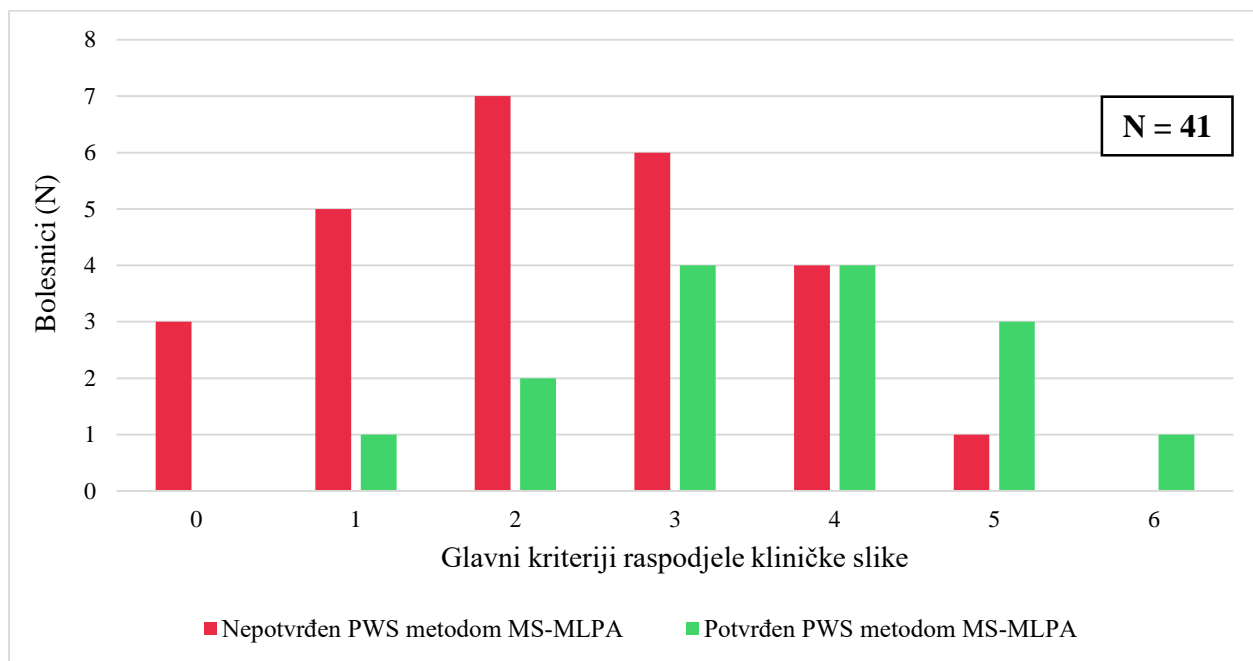
Tablica 9. Usporedba fenotipa ovisno o genotipu bolesnika kojima je metodom MS-MLPA potvrđen sindrom Prader-Willi.

GLAVNI KRITERIJI RASPODJELE KLINIČKE SLIKE	N (%) ISPITANIKA GRUPE A	N (%) ISPITANIKA GRUPE B	p
Dismorfizam lica	5 (71)	7 (88)	ns
Neonatalna hipotonija	5 (71)	7 (88)	ns
Pretilost	2 (29)	3 (38)	ns
Hipogonadizam	3 (43)	3 (38)	ns
Psihomotorno zaostajanje	4 (57)	3 (38)	ns
SPOREDNI KRITERIJI RASPODJELE KLINIČKE SLIKE	N (%) ISPITANIKA GRUPE A	N (%) ISPITANIKA GRUPE B	p
Hipopigmentacija kože i kose	1 (14)	0 (0)	ns
Male šake i stopala	5 (71)	2 (25)	ns
Niski rast	2 (29)	1 (13)	ns
Problemi sa spavanjem	1 (14)	0 (0)	ns
Nerazvijen govor	1 (14)	2 (25)	ns

Kratice: N – broj ispitanika koji ima ispoljen glavni ili sporedni kriterij kliničke slike (u zagradama je isto navedeno u postotku), grupa A – ispitanici kod kojih je metodom MS-MLPA utvrđena delecija, grupa B – ispitanici kod kojih je metodom MS-MLPA utvrđena promjena metilacijskog statusa gena *SNRPN* i *MAGEL2*, ns – nije statistički značajno.

4.2.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Prader-Willi

Prema kliničkim kriterijima raspodjele za PWS postoji 12 glavnih kriterija (Tablica 1). S obzirom na glavne kriterije raspodjele kliničke slike na Slici 15 je prikazana usporedba bolesnika kojima PWS nije potvrđen metodom MS-MLPA s bolesnicima kojima je isti potvrđen. Svi bolesnici kojima je PWS potvrđen imali su barem jedan glavni kriterij kliničke slike dok kod tri bolesnika, kojima nije potvrđen PWS, nije bio prisutan niti jedan glavni kriterij. Također je vidljivo da se broj nepotvrđenih bolesnika smanjuje s povećanjem broja prisutnih glavnih kriterija (2-6 glavna kriterija). Kod bolesnika s prisutnih 6 glavnih kriterija očekivano je potvrđen PWS.



Slika 15. Prikaz raspodjele glavnih kriterija kliničke slike sindroma Prader-Willi u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, PWS – sindrom Prader-Willi

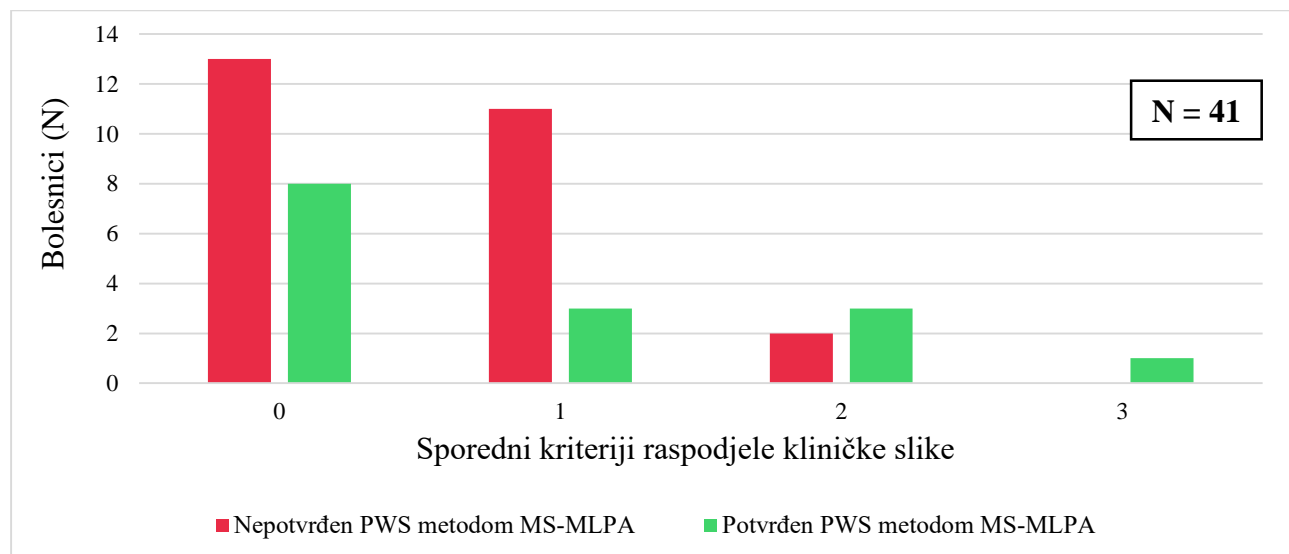
Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju glavnih kriterija raspodjele kliničke slike za PWS za skupinu bolesnika kod kojih sindrom nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih bolesnika kod kojih je isti potvrđen. Rezultati Fisherovog egzaktnog testa i testa χ^2 vidljivi su u Tablici 10.

Tablica 10. Rezultati Fisherovog egzaktnog testa i testa χ^2 za glavne kriterije raspodjele kliničke slike sindroma Prader-Willi

GLAVNI KRITERIJI	FISHEROV EGZAKTNI TEST	TEST χ^2	STUPANJ SLOBODE (df)	p
0	+	-	-	ns
1	-	1,20	1	ns
2	-	0,39	1	ns
3	-	0,07	1	ns
4	+	-	-	ns
5	+	-	-	ns
6	+	-	-	ns

Kratice: ns – nije statistički značajno

Za PWS postoji 6 sporednih kriterija raspodjele kliničke slike (Tablica 1). Na Slici 16 je prikazana usporedba između PWS potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika s obzirom na sporedne kriterije raspodjele kliničke slike. Najviše potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika nije imalo niti jedan sporedni kriterij. Kao i kod glavnih kriterija s povećanjem broja sporednih kriterija smanjuje se broj nepotvrđenih bolesnika, a bolesnik s najviše sporednih kriterija uspješno je potvrđen primjenom metode MS-MLPA.



Slika 16. Prikaz raspodjele sporednih kriterija kliničke slike sindroma Prader-Willi u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, PWS – sindrom Prader-Willi

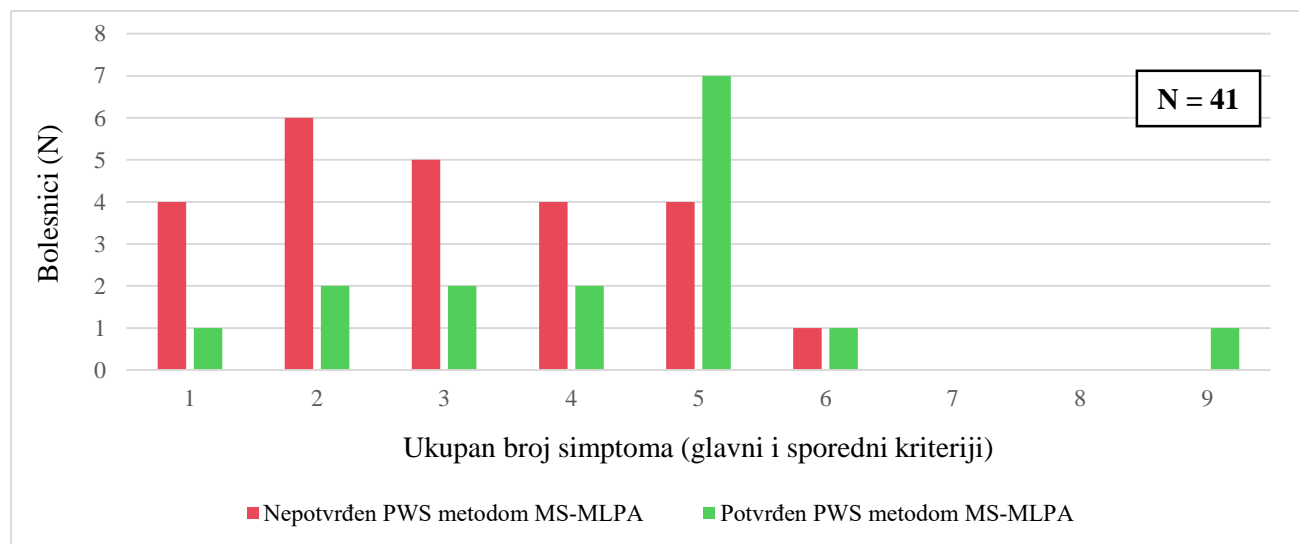
S obzirom na sporedne kriterije raspodjele kliničke slike, statističkim testovima je utvrđeno kako ne postoji statistički značajna razlika kod skupine bolesnika kojima PWS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih kod kojih je sindrom potvrđen (Tablica 11).

Tablica 11. Rezultati Fisherovog egzaktnog testa i testa χ^2 za sporedne kriterije raspodjele kliničke slike sindroma Prader-Willi

SPOREDNI KRITERIJI	FISHEROV EGZAKTNI TEST	TEST χ^2	STUPANJ SLOBODE (df)	p
0	-	0,04	1	ns
1	-	1,23	1	ns
2	+	-	-	ns
3	+	-	-	ns

Kratice: ns – nije statistički značajno

Na Slici 17 prikazana je usporedba bolesnika kojima PWS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih kod kojih je sindrom potvrđen s obzirom na ukupan broj kliničkih kriterija za PWS. Najviše kliničkih kriterija, 9 od 18, imao je jedan bolesnik kod kojeg je uspješno potvrđen PWS. Najviše (ukupno 6) nepotvrđenih bolesnika imalo je samo dva klinička kriterija, dok je najviše potvrđenih bolesnika (ukupno 7) imalo 5 kliničkih kriterija. Od dva bolesnika koji su imali isti broj kliničkih kriterija, ukupno 6, jedan je potvrđen metodom MS-MLPA.



Slika 17. Prikaz ukupnih, glavnih i sporednih kriterija kliničke slike sindroma Prader-Willi u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N- ukupan broj ispitanika, PWS – sindrom Prader-Willi

Ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju simptoma kliničke slike PWS-a kod skupine bolesnika kojima sindrom nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih kod kojih je isti potvrđen. Rezultati statističkih testova vidljivi su u Tablici 12.

Tablica 12. Rezultati Fisherovog egzaktnog testa i testa χ^2 za ukupan broj simptoma kliničke slike sindroma Prader-Willi

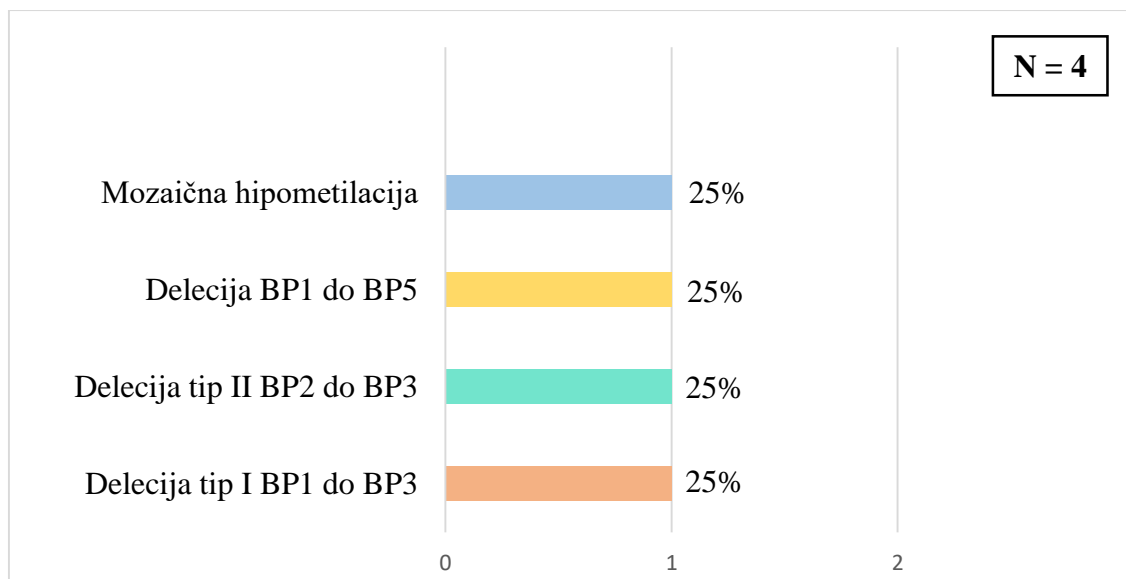
UKUPAN BROJ SIMPTOMA	FISHEROV EGZAKTNI TEST	TEST χ^2	STUPANJ SLOBODE (df)	p
1	+	-	-	ns
2	-	0,12	1	ns
3		0,23	1	ns
4	+	-	-	ns
5		3,28	1	ns
6	+	-	-	ns
7	+	-	-	ns
8	+	-	-	ns
9	+	-	-	ns

Krtatice: ns – nije statistički značajno

4.3 Analiza rezultata za sindrom Angelman

4.3.1 Analiza rezultata metode MS-MLPA za sindrom Angelman

Od ukupno 4 bolesnika, kojima je metodom MS-MLPA potvrđen AS, delecije AS kritične regije, različite veličinom i mjestima lomova, pronađene su kod 3 bolesnika (Slika 18). Kod jednog bolesnika kao uzrok AS-a pronađena je hipometilacija u mozaiku.



Slika 18. Prikaz uzroka bolesti određenih primjenom metode MS-MLPA kod bolesnika sa sindromom Angelman

Krtalice: N – ukupan broj ispitanika

4.3.1.1 Prikaz bolesnika s delecijom od mjesta loma BP1 do mjesta loma BP5

Kod bolesnika pod šifrom 78 analiza uzoraka DNA pokazala je intersticijsku deleciju dugog kraka kromosoma 15 u regiji q11.2q13.3 veličine 10,03 Mb te malu terminalnu deleciju dugog kraka kromosoma 18 u regiji q32 veličine 25,28 kb.

Klasičnom kariotipizacijom kod majke je pronađena balansirana translokacija između kromosoma 15 i 18 koja je kod djeteta rezultirala nebalansiranom translokacijom, odnosno parcijalnom monosomijom regija 15q11.2q13.3 i 18q32. Metodom MS-MLPA i primjenom seta ME028 određen je gubitak metilacije gena *MAGEL2* i *SNRPN*. Navedeni metilacijski obrazac ukazuje da je nađena delecija 15q11.2q13.3 prisutna na majčinom kromosomu što uzrokuje AS. Nađena delecija veća je od uobičajenih delecija ove regije te se proteže od mjesta loma 1 (BP1) do mjesta loma 5 (BP5). Stoga je obuhvaćen veći broj gena što rezultira težom kliničkom slikom.

4.3.1.2 Prikaz bolesnika s hipometilacijom u regiji 15q11.2q13.3 u mozaičnom obliku

Kod bolesnika pod šifrom 233 metoda MS-MLPA pokazala je promijenjeni metilacijski profil PWS/AS kromosomske regije. Analizom je utvrđena snižena metilacija u iznosu od 18% (Slika 19) u odnosu na metilaciju u regiji zdravih osoba koja iznosi 50%. To ukazuje na mozaični metilacijski obrazac (prisutnost stanica sa normalnom razinom metilacije i stanica sa sniženom razinom metilacije) u regiji za gen *SNRPN* i *MAGEL2*. Iako su simptomi kliničke slike bolesnika 233 upućivale na PWS (pretilost, smanjen rast, facijalna dismorfija, hipogonadizam), metodom MS-MLPA je u konačnici potvrđen AS.

	Probe target info	dig							
		Height	Area	Final ratio	Stdev	RefPop	d(nt)	Width	
15q (n=36)	NIPA1-3	15-020.612289	2587	21094	1	0.04	Equal	0.04	61
	TUBGCP5-8	15-020.398304	2531	16601	0.93	0.04	Equal	0.12	47
	MKRN3-1	15-021.362818	2796	18799	0.98	0.02	Equal	0.03	49
	MAGEL2-1	15-021.448335	2512	28148	1.81	0.03	Equal	0.03	59
	MAGEL2-1 [H...]	15-021.444420	728	4873	0.24	0.01	Decreased2...	-0.03	33
	NDN-1	15-021.482438	1355	18876	0.5	0.04	Equal	0.05	59
	SNRPN-U1B	15-022.620016	3072	23413	1.03	0.02	Equal	-0.03	78
	SNRPN-U1B	15-022.626072	3104	21916	0.95	0.02	Equal	-0.06	60
	SNRPN-Intr.u2	15-022.690980	2561	19231	0.98	0.02	Equal	0.04	66
	SNRPN-Intr.u2	15-022.703328	2433	17572	1.01	0.04	Equal	0.03	64
	SNRPN-u5	15-022.716714	2676	19388	0.96	0.01	Equal	-0.03	56
	SNRPN-u5	15-022.717321	2388	18136	0.88	0.03	Equal	-0.02	61
	SNRPN-Intr.2...	15-022.751105	621	4247	0.17	0.02	Decreased2...	-0.05	39
	SNRPN-Intr.2...	15-022.751214	506	3756	0.17	0.03	Decreased2...	-0.06	36
	SNRPN-Intr.2...	15-022.751480	421	2666	0.16	0.02	Decreased2...	-0.03	31
	SNRPN-Intr.2...	15-022.751773	600	4118	0.17	0.01	Decreased2...	-0.01	33
	SNRPN-Intr.2...	15-022.752234	433	3513	0.17	0.01	Decreased2...	0	46
	SNRPN-Intr.2...	15-022.752900	424	3323	0.18	0.04	Decreased2...	0.07	33
	SNRPN-3	15-022.764248	2888	17452	0.86	0.02	Equal	-0.01	56
	SNRPN-7	15-022.772555	2283	18349	0.98	0.02	Equal	0.02	45
	SNRPN-HB2-...	15-022.848250	3215	21501	0.97	0.02	Equal	0.02	43
	SNRPN-HB2-...	15-022.872658	2590	22067	1.03	0.03	Equal	0.01	72
	SNRPN-HB2-...	15-022.888546	2755	20637	1	0.03	Equal	0.03	68
	UBE3A-10	15-023.136395	2459	18171	1.04	0.05	Equal	0.02	50
	UBE3A-5	15-023.156677	2432	18389	0.99	0.04	Equal	0.02	54
	UBE3A-4	15-023.167740	3081	19694	0.98	0.05	Equal	0.09	49
	UBE3A-3	15-023.171919	3230	22369	0.97	0.03	Equal	-0.02	60
	UBE3A-2	15-023.201674	2394	18456	1	0.06	Equal	0.06	48
	UBE3A-1 [Hh...]	15-023.235184	0	0	0	0	<<<	0	0
	ATP10A-15	15-023.487957	2546	19892	1	0.02	Equal	0.07	63
	ATP10A-1	15-023.659906	3107	21797	0.97	0.02	Equal	-0.01	58
	GABRB3-9	15-024.344242	2932	19751	0.98	0.02	Equal	-0.04	43
	GABRB3-7	15-024.363881	2600	20568	1.02	0.03	Equal	0.04	60
	OCA2-23	15-025.763706	2934	19769	0.94	0.03	Equal	-0.01	59
	OCA2-3	15-025.950765	2897	22231	1.03	0.02	Equal	-0.02	65
	APBA2-14	15-027.196749	2609	17880	0.92	0.03	Decreased2...	0	47

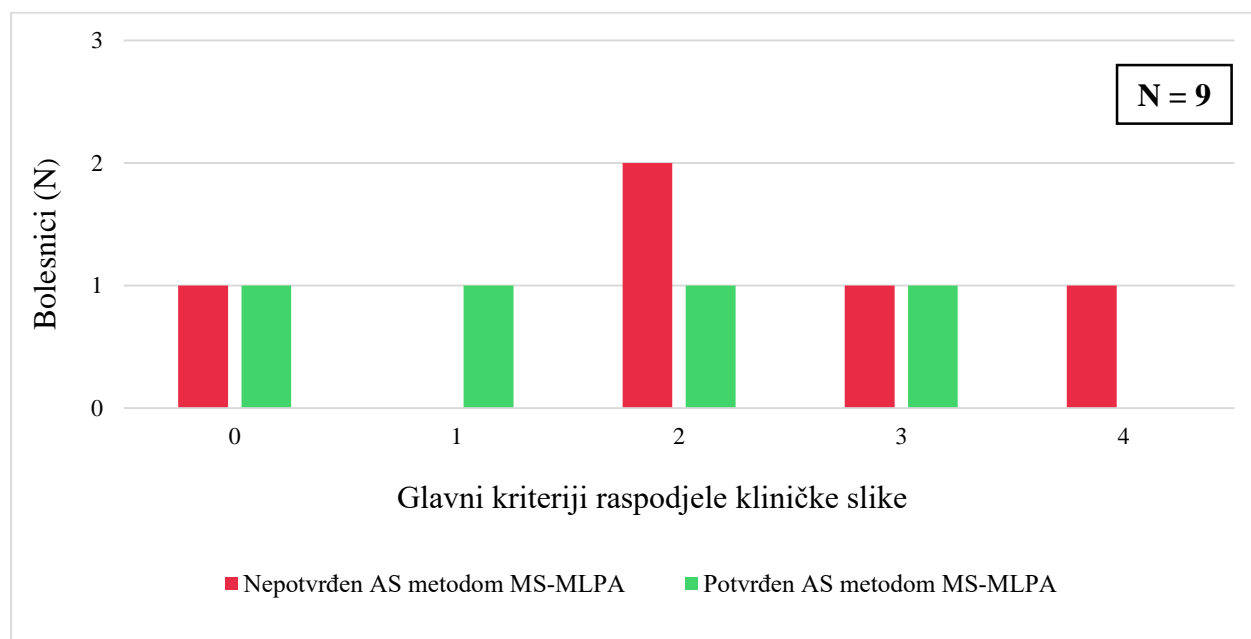
Slika 19. Analiza podataka MS-MLPA bolesnika pod šifrom 233 korištenjem računalnog programa Coffalyser. Crvenim okvirima označena je snižena metilacija za gen *MAGEL2* koja iznosi 24%, dok za gen *SNRPN* iznosi 16-18%.

4.3.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Angelman

Zbog premalog broja ispitanika i specifičnog molekularnog uzroka nastanka bolesti za svakog od ukupno 4 ispitanika, nije bilo moguće napraviti usporedbu genotipa s fenotipom za AS.

4.3.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Angelman

Prema kliničkim kriterijima raspodjele za AS postoji 10 glavnih kriterija (Tablica 2). Na Slici 20 je prikazana usporedba bolesnika kojima AS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih kod kojih je sindrom potvrđen s obzirom na glavne kriterije raspodjele kliničke slike. Kod nepotvrđenih bolesnika prevladavaju 2 glavna kriterija. Kod bolesnika s najviše glavnih kriterija kliničke slike (ukupno 4), sumnja na AS nije potvrđena primjenom metode MS-MLPA.

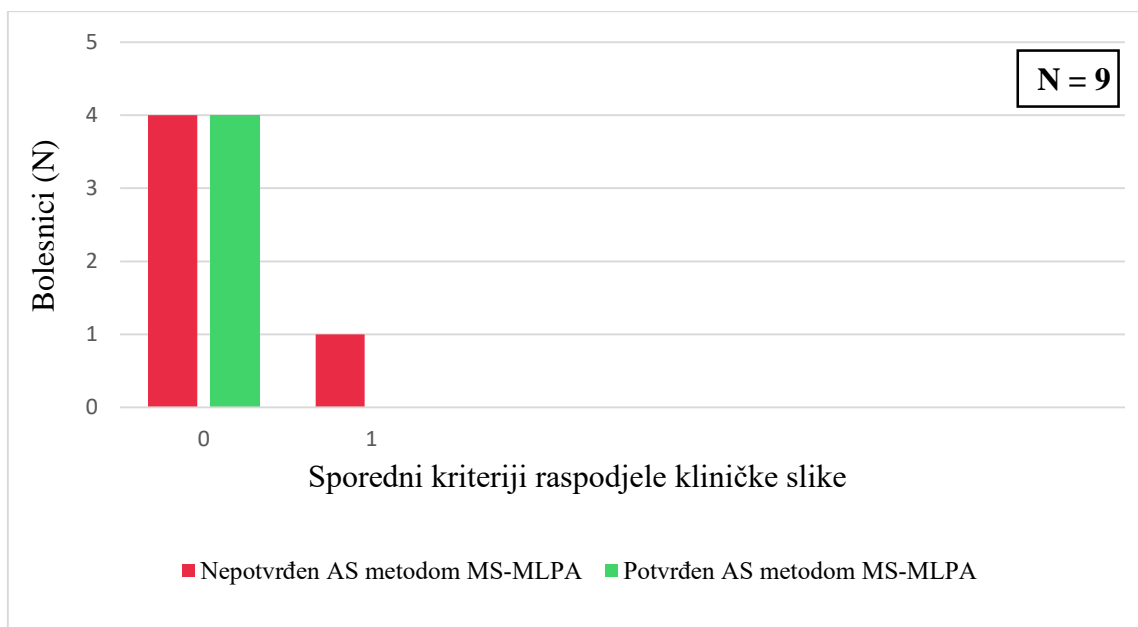


Slika 20. Prikaz raspodjele glavnih kriterija kliničke slike sindroma Angelman u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, AS – sindrom Angelman

Fisherovim egzaktnim testom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u broju glavnih kriterija raspodjele kliničke slike AS-a u skupini bolesnika kojoj metodom MS-MLPA nije potvrđen sindrom sa skupinom bolesnika gdje sindrom nije potvrđen.

Usporedba bolesnika kojima AS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih kod kojih je sindrom potvrđen s obzirom na sporedne kriterije raspodjele kliničke slike, kojih ima ukupno 5 (Tablica 2), prikazana je na Slici 21. Obje skupine bolesnika nemaju izražene sporedne kriterije kliničke slike. Kod bolesnika s jednim sporednim kriterijem kliničke slike AS nije potvrđen.

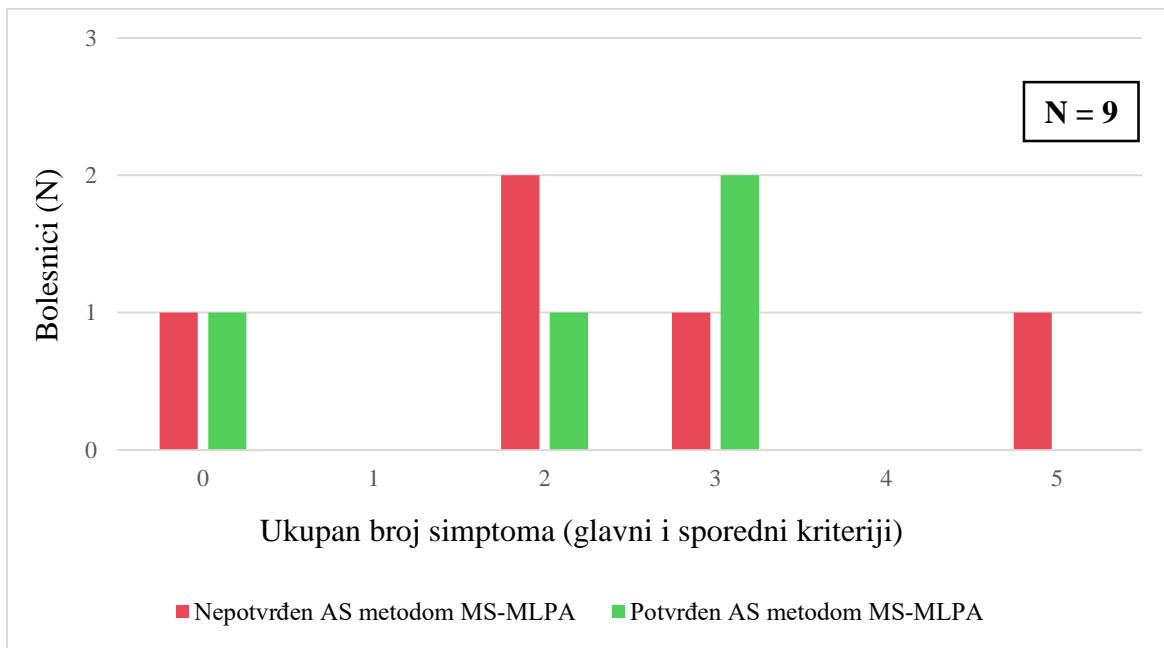


Slika 21. Prikaz raspodjele sporednih kriterija kliničke slike sindroma Angelman u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, AS – sindrom Angelman

Ne postoji statistički značajna razlika u broju sporednih kriterija raspodjele kliničke slike za AS između skupine s potvrđenim AS-om i skupine gdje sindrom nije potvrđen.

Ukupan broj kliničkih kriterija za AS iznosi 15. Usporedba ukupnih, glavnih i sporednih kriterija kliničke slike AS-a, u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike, prikazana je na Slici 22. Broj nepotvrđenih bolesnika s dva klinička kriterija jednak je broju potvrđenih koji su imali tri klinička kriterija. Bolesniku s najviše ukupnih kliničkih kriterija (ukupno 5) AS nije potvrđen.



Slika 22. Prikaz ukupnih, glavnih i sporednih kriterija kliničke slike sindroma Angelman u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

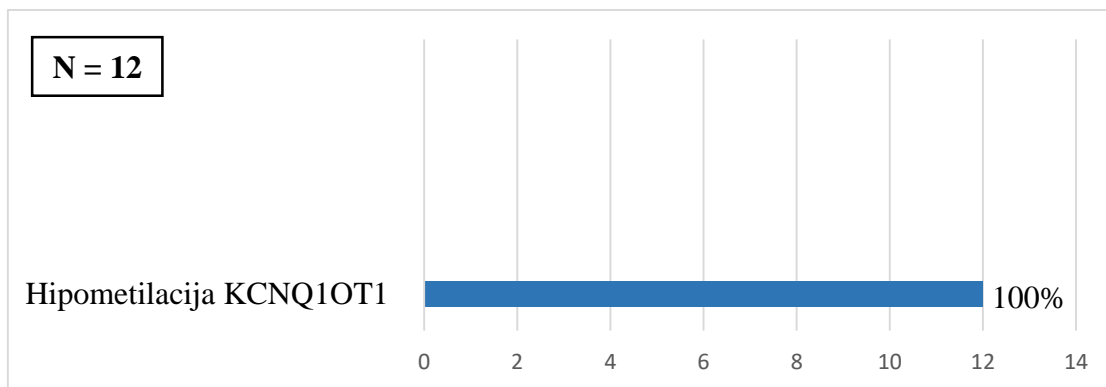
Kratice: N- ukupan broj bolesnika, AS – sindrom Angelman

S obzirom na ukupan broj simptoma AS-a, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u skupini bolesnika kod kojih je sindrom potvrđen metodom MS-MLPA te u skupini bolesnika kod kojih isti nije potvrđen.

4.4 Analiza rezultata za sindrom Beckwith-Wiedemann

4.4.1 Analiza rezultata metode MS-MLPA za sindrom Beckwith-Wiedemann

Kod svih 12 bolesnika kojima je metodom MS-MLPA potvrđen BWS pronađena je hipometilacija gena *KCNQ1OT1* (Slika 23).



Slika 23. Prikaz uzroka bolesti određenih primjenom metode MS-MLPA kod bolesnika sa sindromom Beckwith-Wiedemann

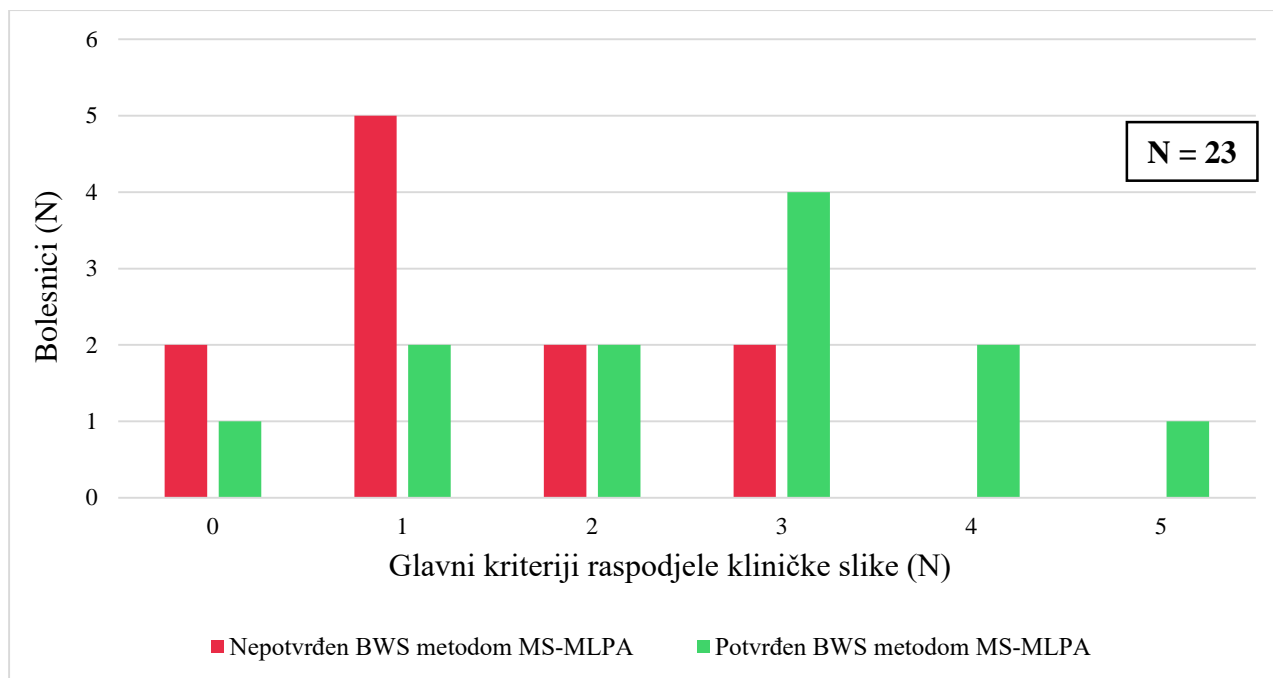
Kratice: N – ukupan broj ispitanika

4.4.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Beckwith-Wiedemann

S obzirom na to da je kod svih 12 bolesnika uzrok BWS-a hipometilacija gena *KCNQ1OT1*, nije bilo moguće napraviti usporedbu genotipa s fenotipom.

4.2.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Beckwith-Wiedemann

Postoji 7 glavnih kriterija raspodjele kliničke slike za BWS (Tablica 3). Usporedba bolesnika kojima BWS nije potvrđen i onih kod kojih je sindrom potvrđen s obzirom na glavne kriterije raspodjele kliničke slike, prikazana je na Slici 24. Najviše nepotvrđenih bolesnika imalo je 1 glavni kriterij raspodjele, a najviše potvrđenih bolesnika imaju 3 glavna kriterija raspodjele. Kod svih bolesnika s najviše glavnih kriterija raspodjele kliničke slike (4 i 5) uspješno je potvrđen BWS.

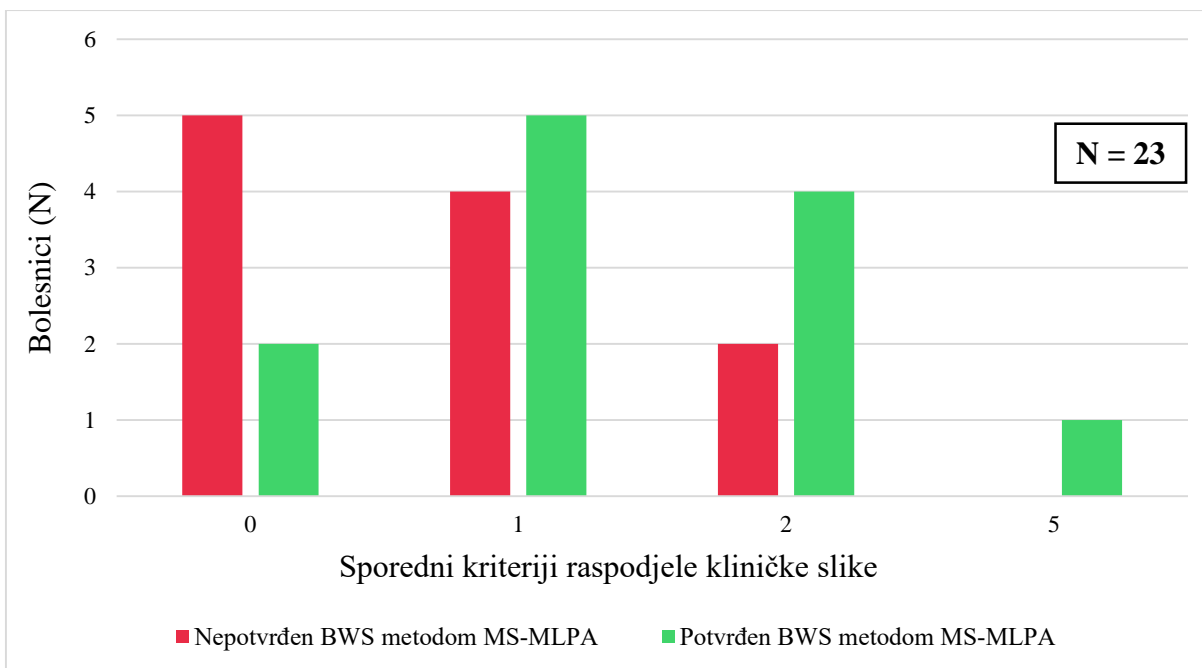


Slika 24. Prikaz raspodjele glavnih kriterija kliničke slike sindroma Beckwith-Wiedemann u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, BWS – sindrom Beckwith-Wiedemann

Prema Fisherovom egzaktnom testu i testu χ^2 utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u glavnim kriterijima raspodjele kliničke slike BWS-a kod skupine bolesnika kojima BWS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih bolesnika kod kojih je isti potvrđen.

Prema kliničkim kriterijima raspodjele za BWS postoji 7 sporednih kriterija (Tablica 3). Odnos potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika s obzirom na sporedne kriterije raspodjele kliničke slike BWS-a prikazan je na Slici 25. Najviše bolesnika kojima BWS nije potvrđen metodom MS-MLPA nema niti jedan sporedni kriterij raspodjele kliničke slike, a vidljivo je da s povećanjem broja sporednih kriterija broj nepotvrđenih bolesnika pada. Bolesniku s najviše sporednih kriterija, 5 od ukupno 7, uspješno je potvrđen BWS.

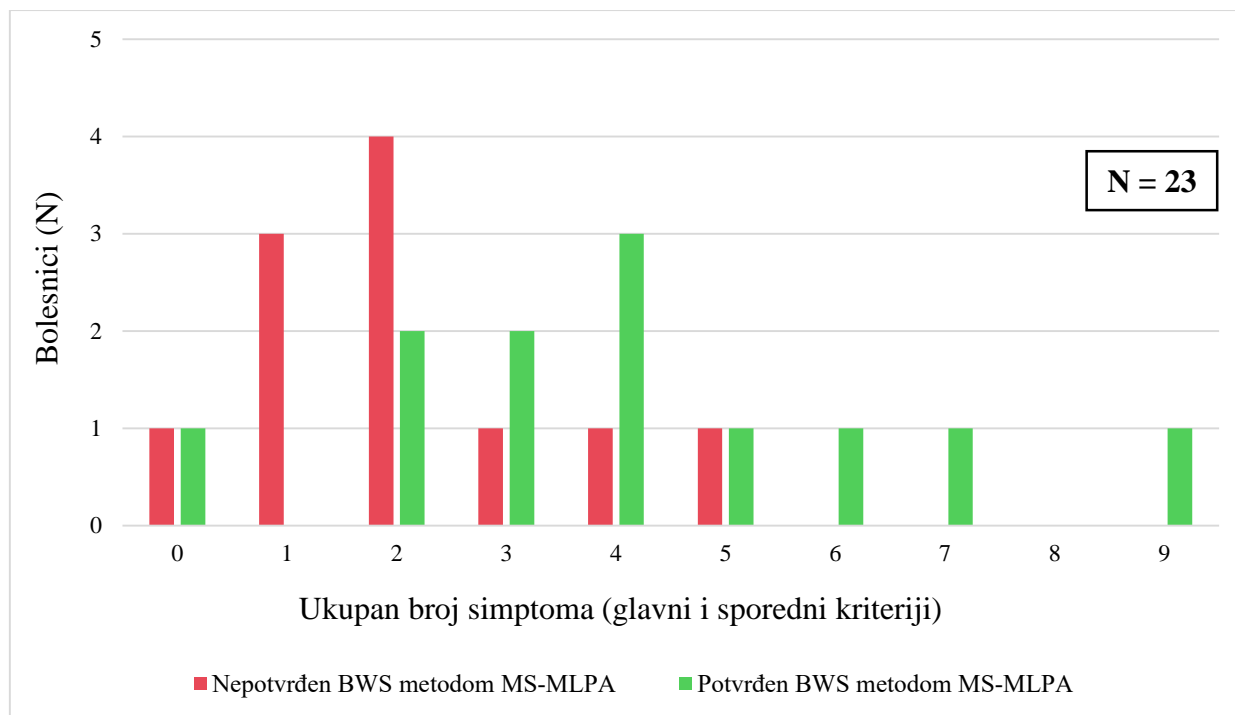


Slika 25. Prikaz raspodjele sporednih kriterija kliničke slike sindroma Beckwith-Wiedemann u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, BWS – sindrom Beckwith-Wiedemann

Statističkim testovima je utvrđeno kako ne postoji statistički značajna razlika u sporednim kriterijima raspodjele kliničke slike BWS-a za skupinu bolesnika kod koje sindrom nije potvrđen metodom MS-MLPA i one skupine kod koje je isti potvrđen.

Na Slici 26 je prikazana usporedba potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika s obzirom na ukupan broj kriterija raspodjele kliničke slike BWS-a. Od ukupno 16 sporednih i glavnih kriterija kliničke slike, najviše ih je nađeno 9. Kod bolesnika s ukupno 6, 7 i 9 kriterija uspješno je potvrđen BWS. Najviše nepotvrđenih bolesnika imalo je 2, a najviše potvrđenih bolesnika 4 ukupna kriterija.



Slika 26. Prikaz ukupnih, glavnih i sporednih kriterija kliničke slike sindroma Beckwith-Wiedemann u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

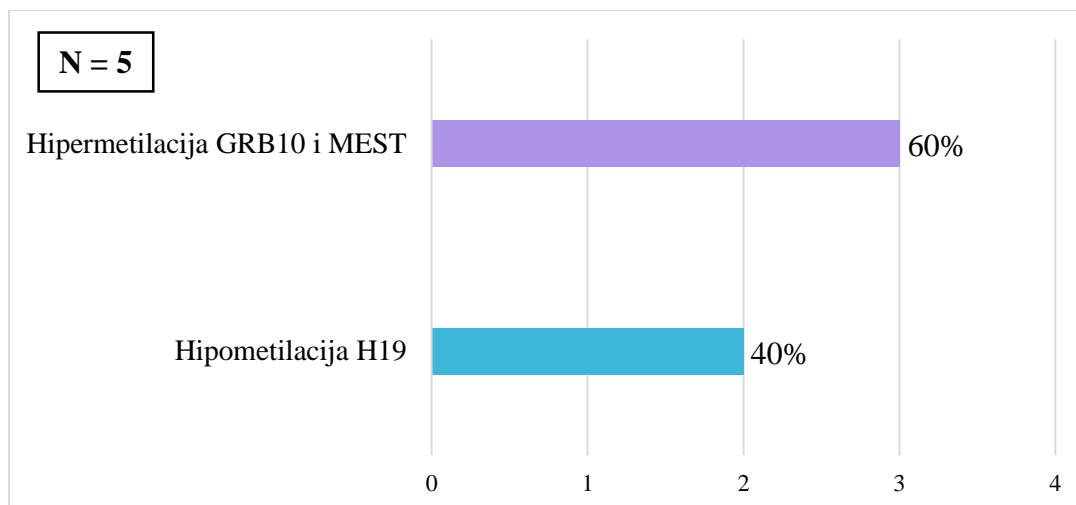
Kratice: N – ukupan broj ispitanika, BWS – sindrom Beckwith-Wiedemann

Fisherovim egzaktnim testom je utvrđeno kako ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju simptoma BWS-a za skupinu bolesnika kod koje je metodom MS-MLPA potvrđen BWS i one skupine kod koje isti nije potvrđen.

4.5 Analiza rezultata za sindrom Russell-Silver

4.5.1 Analiza rezultata metode MS-MLPA za sindrom Russell-Silver

Primjenom MS-MLPA seta ME32, kod 3 (60%) od ukupno 5 bolesnika, kao uzrok nastanka RSS-a određena je hipermetilacija gena *GRB10* i *MEST*, smještenih na kromosomu 7 u regijama 7p12.1 i 7q32 (Slika 27). Kod dvoje (40%) bolesnika primjenom MS-MLPA seta ME30 je pronađena hipometilacija gena *H19* smještenog na kromosomu 11 u regiji p15.



Slika 27. Prikaz rezultata metode MS-MLPA kojom je potvrđen sindrom Russell-Silver

Kratice: N – ukupan broj ispitanika

4.5.2 Usporedba genotipa s fenotipom za sindrom Russell-Silver

Glavna fenotipska obilježja analizirana su prema međunarodnim kliničkim dijagnostičkim kriterijima za RSS (glavni i sporedni kriteriji raspodjele) i uspoređeni s genotipom (Tablica 19). Bolesnici kod kojih je nađena hipometilacija gena *H19* ubrajaju se u grupu A. Bolesnici kod kojih je utvrđena hipermetilacija gena *GRB10* i *MEST* ubrajaju se u grupu B.

Iz Tablice 11 je vidljivo da svi bolesnici iz grupe A i B imaju dva glavna klinička kriterija, a to su smanjena porođajna težina/visina te postnatalni zastoj u rastu. Od preostalih glavnih kliničkih kriterija, oba bolesnika iz grupe A imaju poteškoće s hranjenjem, koji su u grupi B prisutni kod 2 od ukupno 3 ispitanika. Niti jedan ispitanik iz grupe B nema istaknuto čelo i asimetriju tijela. Najčešći sporedni klinički kriterij u grupi A je sindaktilija nožnih prstiju, dok je u grupi B, kod 2 od 3 bolesnika, najčešće prisutna nerazvijena motorika. Prema izračunu Fisherovog egzaktnog testa i testa χ^2 utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u usporedbi genotipa i fenotipa grupe A i grupe B za RSS.

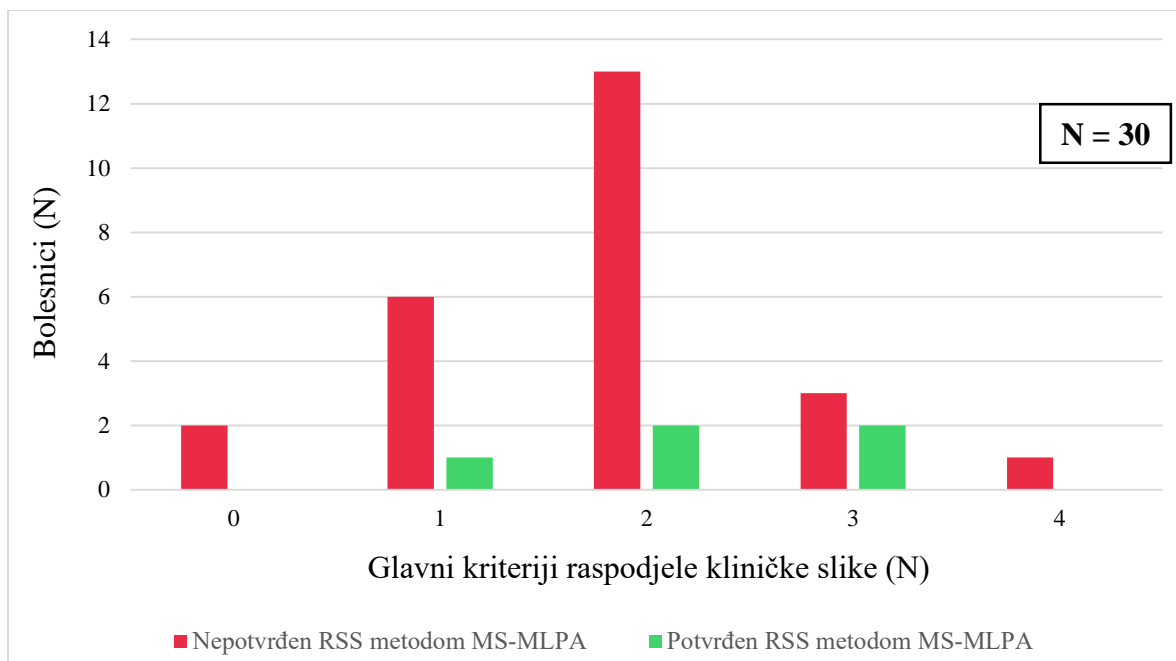
Tablica 11. Usporedba fenotipa ovisno o genotipu bolesnika kojima je metodom MS-MLPA potvrđen sindrom Russell-Silver.

GLAVNI KRITERIJI RASPODJELE KLINIČKE SLIKE	N (%) ISPITANIKA GRUPE A	N (%) ISPITANIKA GRUPE B	p
Smanjena porođajna težina / visina	2 (100)	3 (100)	ns
Postantalni zastoj u rastu	2 (100)	3 (100)	ns
Relativna makrocefalija	1 (50)	2 (67)	ns
Istaknuto čelo	1 (50)	0 (0)	ns
Asimetrija tijela	1 (50)	0 (0)	ns
Poteškoće s hranjenjem	2 (100)	2 (67)	ns
SPOREDNI KRITERIJI RASPODJELE KLINIČKE SLIKE	N (%) ISPITANIKA GRUPE A	N (%) ISPITANIKA GRUPE B	p
Trokutasto lice	1 (50)	1 (33)	ns
Klinodaktilija 5. prsta	0 (0)	1 (33)	ns
Spušteni kutovi usana	1 (50)	0 (0)	ns
Nerazvijen govor	1 (50)	0 (0)	ns
Sindaktilija nožnih prstiju	2 (100)	0 (0)	ns
Nerazvijena motorika	0 (0)	2 (67)	ns

Kratice: N – broj ispitanika koji ima ispoljen glavni ili sporedni kriterij kliničke slike (u zagradama je isto navedeno u postotku), grupa A – ispitanici kod kojih je metodom MS-MLPA utvrđena hipometilacija gena *H19*, grupa B – ispitanici kod kojih je metodom MS-MLPA utvrđena hipermetilacija gena *GRB10* i *MEST*, ns – nije statistički značajno

4.5.3 Analiza kriterija raspodjele kliničke slike za sindrom Russell-Silver

Za RSS prema kliničkim kriterijima raspodjele postoji 6 glavnih kriterija (Tablica 4). Usporedba bolesnika kojima RSS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih kod kojih je sindrom potvrđen s obzirom na glavne kriterije raspodjele kliničke slike prikazana je na Slici 28. Povećanje broja glavnih kriterija nije proporcionalno s povećanjem broja potvrđenih bolesnika, naprotiv RSS nije potvrđen kod bolesnika s najvišim brojem kriterija.

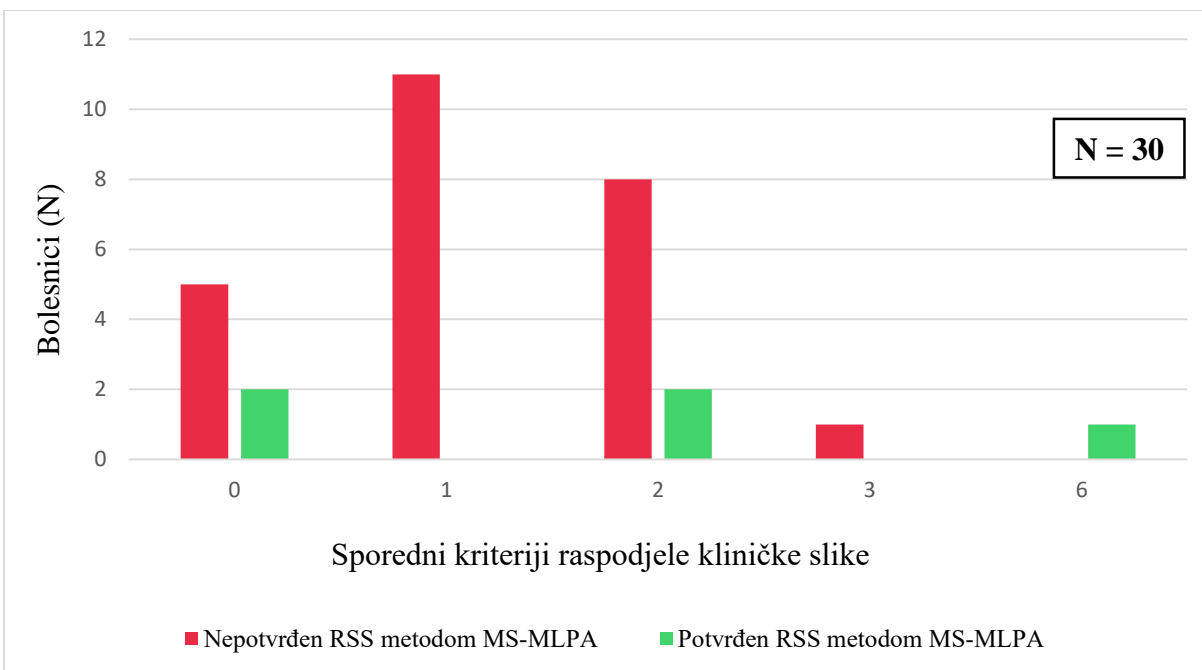


Slika 28. Prikaz raspodjele glavnih kriterija kliničke slike sindroma Russell-Silver u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, RSS – sindrom Russell-Silver

Ne postoji statistički značajna razlika u kliničkim slikama bolesnika kojima RSS nije potvrđen metodom MS-MLPA i onih bolesnika kod kojih je isti potvrđen s obzirom na glavne kriterije raspodjele kliničke slike.

Usporedba potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika, s obzirom na ukupno 11 sporednih kriterija raspodjele kliničke slike za RSS (Tablica 4), prikazana je na Slici 29. Svi nepotvrđeni bolesnici imali su jedan ili 3 sporednih kliničkih kriterija. Kod bolesnika s ukupno 6 sporednih kriterija potvrđen je RSS, dok kod bolesnika bez ili s dva sporedna kriterija ima potvrđenih i nepotvrđenih slučajeva.

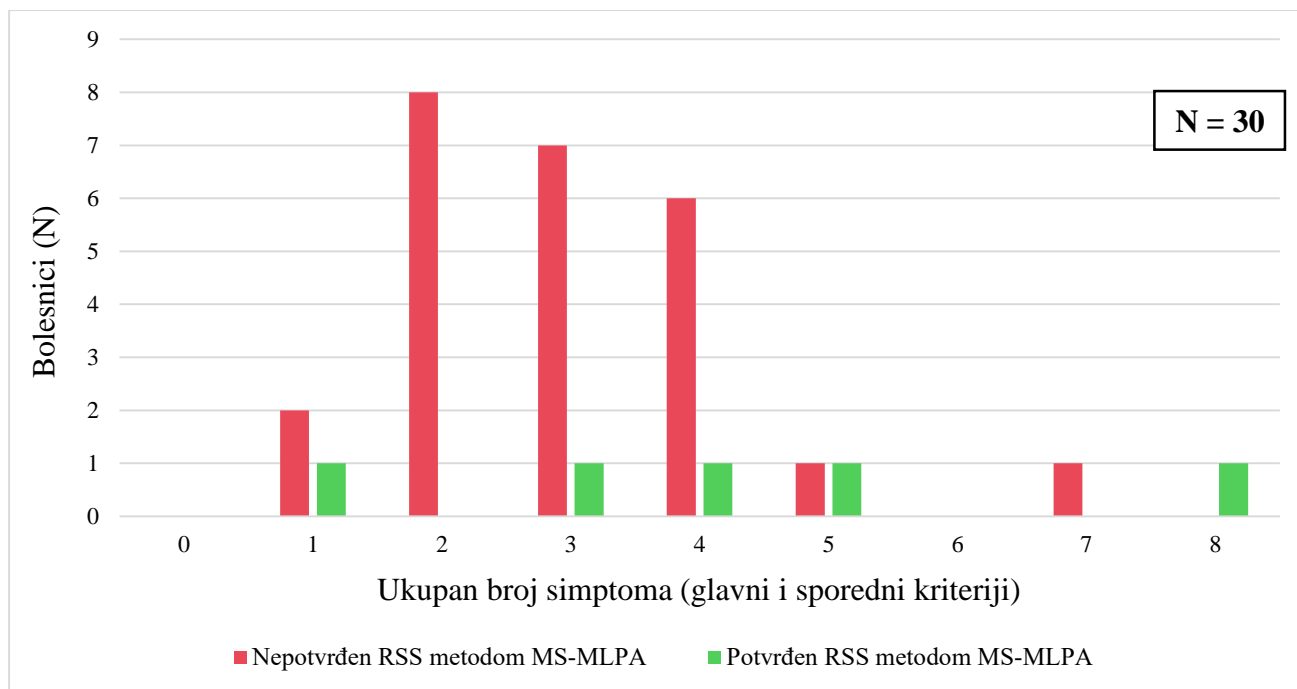


Slika 29. Prikaz raspodjele sporednih kriterija kliničke slike sindroma Russell-Silver u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, RSS – sindrom Russell-Silver

Fisherovim egzaktnim testom i testom χ^2 je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u sporednim kriterijima raspodjele kliničke slike RSS-a za bolesnike kojima sindrom nije potvrđen metodom MS-MLPA i one bolesnike kod kojih je isti otkriven.

Za RSS ukupan broj kliničkih kriterija kliničke slike iznosi 17. Usporedba potvrđenih i nepotvrđenih bolesnika, prikazana na Slici 30, pokazuje da se broj potvrđenih slučajeva ne mijenja s obzirom na ukupan broj kliničkih kriterija. Kod bolesnika s najviše ukupnih kriterija, bolesniku sa 7 kriterija RSS nije potvrđen metodom MS-MLPA, dok je bolesniku s 8 kriterija sindrom potvrđen.



Slika 30. Prikaz ukupnih, glavnih i sporednih kriterija kliničke slike sindroma Russell-Silver u odnosu na potvrđene i nepotvrđene bolesnike

Kratice: N – ukupan broj ispitanika, RSS – sindrom Russell-Silver

Utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju simptoma kliničke slike RSS-a za bolesnike kojima sindrom nije potvrđen metodom MS-MLPA i bolesnike kod kojih je isti potvrđen.

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju je provedena dijagnostika malformacijskih sindroma uzrokovanih poremećajem genomskog utiskivanja primjenom metode MS-MLPA. S obzirom na to da je riječ o vrlo rijetkim malformacijskim sindromima s vrlo malim prevalencijama kako u svijetu, tako i u Republici Hrvatskoj, istraživanje je provedeno na malim skupinama bolesnika.

Brzi napredak u molekularnoj i kliničkoj patogenezi bolesti nastalih zbog poremećaja genomskog utiskivanja jasno prikazuje složenost regulacije utiskivanja te važnost međudjelovanja genetskih, epigenetskih i okolišnih različitosti na fenotip bolesti koje obuhvaćaju poremećaj rasta, razvoja i metabolizma. Složenost njihovih molekularnih i kliničkih aspekata naglašava važnost genetske dijagnoze i savjetovanja u svrhu pružanja učinkovite individualne terapije. Za genetsko savjetovanje važno je odrediti molekularni mehanizam nastanka bolesti koji omogućuje bolji uvid u fenotip bolesnika.

Poznato je kako je uzrok nastanka PWS-a kod 60% oboljelih delecija kromosomske regije 15q11-q13 (delecija tip I i delecija tip II) porijeklom od oca (Butler, 2023). Wang i sur., (2016) dijagnostičkim testovima su utvrdili deleciju kromosomske regije 15q11-q13, porijeklom od oca, kod 16 od ukupno 20 bolesnika (80%) kao uzrok nastanka PWS-a. Međutim, u ovom istraživanju rezultati metode MS-MLPA pokazali su kako je od ukupno 15 bolesnika kojima je potvrđen PWS, kod njih 7 (47%) pronađena promjena u broju kopija gena (delecija PWS SRO, delecija tip I i delecija tip II. Kod preostalih 8 ispitanika (53%) je otkrivena promjena metilacijskog statusa, odnosno hipermetilacija utisnutih gena *SNRPN* i *MAGEL2* (Slika 13). Time se utvrdilo da su u približno jednakom postotku hipermetilacija i delecija uzroci potvrđenih PWS-a. Kod jednog bolesnika nađena je atipična delecija PWS SRO, što se poklapa s dosadašnjim literaturnim podacima prema kojima učestalost navedenih delecija iznosi 1-3% (Perk i sur., 2002).

Prema podacima iz literature, bolesnici s PWS-om čiji je uzrok delecija, češće imaju nisku porođajnu težinu, hipotoniju, poteškoće s hranjenjem i spavanjem, hipogonadizam i govorno-jezične nedostatke (Varela i sur., 2005). Spritz i sur., (1997) ustanovili su da bolesnici s delecijom imaju veću stopu hipopigmentacije zbog gubitka ekspresije gena *P*, koji je najviše povezan s genom *OCA2*. Međutim, kako su pokazali Butler i sur., (2009), tip delecije (tip I ili II) također utječe na kliničku sliku. Utvrđeno je da bolesnici s delecijom tipa I imaju ozbiljniju kliničku prezentaciju u usporedbi s bolesnicima s delecijama tipa II. Češće je prisutno samoozljeđivanje, nedostatak

adaptivnih vještina, opsesivno-kompulzivno ponašanje i poteškoće u učenju. Važno je spomenuti da bolesnici s delecijom tipa I imaju tendenciju kasnijeg usvajanja govora, nego oni s tipom II (4,3 godine u odnosu na 3,4 godine starosti). Kada se, ovisno o sadržaju gena, uspoređuju dvije glavne vrste delecija, četiri gena (*NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* i *GCP5*) smještena između proksimalnih točaka loma BP1 i BP2 dodatno su deletirana kod delecije tipa I. Geni *NIPAI*, *NIPA2* i *CYFIP1* imaju važnu ulogu u razvoju i funkciji središnjeg živčanog sustava, a gen *NIPA2* ima najznačajniji utjecaj na kliničku sliku (Bittel i Butler, 2005). Bolesnici s majčinom UPD-om 15 (promjena metilacijskog statusa bez prisutnosti delecije) imaju učestalije psihoze i poremećaje iz autističnog spektra (Whittington i sur., 2004). Rezultati ovog istraživanja djelomično se poklapaju s literaturnim podacima. Bolesnici s pronađenom delecijom imaju hipopigmentaciju kože i kose i izražen hipogonadizam. Također, kod njih je u većoj mjeri prisutno psihomotorno zaostajanje u odnosu na bolesnike s promijenjenim metilacijskim statusom. Prema Tablici 9 ustanovili smo kako je kod bolesnika s promijenjenim metilacijskim statusom u većoj mjeri prisutan nerazvijen govor u odnosu na bolesnike kod kojih je prisutna delecija. Međutim, prema izračunu Fisherovog egzaktnog testa utvrdili smo da ne postoji statistički značajna razlika u fenotipovima bolesnika oboljelih od PWS-a.

Istraživanja pokazuju kako 70% osoba obolijeva od AS-a zbog delecije kromosomske regije 15q11-q13 porijeklom od majke (Margolis i sur., 2015), što je potvrđeno ovim radom. Naime, navedena delecija je uzrok AS-a kod 75% naših bolesnika (Slika 18). Delecija od točke loma BP1 do BP5 pojavljuje se vrlo rijetko, a bolesnici s ovim tipom delecije, zbog obuhvaćenosti većeg broja gena, imaju vrlo tešku kliničku sliku u vidu težeg stupnja razvojnog zaostajanja, epileptičnih napadaja, hiperaktivnosti itd. Prema literaturi utvrđeno je da približno 40–50% bolesnika s AS-om, kod kojih nije nađena delecija, ima mozaik metilacijskog statusa (Buiting, 2010). Takvi bolesnici obično pokazuju simptomatologiju koja se može identificirati kao AS. Međutim, postoje iznimke, uključujući bolesnike koji su imali blagi zastoj u razvoju, pretilost, hipotoniju i/ili fenotip sličan PWS, što je bio slučaj i kod našeg bolesnika (Brockmann i sur., 2002; Camrubi i sur., 2007).

Ozbiljnost fenotipa AS-a ovisi o njegovoj molekularnoj etiologiji. Bolesnici s delecijom obično imaju teži fenotip (Lossie i sur., 2001). Prethodna istraživanja pokazala su da bolesnici s AS-om uzrokovanim delecijom 15q11-13 imaju usporeni psihomotorni razvoj, kognitivne vještine, albinizam, ataksiju i više autističnih obilježja (Yang i sur., 2021). Zbog premalog broja ispitanika

oboljelih od AS-a, u ovom istraživanju nije bilo moguće provesti usporedbu fenotipova bolesnika u odnosu na genotip te utvrditi statističku značajnost. Ipak, treba naglasiti kako su u ovom istraživanju bolesnici oboljeli od delecije imali tešku kliničku sliku u vidu psihomotornog zaostajanja, nerazvijenog govora, nerazvijene motorike, napadaja, dok je bolesnik s utvrđenom mozaičnom hipometilacijom imao lakšu kliničku sliku.

Pogreške utiskivanja uzrokovane promijenjenom metilacijom DNA najčešći su uzrok nastanka BWS-a (80%) (Brioude i sur., 2018). Prema literaturi, hipermetilacija ICR1 na majčinom alelu nalazi se u 5–10% bolesnika, dok je hipometilacija ICR2 prisutna u 50% bolesnika (Eggerman i sur., 2014). U ovom istraživanju kod svih bolesnika uzrok BWS-a je hipometilacija ICR2 (Slika 23). Dosadašnja istraživanja ukazuju da kliničke značajke BWS-a ne moraju uvijek biti iste kod jednojajčanih blizanaca. Jedan blizanac može imati težu kliničku sliku što predstavlja veći izazov u dijagnostici i liječenju (Cohen i sur., 2019). Navedeno smo potvrdili i u ovom istraživanju. Naime, bolesnici pod šiframa 321 i 322 su jednojajčane blizanke ženskog spola kod kojih je pronađena hipometilacija gena *KCNQ1OT1* te je dijagnosticiran BWS. Međutim, bolesnica pod šifrom 321 ima tešku kliničku sliku (makrosomija, makroglosija, duboko usađene oči, zarezi na ušnim resicama, cista desnog bubrega itd.), dok bolesnica pod šifrom 322 nema fenotipske karakteristike sindroma (nema dismorfije, neurološki status primijenjen dobi, odlično opće stanje). Ipak, postoji pojava koja se naziva blizanačka transfuzija koja se pojavljuje kod 5.5% do 17.5% jednojajčanih blizanaca. Naime, može doći do neravnomjerne raspodjele krvi između dva fetusa kroz njihove zajedničke krvne žile u posteljici. Tako jedan fetus prenosi više krvi drugom fetusu (El Kateb i Ville, 2008). Postoji mogućnost da je to bio slučaj i u našem istraživanju, stoga je potrebno uzorkovati kožu umjesto krvi te napraviti dijagnostiku metodom MS-MLPA kako bi se utvrdilo ima li druga blizanka zaista BWS jer nema izražene simptome istog.

Širok raspon fenotipa, u rasponu od letalnih do blagih i nepotpunih oblika, karakterizira BWS. Ova vrlo varijabilna ekspresija fenotipa sukladna je na molekularnoj razini sa složenom heterogenošću (epi)genetskih poremećaja na kromosomu 11p15.5. Prema dosadašnjim korelacijama između genotipa i fenotipa bolesnici s UPD-om 11p15.5 ili povećanjem metilacije u ICR1 imaju najveći rizik od razvoja Wilmsovog tumora ili hepatoblastoma (približno 16, odnosno 30%), makrosomije i makroglosije (Maas i sur., 2016). Hipometilacija ICR2 i točkaste mutacije *CDKN1C* povezane su s nastankom omfalokele (Engel i sur., 2000). S obzirom da u ovom

istraživanju svi ispitanici imaju isti uzrok nastanka bolesti (hipometilacija ICR2), nije bilo moguće provesti usporedbu fenotipova u odnosu na genotip. Ipak, važno je utvrditi kako je u ovom istraživanju kod 42% ispitanika oboljelih od BWS-a omfalokela izražena kao jedan od glavnih kriterija raspodjele kliničke slike, što se poklapa s literaturnim podacima.

Molekularna podloga RSS-a ostaje nepoznata u 30-40% bolesnika (Eggerman i sur., 2015). Ostali molekularni uzroci uključuju hipometilaciju očinskog ICR1 na kromosomu 11p15.5 (40-60%) i patogene varijante gena *CDKN1C* i *IGF2* (<1%). Otprilike 7-10% slučajeva RSS-a uzrokovano je UPD-om 7 porijeklom od majke (Eggerman i sur., 2010). Ovim radom kao uzrok RSS-a u puno većem postotku, u odnosu na literaturne podatke (60%), određena je hipermetilacija gena *GRB10* i *MEST*, odnosno majčina UPD 7. Kod preostalih bolesnika (40%) pronađena je hipometilacija gena *H19* (Slika 27).

Bolesnici koji obolijevaju od RSS-a zbog epimutacije kromosomske regije 11p15 (hipometilacija gena *H19*) imaju klasičan fenotip karakterističan za sindrom. Takvi su bolesnici niski, mršavi, postanatalno zaostaju u rastu te učestalo imaju asimetriju dijelova tijela. S druge strane, bolesnici s CNV i promjenom metilacijskog statusa na kromosomu 7 imaju blaži fenotip. Ipak, kod takvih bolesnika prevladavaju intelektualne poteškoće, nerazvijen govor i motorika, makrocefalija te klinodaktilija 5. prsta (Eggerman i sur., 2010). Prema rezultatima ovog istraživanja, smanjena porođajna težina i visina te postnatalni zastoje u rastu prate obje skupine bolesnika podjednako, što se podudara s dosadašnjim podacima iz literature. Također asimetrija tijela više je izražena kod bolesnika s hipometilacijom gena *H19*, a makrocefalija, klinodaktilija 5. prsta te nerazvijena motorika više su izraženi kod skupine bolesnika s hipermetilacijom gena *GRB10* i *MEST* smještenih na kromosomu 7 (Tablica 11).

Prema istraživanju autora Shi i sur., (2024) postotak potvrđenih bolesnika s metodom MS-MLPA kod bolesnika sa sumnjom na PWS bio je 15%, dok je isti za AS iznosio 30%. Za usporedbu, u ovom radu postotak potvrđenog PWS bio je 37%, a za AS 44% (Slika 12). Na broj potvrđenih bolesnika utječe precizna klinička indikacija. Međutim, u nekim slučajevima, npr. zbog mozaicizma genetičkog uzroka, fenotip može pogrešno ukazivati na određeni sindrom. Dva bolesnika u ovom istraživanju imala su fenotip karakterističan za PWS. Metodom MS-MLPA kod jednog je utvrđena snižena razina metilacije (18%), koja kod zdravih osoba iznosi 50% (Slika 19), što ukazuje na vrlo rijetki mozaični metilacijski obrazac, koji je u ovom slučaju bio uzrok AS-a.

Kod drugog bolesnika primjenom metode MS MLPA kao genetički uzrok određena je duplikacija 15q11.2-13.1, odnosno nije potvrđen PWS nego otkriven sindrom duplikacije kromosoma (sindrom dup15q). Klinički je prepoznatljiv sindrom koji nastaje zbog duplikacije PWS/AS kritične regije. Navedeni duplikacijski sindrom ima značajke i PWS-a i AS-a, a karakterizira ga hipotonija i kašnjenje grube i fine motorike, varijabilni intelektualni poremećaj, poremećaj autističnog spektra i epilepsija. Iz ovog primjera vidljivo je da je zbog postojanja diferencijalne dijagnoze za svaki od četiri malformacijska sindroma uzrokovanih genomskim utiskivanjem, potrebno provesti molekularnu dijagnostiku kako bi se utvrdilo o kojem je sindromu riječ te kako bi se moglo provesti učinkovito genetsko savjetovanje te prilagoditi terapiju za pojedinca. Primjerice, sindrom Schaff-Yang, sindrom Cohen, sindrom Alström te sindrom Bardet-Bidel mogu prema simptomima kliničke slike upućivati na PWS (Butler i sur., 2019). Također, slični simptomi AS-u mogu biti prisutni kod pojedinaca oboljelih od sindroma Pitt-Hopkins, sindroma Christianson, sindroma Mowatt-Wilson, sindroma Koolen de Vries itd. (Margolis i sur., 2015). Nadalje, raspoznavanje BWS-a prema kliničkoj slici može biti otežano zbog sindroma koji imaju preklapajuće simptome BWS-u, a to su sindrom Kagami-Ogata, sindrom Costell, sindrom Simpson-Golabi-Behmel i još nekolicina drugih (Engel i sur., 2000). Postoji nekoliko sindroma čiji se fenotip djelomično poklapa sa fenotipom osoba oboljelih od RSS-a, a to su sindrom Bloom, sindrom Meier-Gorlin te sindrom Nijmegen (Wakeling i sur., 2016).

Metoda MS-MLPA omogućuje razlikovanje poremećaja genomskog utiskivanja od poremećaja sa sličnim, odnosno preklapajućim kliničkim značajkama (Moelans i sur., 2017). Ona omogućuje analizu promjena metilacijskog statusa i određivanje broja kopija gena u jednoj reakciji te točnu i preciznu potvrdu uputne dijagnoze. Također, ova metoda omogućuje analizu više lokusa u jednoj reakciji, što je vrlo korisno za analizu poremećaja genomskog utiskivanja gdje može biti uključeno više gena i regija. Korištenjem ove metode u dijagnostici malformacijskih sindroma dobivaju se podaci poput postotka promjene metilacije u pojedinim uzorcima, što je ključno pri razumijevanju ozbiljnosti poremećaja i prilagođavanje terapije za pojedinca.

Ovim istraživanjem potvrdila se postavljena hipoteza te je ustanovljeno da točno otkrivanje genetičkog uzroka sindroma nastalih zbog poremećaja genomskog utiskivanja primjenom tehnike molekularne citogenetike omogućuje bolje praćenje i genetsko savjetovanje bolesnika u svrhu pružanja učinkovite individualne terapije. Istraživanje je provedeno na malim uzorcima te bolesnici

nisu rasčlanjeni prema dobnim skupinama, što je potencijalno moglo utjecati na rezultat. U budućnosti bi bilo korisno provesti ovakav tip analize na većem uzorku bolesnika, rasčlaniti ih prema dobnim skupinama, pratiti opće stanje svakog bolesnika kroz godine te napraviti usporedbu učinkovitosti metode MS-MLPA s drugim molekularnim metodama koje mogu poslužiti kao alat za dijagnostiku sindroma uzrokovanih genomskim utiskivanjem.

6. ZAKLJUČAK

1. Metodom MS-MLPA je PWS potvrđen kod 37% bolesnika.
2. Delecija je genetički uzrok PWS-a kod 47% bolesnika, dok je promjena metilacijskog statusa gena *SNRPN* i *MAGEL2* pronađena kod 53% bolesnika.
3. Primjenom metode MS-MLPA za 44% bolesnika potvrđen je AS.
4. Kod potvrđenih bolesnika s AS-om genetički uzroci nastanka bolesti su delecija (75%) i mozaična hipometilacija (25%).
3. Sindrom Beckwith-Wiedemann potvrđen je kod 52% bolesnika. Svi ispitanici imaju isti molekularni uzrok nastanka bolesti, hipometilaciju gena *KCNQ1OT1*.
4. U skupini bolesnika sa sumnjom na RSS samo je kod 17% bolesnika potvrđen sindrom primjenom metode MS-MLPA.
5. Kao genetički uzrok bolesnika s RSS-om kod 60% ispitanika utvrđena je hipermetilacija gena *GRB10* i *MEST* (UPD 7), dok je kod 40% bolesnika utvrđena hipometilacija gena *H19*.
5. Usporedbom fenotipa ovisno o molekularnom mehanizmu nastanka bolesti za PWS i RSS nije utvrđena statistički značajna razlika.
6. Nije utvrđena statistički značajna razlika između fenotipa ispitanika kod kojih nije pronađena promjena u broju kopija gena i/ili metilacijskog statusa i onih kod kojih je ista otkrivena za sva četiri promatrana sindroma (PWS, AS, BWS i RSS).
7. Istraživanjem je utvrđena važnost metode MS-MLPA u dijagnostici malformacijskih sindroma uzrokovanih genomskim utiskivanjem.

7. POPIS LITERATURE

Andelić, M. (2016) Primjena MLPA analize u detekciji submikroskopskih kromosomskih duplikacija i delecija. Diplomski rad, Sveučilište u Osijeku, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Osijek.

Angulo, M. A., Butler, M. G., Cataletto, M. E. (2015) Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *Journal of Endocrinological Investigation* 38: 1249-1263.

Bajrami, E., Spiroski, M. (2016) Genomic Imprinting. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 4: 181-184.

Berland, S. (2022) Deciphering rare imprinting disorders within the Beckwith-Wiedemann spectrum. Doktorski rad, Sveučilište u Bergenu, Norveška.

Berland, S., Haukanes, B. I., Juliusson, P. B., Houge, G. (2020) Deep exploration of a *CDKN1C* mutation causing a mixture of Beckwith-Wiedemann and IMAGe syndromes revealed a novel transcript associated with developmental delay. *Journal of Medical Genetics* 59: 155-164.

Binder G., Ziegler J., Schweizer R., Habhab W., Haack T. B. i sur. (2020) Novel mutation points to a hot spot in *CDKN1C* causing Silver-Russell syndrome. *Clinical Epigenetics* 12: 1-7.

Bird, L. M. (2014) Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *The Application of Clinical Genetics* 7: 93-104.

Bittel, D. C., Butler, M. G. (2005) Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14: 1-20.

Brockmann, K., Böhm, R., Bürger, J. (2002) Exceptionally mild Angelman syndrome phenotype associated with an incomplete imprinting defect. *Journal of Medical Genetics* 39: 1-3.

Butler, M. G. (2023) Prader–Willi Syndrome and Chromosome 15q11.2 BP1-BP2 Region: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1-13.

Butler, M. G. , Sturich, J., Myers, S. E., Gold, J. A., Kimonis, V., Driscoll, D. J. (2009) Is gestation in Prader-Willi syndrome affected by the genetic subtype? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 8: 461-466.

Camprubi, C., Coll, M. D., Villatoro, S., Gabau, E., Kamli, A. (2007) Imprinting center analysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients with typical and atypical phenotypes. *European Journal of Medical Genetics* 50: 11-20.

Cassidy, S., Schwartz, S., Miller, J. L., Driscoll, D. J. (2012) Prader-Willi syndrome. *Genetics in Medicine* 14: 10-26.

Chamberlain, S. J., Lalande, M. (2010) Neurodevelopmental disorders involving genomic imprinting at human chromosome 15q11–q13. *Neurobiology of Disease* 39: 13-20.

Chao, Y., Qin, Y., Zou, X., Wang, X., Hu, C., Xia, F., Zou, C. (2022) Promising therapeutic aspects in human genetic imprinting disorders. *Clinical Epigenetics* 14: 1-19.

Cheon, C. K. (2016) Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 21: 126-135.

Choufani, S., Shuman, C., Weksberg, R. (2013) Molecular Findings in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 163: 131–140.

Cohen, J., Duffy, K. A., Sajorda, B. J., Hathaway, E. R., Gonzalez-Gandolfi, C. X. i sur. (2019) Diagnosis and management of the phenotypic spectrum of twins with Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 7: 1139–1147.

Dagli, A., Buiting, K., Williams, C. A. (2011) Molecular and Clinical Aspects of Angelman Syndrome. *Molecular Syndromology* 2: 100-112.

Dangerfield, T. L., Huang, N. Z., Johnson, K. A. (2021). High throughput quantification of short nucleic acid samples by capillary electrophoresis with automated data processing. *Analytical Biochemistry* 629: 1-8.

Eggerman, T., Algar, E., Lapunzina, P., Mackay, D., Maher, E. R. i sur. (2014) Clinical utility gene card for: Beckwith–Wiedemann Syndrome. *European Journal of Human Genetics* 22: 1-4.

Eggerman, T., Beggeman, M., Kurth, I., Elbracht, M. (2019) Contribution of *GRB10* to the prenatal phenotype in Silver-Russell syndrome? Lessons from 7p12 copy number variations. *European Journal of Medical Genetics* 62: 1-4.

Eggerman, T., Beggeman, M., Binder, G., Spengler, S. (2010) Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5: 1-8.

Eggermann, T., Perez de Nanclares, G., Maher, E. R., Temple, I. K., Tümer, Z. i sur. (2015) Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clinical Epigenetics* 7: 1-18.

Eggerman, T., Maher, E. R., Kratz, C. P., Prawitt, D. (2022) Molecular Basis of Beckwith–Wiedemann Syndrome Spectrum with Associated Tumors and Consequences for Clinical Practice. *Cancers* 14: 1-13.

El Kateb, A., Ville, Y. (2008) Update on twin-to-twin transfusion syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 22: 63-75.

Elbracht, M., Binder, G., Hiort, O., Kiewert, C., Cratz, C., Eggerman, T. (2020) Clinical spectrum and management of imprinting disorders. *Medizinische Genetik* 32: 321-334.

Engel, J. R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M. J., Oshimura, M. i sur. (2000) Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of Medical Genetics* 37: 921-926.

Fontana, L., Tabano, S., Maitz, S., Colapietro, P., Garzia, E. i sur. (2021) Clinical and Molecular Diagnosis of Beckwith-Wiedemann Syndrome with Single-or Multi-Locus Imprinting Disturbance. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 1-21.

Grechi, E., Camaratta, B., Mariani, B., Di Candia, S., Chiumello, G. (2012) Prader-Willi Syndrome: Clinical Aspects. *Journal of Obesity* 2012: 1-13.

Holm, V. A., Cassidy, S. B., Butler, M. G., Hanchett, J. M., Greenswag, L. R., Whitman, B. Y., Greenberg, F. (1993) Prader-Willi Syndrome: Consensus Diagnostic Criteria. *Pediatrics* 91: 398-402.

Ishida, M. (2016) New developments in Silver–Russell syndrome and implications for clinical practice. *Epigenomics* 8: 563-580.

Ishida, M., Moore, G. E. (2012) The role of imprinted genes in humans. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 826-840.

Kalish J. M., Conlin L. K., Bhatti T. R., Dubbs H. A., Harris M. C. i sur. (2013) Clinical features of three girls with mosaic genome-wide paternal uniparental isodisomy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 161: 1929–1939.

Kalish, J., Jiang, C., Bartolomei, M. S. (2014) Epigenetics and imprinting in human disease. *The International Journal of Developmental Biology* 58: 291-298.

Kalsner, L., Chamberlain, S. J. (2015) Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 duplication syndromes. *Pediatric Clinics of North America* 62: 587-606.

Khatri, N., Man, H-Y. (2019) The Autism and Angelman Syndrome Protein UBE3A/E6AP : The Gene, E3 Ligase Ubiquitination Targets and Neurobiological Functions. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12: 1-12.

Kim, S-J., Miller, J. L., Kuipers, P. J., German, J. R., Beaudet, A. L., Sahoo, T., Driscoll, D. J. (2012) Unique and atypical deletions in Prader–Willi syndrome reveal distinct phenotypes. *European Journal of Human Genetics* 20: 283-290.

Kishino, T., Lalonde, M., Wagstaff, J. (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genetics* 15: 70-73.

Lawson, H. A., Cheverud, J. M., Wolf, J. B. (2013) Genomic imprinting and parent-of-origin effects on complex traits. *Nature Reviews Genetics* 14: 609-617.

Lossie, A. C., Whitney, M. M., Amidon, D., Dong, H. J., Chen, P. i sur. (2001) Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *Journal of Medical Genetics* 38: 834-845.

Maas, S. M., Vansenne, F., Kadouch, D. J. M., Ibrahim, A., Bliet, J. i sur. (2016) Phenotype, cancer risk, and surveillance in Beckwith–Wiedemann syndrome depending on molecular genetic subgroups. *American Journal of Human Genetics* 170: 2248-2260.

Mabb, A. M., Juddson, M. C., Zylka, M. J., Philpot, D. J. (2011) Angelman Syndrome: Insights into Genomic Imprinting and Neurodevelopmental Phenotypes. *Trends in Neurosciences* 34: 293-303.

Maeda, T., Higashimoto, K., Jozaki, K., Yatsuki, H., Nakabayashi, K., Makita, Y. i sur. (2014) Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genetics in Medicine* 16: 903-912.

Moelans, C. B., Atanesyan, L., Savola, S. P., & van Diest, P. J. (2017) Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA). *DNA Methylation Protocols* 1708: 537-549.

Õunap, K. (2016) Silver-Russell Syndrome and Beckwith-Wiedemann Syndrome: Opposite Phenotypes with Heterogeneous Molecular Etiology. *Molecular Syndromology* 7: 110-121.

Perk, J., Makedonski, K., Lande, L., Cedar, H., Razin, A., Shemer, R. (2002) The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *The European Molecular Biology Organization Journal* 21: 5807-5814.

Sabir A. H, Ryan G., Mohammed Z., Kirk J., Kiely N., Thyagarajan M., Cole, T. (2019) Familial Russell-Silver syndrome like phenotype in the PCNA domain of the *CDKN1C* gene, a further case. *Case Reports in Genetics* 2019: 1-8.

Sell, G. L., Margolis, S. S. (2015) From *UBE3A* to Angelman syndrome: a substrate perspective. *Frontiers in Neuroscience* 9: 1-6.

Shi, X., Fletcher, R., Wang, J., Lally, M., Posey, S. i sur. (2024) Clinical Utility Of MS-MLPA For The Diagnosis Of Prader-Willi/Angelman Syndrome: The GGC Experience. *Genetics in Medicine Open* 2: 101507.

Soellner L., Begemann M., Mackay D. J., Gronskov K., Tumer, Z. i sur. (2017) Recent advances in imprinting disorders. *Clinical Genetics* 91: 3-13.

Spritz, R. A., Bailin, T., Nicholls, R. D., Lee, S. T. , Park, S. K. i sur. (1997) Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *American Journal of Medical Genetics* 71: 57-62.

Varela, M.C., Kok, F., Setian, N., Kim, C.A., Koiffmann, C. P. (2005) Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clinical Genetics* 67: 47-52.

Wakeling, E. L., Brioude, F., Lokulo-Sodipe, O., O'Connell, S. M., Salem, J. i sur. (2016). Diagnosis and management of Silver–Russell syndrome: first international consensus statement. *Nature Reviews Endocrinology* 13: 105-124.

Wang, K. H., Kupa, J., Duffy, K. A., Kalish, J. M. (2020) Diagnosis and Management of Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Frontiers in Pediatrics* 7: 1-12.

Whittington, J., Holland, A., Webb, T., Butler, J., Clarke, D. i sur. (2004) Cognitive abilities and genotype in a population-based sample of people with Prader-Willi syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research* 48: 172-187.

Williams, C. A., Driscoll, D. J., Dagli, A. I. (2010) Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genetics in Medicine* 12: 385-395.

Yang, L., Shu, X., Mao, S., Wang, Y., Du, X., Zou, C. (2021) Genotype–Phenotype Correlations in Angelman Syndrome. *Genes* 7: 1-10.

Internetski izvori :

Web1. Strong, T. V. (2020) What is Prader-Willi Syndrome? Foundation for Prader-Willi Research. <https://www.fpwr.org/what-is-prader-willi-syndrome#definition> (pristupljeno 05.02.2024.)

Web2. MRC Holland (2022) MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). General Protocol for the detection and quantification of DNA sequences and methylation profiling. <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/ms-mlpa-technique> (pristupljeno 15.01.2024)

Web3. BIS research (2022) Understanding Capillary Electrophoresis and its Methods. LinkedIn. <https://www.linkedin.com/pulse/understanding-capillary-electrophoresis-its-methods-bis-research> (pristupljeno 07.02.2024.)

Web4. Juras, A. (2021) Dijagnostika Prader-Willi sindroma. <https://ozs.unist.hr/hr/novosti/1216-nastupno-predavanje-dr-sc-ana-juras>. (pristupljeno 01.03.2024.)

8. ŽIVOTOPIS

Nina Zečević rođena je 23. srpnja 1998. godine u Osijeku. Nakon završene Osnovne škole Matije Petar Katančić i Opće gimnazije u Valpovu, nastavlja školovanje na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na Odjelu za biologiju. Godine 2021. stječe titulu prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.) te odlazi u Zagreb s ciljem nastavljanja školovanja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija. Izradu diplomskog rada započinje na Odjelu za citogenetiku u Kliničkom bolničkom centru u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Kristine Crkvenac Gornik te komentorstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić.