

UNIVERZA V LJUBLJANI



FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA FICKO

**ANALIZA SUBTELOMERNIH PREUREDITEV PRI OTROCIH IN
MLADOSTNIKIH Z RAZVOJNIM ZAOSTANKOM TER
IDIOPATSKO DUŠEVNO MANJRAZVITOSTJO**

**SUBTELOMERIC REARRANGEMENTS ANALYSIS IN CHILDREN
AND ADOLESCENTS WITH DEVELOPMENTAL DELAY AND
IDIOPATHIC MENTAL RETARDATION**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo sem opravljala v citogenetskem laboratoriju Pediatrične klinike v Ljubljani, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorice dr. Tinke Hovnik.

Zahvala

Vodji laboratorija Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike, Mirjani Zupančič mag. med. biochem., se zahvaljujem, da mi je omogočila opravljanje dela v laboratoriju klinike.

Iskrena hvala tudi mentorju, izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, za vso pomoč, nasvete in temeljit pregled magistrske naloge.

Somentorici dr. Tinki Hovnik se iz srca zahvaljujem za vse nasvete in spodbudne besede, najine dolge pogovore ter izkazano strokovno pomoč.

Jerneju Kovaču se zahvaljujem, da me je vpeljal v »svet« citogenetike.

Vandi se zahvaljuje za vso pomoč, predvsem pa, da me je ves čas nastajanja naloge potrpežljivo »prenašala«.

Za podporo se zahvaljujem vodji in vsem zaposlenim v laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike.

Globoko hvaležnost za potrpežljivost, spodbudo in nesebično podporo pa izražam mojim, Juretu, Erazmu in Tinkari.

Nazadnje se za vse zahvaljujem tudi staršema in bratu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Matjaža Jerasa.

Maja Ficko

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Mentor: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Somentorica: dr. Tinka Hovnik

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak

KAZALO

POVZETEK	5
ABSTRACT	6
SEZNAM OKRAJŠAV	7
1. UVOD	8
1.1 DUŠEVNA MANJRAZVITOST PRI OTROCIH IN MLADOSTNIKI.....	8
1.1.1 STOPNJE DUŠEVNE MANJRAZVITOSTI.....	11
1.1.2 ETIOLOGIJA DUŠEVNE MANJRAZVITOSTI	12
1.1.3 KROMOSOMSKE SPREMEMBE POVEZANE Z DM	13
1.1.4 KLASIČNA CITOGENETSKA ANALIZA IN STOPENJSKA DIAGNOSTIKA.....	14
1.2 TELOMERI	16
1.2.1 STRUKTURA TELOMEROV	16
1.2.2 FUNKCIJA TELOMEROV	18
1.3 SUBTELOMERNE KROMOSOMSKE PREUREDITVE PRI IDIOPATSKI DUŠEVNI MANJRAZVITOSTI (IDM)	18
1.3.1 PREVALENCA SUBTELOMERNIH PREUREDITEV PRI IDIOPATSKI DUŠEVNI MANJRAZVITOSTI (IDM)	19
1.3.2 IZBOR PREISKOVANCEV	21
2. NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA.....	22
3. MATERIALI IN METODE	23
3.1 SHEMA POTEKA DELA.....	23
3.2 METODE IN MATERIALI	24
3.2.1 IZBOR IN VKLJUČITEV PREISKOVANCEV	24
3.2.2 GOJENJE CELIC PERIFERNE KRVI	24
3.2.3 IZOLACIJA LIMFOCITOV IZ PERIFERNE KRVI (HIPOTONIJA IN FIKSACIJA)	26
3.2.4 PRIPRAVA PREPARATOV ZA KARIOTIPIZACIJO IN FISH.....	28
3.2.5 BARVANJE GTG	30
3.2.6 KARIOTIPIZACIJA IN ANALIZA	33
3.2.7 ANALIZA FISH SUBTELOMERNIH REGIJ.....	34
3.2.8 INTERPRETACIJA REZULTATOV	38
3.2.9 ANALIZA PODATKOV	39
4. REZULTATI	40
4.1 PREISKOVANCI.....	40

4.2 POGOSTOST SUBTELOMERNIH KROMOSOMSKIH DELECIJ ZAZNANIH Z METODO SIMULTANE FISH.....	41
4.3 OPISI POSAMEZNIH PRIMEROV UGOTOVLJENIH SUBTELOMERNIH DELECIJ.....	42
5. RAZPRAVA	52
5.1 PREISKOVANCI.....	52
5.2 POGOSTOST.....	54
5.3 CITOGENETSKE IN KLINIČNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV S SUBTELOMERNIMI DELECIJAMI.....	55
6. ZAKLJUČKI.....	61
7. LITERATURA.....	62
8. PRILOGE.....	67
Priloga I:.....	67

POVZETEK

Preureditve subtelomernih področij kromosomov so statistično pomembno povezane z razvojnim zaostankom (RZ) ter idiopatsko duševno manjrazvitostjo (IDM). Na subtelomernih področjih kromosomov se namreč nahajajo številni funkcionalni geni, prav tako so na teh področjih pogoste preureditve kromosomov: delecije, duplikacije in neuravnotežene translokacije. Študije dokazujejo, da je pogostost pojavljanja subtelomernih preureditev pri bolnikih z IDM med 0,5% do 23,5%. Te preureditve so največkrat tako majhne, da jih ne moremo zaznati s standardno citogenetsko analizo z ločljivostjo 5-10 Mb. Za presejanje subtelomernih preureditev pa sicer obstaja več molekularno-genetskih in citogenetskih metod. Najpogostejša med njimi je metoda simultane fluorescentne in situ hibridizacije (FISH), uveljavljena pa je tudi metoda od ligacije odvisnega hkratnega pomnoževanja sond (MLPA).

V magistrski nalogi smo želeli določiti pogostost subtelomernih preureditev pri izbranih bolnikih, ki so bili napoteni v citogenetski laboratorij Pediatrične klinike v Ljubljani ter določiti uporabnost metode FISH pri kliničnem diagnosticiranju RZ/IDM.

V študijo smo vključili in nato pregledali 103 preiskovance, ki so bili v naš laboratorij napoteni z naslednjimi diagnozami: duševna manjrazvitost (DM), razvojni zaostanek (RZ) in epilepsija, bodisi z dismorfniimi znaki ali z nenormalno nevrološko simptomatiko. Izključili pa smo vse tiste preiskovance, pri katerih so bili klinični znaki del jasno opredeljenega in določenega sindroma.

Subtelomerne kromosomske preureditve smo odkrili pri petih preiskovancih (4,85%), kar se ujema s predhodno objavljenimi rezultati.

Zaključimo lahko, da je metoda FISH primerno diagnostično orodje za odkrivanje subtelomernih kromosomskih preureditev pri izbranih preiskovancih oz. pri diagnosticiranju RZ/IDM.

ABSTRACT

Rearrangements of the subtelomeric regions of chromosomes account for a significant proportion of developmental delay (DD) and idiopathic mental retardation (IMR). Subtelomeric regions of chromosomes include functional genes and are often involved in chromosomal rearrangements (deletions, duplications, unbalanced translocations) which may have clinical consequences. Such small chromosomal rearrangements can be missed by conventional cytogenetic analysis (resolution 5-10 Mb). Studies revealed that the frequency of subtelomeric rearrangements in subjects with developmental delay and/or idiopathic mental retardation (DD/IMR) ranged between 0,5% and 23,5%. There are several molecular-genetic and cytogenetic laboratory techniques for screening of subtelomeric rearrangements e.g., fluorescent in situ hybridization (FISH). Recently the use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) has also been described.

The presented study was carried out to identify the prevalence of subtelomeric rearrangements in selected patients and to determine the usefulness of FISH in clinical trials of DD/MR.

103 individuals were studied. The study subjects were posted to Pediatric clinic, Ljubljana. Patients were referred to cytogenetic laboratory with the following diagnoses: mental retardation (MR), developmental delay (DD), epilepsy either with dysmorphic features or abnormal neurological symptoms. Subjects with clear clinical syndroms were excluded.

Five cases were identified with subtelomeric rearrangements (4,85%). The frequency is comparable to previously reported studies, in which subtelomeric defects were identified in approximately 5% of the patients. We suggest that subtelomeric FISH test is a useful screening tool for selected patients with DD/MR.

SEZNAM OKRAJŠAV

DM (angl. mental retardation oz. intellectual disability), duševna manjrazvitost

IDM (angl. idiopathic mental retardation), idiopatska duševna manjrazvitost

RZ (angl. developmental delay), razvojni zaostanek

IQ (angl. intelligence quotient), inteligenčni količnik

FISH (angl. fluorescence *in situ* hybridization), fluorescenčna *in situ* hibridizacija

MLPA (angl. multiplex ligation-dependent probe amplification), od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond

MKB-10 (angl. ICD-10, international statistical classification of diseases and related health problems, 10th revision), mednarodna klasifikacija bolezni in sorodnih zdravstvenih problemov za statistične namene, 10. izdaja

Barvanje GTG (angl. G bands by Trypsin using Giemsa)

aCGH (angl. microarray-based comparative genomic hybridization), na mikromrežah temelječa primerjalna genomska hibridizacija

PRINS (angl. primed *in situ* labelling), ojačano označevanje *in situ*

LSI (angl. locus specific identifier probe), sonda za identifikacijo specifičnega lokusa

CEP (angl. centromere enumeration probe), sonda za štetje centromer

WCP (angl. whole-chromosome paint probe), sonda za obarvanje celotnega kromosoma

DNK (angl. DNA, deoxyribonucleic acid), deoksiribonukleinska kislina

1. UVOD

Z izrazom duševna manjrazvitost (DM) označujemo podpovprečno inteligenco in moteno zmogljivost prilagajanja posameznika, ki nastane v njegovem adolescentnem obdobju (<18 let). V zadnjem času se v angleško govorečih državah (ZDA in EU) namesto izraza MR (mental retardation) uporablja izraz ID (intellectual disability) (1). Delež duševno manjrazvitih predstavlja 1-3% celotne populacije (2,3), čeprav se dejanski podatki o njeni prevalenci gibljejo v območju 5-10% (2,4). Podatki o prevalenci DM se razlikujejo zaradi kompleksne definicije DM, različnih meritvenih metod in razlik v izvedbah populacijskih študij (5,6). Duševna manjrazvitost se pogosteje pojavlja pri moškem spolu. Razmerje pojavnosti med spoloma je namreč 1,5:1 v korist moških. Verjetna razlaga za to bi lahko bila biološka različnost med spoloma, ki je pogojena z razlikami med kromosomi X in Y (5). Pri približno 1/3 duševno manjrazvitih oseb ne poznamo vzroka za motnjo v razvoju intelektualnih sposobnosti. Takrat govorimo o idiopatski duševni manjrazvitosti (IDM). Kromosomske preureditve, ki vključujejo področje telomerov, skupaj s pod njimi ležečimi subtelomernimi regijami, so pogost vzrok IDM. Na subtelomernih regijah se namreč nahajajo številni funkcionalni geni, katerih preureditve so odgovorne za značilno klinično sliko pri bolnikih z IDM. Te preureditve so največkrat zelo majhne, zato standardna citogenetska analiza z ločljivostjo 3-5 Mb ne omogoča njihove zaznave (7). Za detekcijo subtelomernih preureditev imamo na voljo več molekularno-genetskih oz. citogenetskih metod. V zadnjem času je opazen poudarek na iskanju dovolj specifičnih in občutljivih presejalnih metod, ki bi morale biti tako cenovno dostopne kot tehnično lahko izvedljive.

1.1 DUŠEVNA MANJRAZVITOST PRI OTROCIH IN MLADOSTNIKI

Duševna manjrazvitost (DM) je ena od najkompleksnejših nevropsihiatričnih motenj in eden od mnogih znakov prizadetosti osrednjega živčevja ter je lahko posledica različnih patoloških dejavnikov, ki zmotijo razvoj organizma. O DM govorimo kadar *inteligence sposobnosti* in *prilagoditvene zmogljivosti* posameznika ne dosežajo ravni, ki je primerna za njegovo starost. Prav tako so omejene tudi *kognitivne funkcije*. Ta razvojni primankljaj se pokaže že pred osemnajstim letom starosti. Pri tem velja za neustrezno raven

intelligenčnih sposobnosti inteligenčni kvocient (IQ) nižji od 70. Prilagoditvene sposobnosti pa so pomembno motene na dveh ali več naslednjih področjih: komuniciranje, samostojna skrb zase, življenje doma, družabne spretnosti, zabava, zdravje in varnost, samostojno odločanje, izobraževanje, družbena korist in delo (4,8). Duševna manjrazvitost in druge razvojne nepravilnosti so pogoste v splošni pediatrični praksi. Razvojni zaostanek (RZ) velikokrat nepravilno uporabljajo kot sinonim za DM. Duševno manjrazvitost lahko pravilno diagnosticiramo šele, ko otrok dopolni starost 5 let oz. pri starejših otrocih, ko je standardizirano merjenje njihove inteligentnosti zanesljivo in veljavno. Izraz RZ običajno uporabljamo za dojenčke in majhne otroke (<5 let), pri katerih je diagnoza bodisi nejasna ali pa so premladi za standardno testiranje (2,9). Globalni razvojni zaostanek opisujejo kot »zaostajanje« na dveh ali več področjih, in sicer: zaznavanja, govora/jezika, grobe/fine motorike, socialne/osebne spretnosti in vsakdanjega življenja. Pri RZ gre za značilen primanjkljaj pri pričakovani starosti na področju sposobnosti *učenja in prilaganja*, v primerjavi s kronološko enakimi vrstniki (10). Otrok z RZ ni nujno obsojen na DM, kajti njegov zaostanek v sposobnosti učenja v zgodnjem otroštvu je lahko posledica različnih stanj. Tak otrok je lahko namreč kasneje ocenjen s testom inteligence, ki pa je normalen. Po drugi strani pa je RZ pomemben in lahko napoveduje kasnejši kognitivni in intelektualni zaostanek (11).

Možnost ugotavljanja DM, je torej odvisna od starosti otroka. V splošnem velja, da je ugotavljanje DM toliko lažje, kolikor težja je stopnja prizadetosti. Zato v zgodnjem obdobju otrokovega razvoja diagnosticiramo le najresnejše primere. Največ otrok z inteligenčnimi sposobnostmi, nižjimi od tistih, ki so primerne za njihovo starost, diagnosticiramo šele v prvih letih šolanja. Nižje inteligenčne sposobnosti so ponavadi le del obsežnejše problematike. Pri diagnostični obravnavi preiskovanca praviloma sodeluje celotna skupina strokovnjakov, ki ovrednoti in upošteva vse razsežnosti otrokove prikrajšanosti. Tako psiholog s standardiziranimi psihometričnimi testi oceni intelektualne sposobnosti otroka, njegove prilagoditvene zmogljivosti, koncentracijske sposobnosti ter vizualno-motorično integracijo. Ustrezno oceno poda tudi pediater, ki svoje mnenje po potrebi dopolni z ugotovitvami nevrologa, okulista, otologa in ortopeda. Psihiater pa ugotavlja značilnosti otrokovega odzivanja, čustvovanja in vedenja, njegovo samopodobo, odnose v njegovi družini in okolju. Logoped ocenjuje govor in verbalne izrazne

sposobnosti, pedagog pa opredeli otrokove sposobnosti za učenje. V skupino je vključen tudi socialni delavec, ki oceni lastnosti otrokovega socialnega prostora (4,12).

1.1.1 STOPNJE DUŠEVNE MANJRAZVITOSTI

Stopnjo duševne manjrazvitosti ocenjujemo s psihometričnimi testi. Izmerjeni IQ je dober pripomoček za oceno stopnje DM. Vsaka stopnja, v katero razvrstimo testirane otroke, nakazuje okvirne možnosti razvoja duševno manjrazvitega otroka, seveda ob upoštevanju osebnostnih dejavnikov in socialnega okolja. Inteligentnost v obsegu IQ od 70 do 79 ocenjujemo kot mejno. Glede na vrednost IQ, po mednarodni klasifikaciji bolezni MKB (angl. international statistical classification of diseases and related health problems, ICD), ločimo naslednje stopnje DM (13).

Blaga duševna manjrazvitost (kategorija F70)

Približni obseg IQ je od 50 do 69. Splošno raven duševnega razvoja oseb z blago DM lahko primerjamo s sposobnostmi devet- do dvanajstletnega otroka. V predšolskem obdobju otroci razvijajo osnovne govorne sposobnosti in vsakdanjo komunikacijo ter postopoma postajajo samostojni pri osnovni skrbi zase. Opazen je blag primankljaj na senzoričnih in motoričnih področjih, večina pa jih ni resneje telesno prizadetih. Če so čustveno uravnoteženi in socialno dovolj spretni, se ustrezno in dejavno vključujejo v znano okolje.

Zmerna duševna manjrazvitost (kategorija F71)

Približni obseg IQ je od 35 do 49. Njihove zmogljivosti primerjamo z ravniyo razvoja otroka pri šestih do devetih letih starosti, globalne sposobnosti pa jim znižuje pogosta telesna prizadetost. V predšolskem obdobju opazimo očiten zaostanek v razvoju njihovih govornih in motoričnih sposobnostih. Kasneje jih večina lahko razvije določeno stopnjo samostojnosti pri samooskrbi in pridobi ustrezno komunikacijo, težave pa jim povzroča neznano okolje. Potrebujejo različno stopnjo nadzora za življenje in delo v skupnosti.

Huda duševna manjrazvitost (kategorija F72)

Približni obseg IQ na tej stopnji je od 20-34. Osebe s hujšo obliko DM niso samostojne in so minimalno komunikativne. Njihovo raven zrelosti, ki je močno obremenjena zaradi največkrat resnih telesnih motenj, težko opišemo s primerjavo. Stopnjo razvoja klub temu orientacijsko opišemo s tisto, ki jo opazimo pri otrocih v starosti od 3 do 6 let.

Globoka duševna manjrazvitost (kategorija F73)

Približni obseg IQ prizadetih otrok je pod 20. Globoko duševno manjrazvite osebe so popolnoma odvisne od drugih. Slabo se odzivajo na dogajanje v okolju, prepoznavajo le najbližje osebe in ne razvijejo niti preprostejših motoričnih spretnosti. Možnosti življenja jim tako določa njihova osnovna telesna prizadetost (4,13).

1.1.2 ETIOLOGIJA DUŠEVNE MANJRAZVITOSTI

Po svoji etiologiji je DM multifaktorska in poligenska »motnja« oz. stanje, ki se odraža na več kromosomih. V približno tretjini primerov DM pa nam vzroka zanjo ne uspe ugotoviti. Takrat govorimo o idiopatski duševni manjrazvitosti (IDM). Med biološke dejavnike, ki zmotijo duševni razvoj, uvrščamo dedne (kromosomske nepravilnosti, genetske, presnovne in nevrološke motnje) in okoljske dejavnike (virusne okužbe, posledice škodljivega delovanja zdravil in drugih kemičnih snovi, sevanje ter zaplete v nosečnosti oz. pri porodu). Med psihosocialne dejavnike uvrščamo pomanjkanje ustreznih pobud za razvoj otrokovih duševnih sposobnosti ter socio-ekonomski status staršev. Raziskave so pokazale precejšnjo verjetnost za to, da psihosocialni dejavniki pomembno vplivajo na razvoj mejne in blažje oblike DM, biološki pa prevladujejo pri razvoju zmerne, hude in globoke DM (4,14). Ocenjujejo tudi, da se blaga DM zgodi s pojavnostjo 20-30 /1000 rojstev in je 7-10 krat pogostejša od zmerne ali hude DM, ki se pojavljata v 3-4 primerih /1000 rojstev (15). Zgodnje odkrivanje DM in vzrokov zanjo je bistvenega pomena za načrtovanje ustrezne strokovne obravnave in vzgoje prizadetega otroka. Pojasnjen vzrok nam namreč omogoča predvideti potek duševnega razvoja s precejšnjo zanesljivostjo. Ker se duševna manjrazvitost pojavlja v družini, in lahko prizadene več družinskih članov, nam poznavanje vzroka zanjo omogoča določitev tveganja za posamezne družinske člane ter napotitev staršev na genetsko svetovanje. Postavitve ustrezne diagnoze je torej nujna za določitev ustrezne terapije in je pomembna tudi z vidika vedenjskih značilnosti oseb z DM (4,5).

1.1.3 KROMOSOMSKE SPREMEMBE POVEZANE Z DM

Kromosomske nepravilnosti in okolje vplivajo na pojav in potek DM bodisi v kombinaciji ali ločeno in to izredno spremenljivo. V kolikšni meri kromosomske nepravilnosti zaznamo oz. koliko prispevajo k DM je težko napovedati, saj se raziskave na tem področju zelo razlikujejo v parametrih kot so: klinični kriteriji za izbor oseb, stopnje in definicije DM ter občutljivosti uporabljenih citogenetskih metod. Kromosomske spremembe se pojavljajo kar pri 40% posameznikov s hudo DM in le pri 5-10% posameznikov z njeno blago obliko (16). Do leta 2000 so med skupno 24.245 osebami z DM pri 4-34,1% našli kromosomske nepravilnosti. V povprečju so jih odkrili 16,1%, kar pomeni pri 3.906 od skupno 24.245 preiskovancev (15).

Najpogostejša kromosomska nepravilnost, ki je povezana z DM je trisomija 21 ali Downov sindrom. Najpogostejša na kromosom X vezana nepravilnost, povezana z DM, pa je sindrom fragilnega X. Za večino primerov DM, pa ne najdejo nobene posebne oz. značilne genetske nepravilnosti (17). Najpogostejše kromosomske spremembe in posledične sindrome, ki so povezani z DM, smo zbrali v tabeli 1 (15).

Približno polovica vseh strukturnih kromosomskih nepravilnosti vključujejo telomere. Nekatere mikroskopsko vidne subtelomerne delecije povzročajo specifične, t.i. mikrodelecijske sindrome, za katere je poleg točno določenega kliničnega fenotipa značilna tudi DM. Pogostejši mikrodelecijski sindromi, pri katerih se kot ločena entiteta pojavlja tudi DM, so: 4p- (Wolf-Hirschhornov sindrom), 5p- (sindrom Cri-du-chat) ter sindroma 13q- in 18q- (2,18). Mikrodelecija se sicer lahko pojavi kjerkoli na kromosomu, bodisi intersticialno ali pa terminalno. Nekatere izredno majhne (submikroskopske) subtelomerne delecije, ki jih zaznamo z metodo FISH, so že povezali s specifičnim fenotipom, npr. delecijo 22qter, delecijo 1pter in delecijo 1qter ter del 8p23.1 (2,18,19). Pri večini ugotovljenih subtelomernih preureditev pa ostaja klinični fenotip še vedno nedefiniran in številne preureditve določene s klasično citogenetsko analizo so še naprej nerešljive (kriptične subtelomerne preureditve). Zaradi tega sta njihovo odkrivanje in natančen opis zelo pomembna (2,18,20).

Tabela 1: Kromosomske spremembe in spremljajoči sindromi, povezani z duševno manjrazvitostjo (DM) (15).

Trisomija 21/Downov sindrom	
Sindrom fragilnega X	
Neuravnotežene translokacije	
Duplikacije	
Delecije (intersticielne, terminalne)	
Markerski kromosomi	
Mozaicizem diploid/triploid	
Submikroskopske spremembe pri navidezno uravnoteženih preureditvah	
Subtelomerne preureditve	
Mikrodelecijski sindromi	
del(1)(p36.3)	monosomija 1p
del(4)(p16)	sindrom Wolf-Hirschhorn
del(5)(p15)	sindrom Cri du chat
del(7)(q11.23q11.23)	sindrom William
del(8)(q24.1q24.1)	sindrom Langer-Giedion
del(11)(p13p13)	sindrom WAGR
del(15)(q11q13)pat	sindrom Prader-Willi
del(15)(q11q13)mat	sindrom Angelman
del(16)(p13.3)	sindrom Rubinstein-Taybi
del(17)(p11.2p11.2)	sindrom Smith-Magenis
del(17)(p13.3)	sindrom Miller-Dieker
del(20)(p11.23p11.23)	sindrom Alagille
del(22)(q11.2q11.2)	sindrom VCF/DiGeorge
Uniparentalna disomija	
UPD(15)mat*	sindrom Prader-Willi
UPD(15)pat*	sindrom Angelman

Legenda k tabeli: mat*: maternalni, dedovano po materi; pat*: paternalni, dedovano po očetu

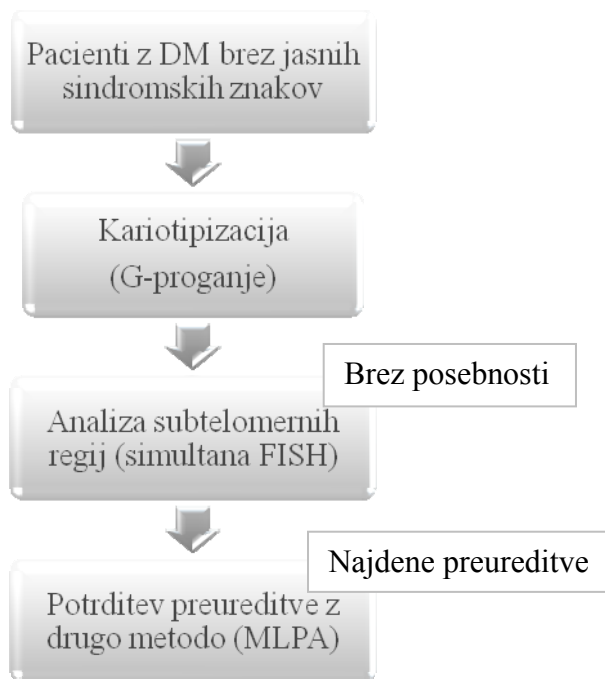
1.1.4 KLASIČNA CITOGENETSKA ANALIZA IN STOPENJSKA DIAGNOSTIKA

Ob sumu na kromosomsko nepravilnost in pri nepojasneni diagnozi RZ in DM je prvi korak v stopenjski diagnostiki kariotipizacija. To je klasična citogenetska analiza, s katero določimo število in strukturo kromosomov. Pri barvanju GTG (G bands by Trypsin using Giemsa) z ločljivostjo 450-500 prog/haploidni genom, zaradi omejene ločljivosti svetlobnega mikroskopa, ne opazimo preureditev manjših od 5Mb (7), pač pa le večje kromosomske spremembe (5-10 Mb). Terminalni kromosomski konci po barvanju GTG ostajajo neobarvani, zato lahko majhne preureditve na teh predelih zgrešimo tudi pri

resoluciji 550-800 prog/haploidni genom. V tem primeru govorimo o kriptičnih subtelomernih preureditvah (21).

Ob normalnem kariotipu je naslednji korak v procesu stopenjske diagnostike, presejalna analiza vseh subtelomernih kromosomskih regij. Z njo lahko zaznamo tudi nekatere najpogostejše mikrolelecijske sindrome (npr. Wolf-Hirschhornov sindrom, sindrom Cri du chat), ki se nahajajo v območju subtelomerov. Molekularno-citogenetska metoda za ugotavljanje subtelomernih preureditev je osnovana na simultani fluorescentni *in situ* hibridizaciji (FISH). S to metodo lahko kvantitativno ovrednotimo in lokaliziramo prisotnost/odsotnost specifičnih kromosomskih preureditev v interfaznem ali metafaznem jedru celice.

V primeru zaznane subtelomerne kromosomske preureditve, moramo rezultat analize potrditi še z drugo, neodvisno metodo. V primeru večjih subtelomernih preureditev je sprememba lahko vidna že v samem kariogramu, pri submikroskopskih preureditvah pa imamo na voljo različne molekularno-genetske metode, npr. od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (MLPA), na mikromrežah temelječa primerjalna genomska hibridizacija (aCGH) ter ojačano označevanje *in situ* (PRINS). Slika 2 prikazuje shemo stopenjske diagnostike v primeru nepojasnjene diagnoze (IDM, RZ, dismorfni znaki), ki smo ji deloma sledili tudi mi.



Slika 2: Shema stopenjske diagnostike pri nepojasnjeni diagnozi duševne manjrazvitosti (DM), razvojnega zaostanka (RZ) ali dismorfnih znakov (2,22).

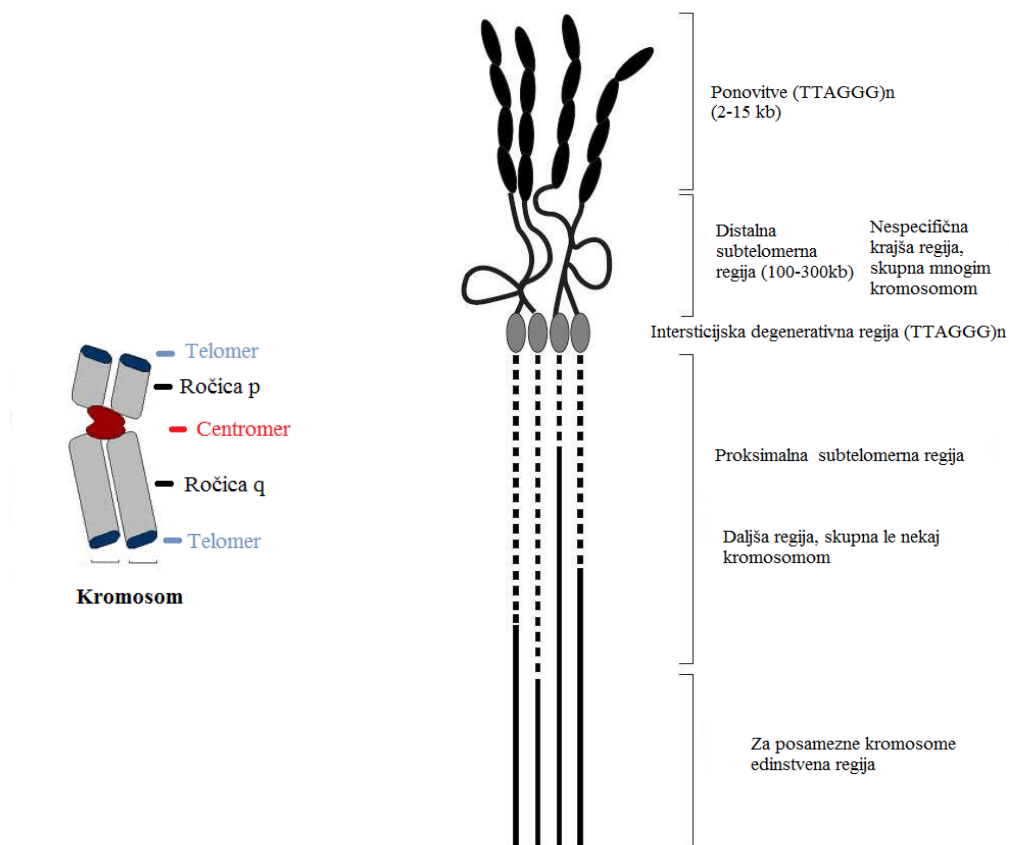
1.2 TELOMERI

Telomeri so specifična, ponavljajoča se zaporedja nukleotidov na koncih linearnih evkariontskih kromosomov. Pri človeku so sestavljeni iz osnovnega zaporedja šestih nukleotidov, TTAGGG. Osrednje nukleotidno zaporedje, skupaj s proteini, tvori telomerni nukleoproteinski kompleks, ki omogoča zaščito kromosomov. Stabilnost genoma je delno odvisna od strukture telomerov. Ta se postopoma zmanjšuje zaradi njihovega krajšanja ob vsaki celični delitvi (23).

Encim, ki z dodajanjem nukleotidov na 3'-konec DNK verige preprečuje krajšanje telomerov in jih ohranja, se imenuje telomeraza (telomerna terminalna transferaza). Njena aktivnost je gensko pogojena in je variabilna med osebki. Stopnja telomerazne aktivnosti je odvisna tudi od starosti človeka in se z leti zmanjšuje. Telomerazne aktivnosti v normalnih somatskih celicah večinoma ni, njena nizka aktivnost pa ostaja v proliferativno sposobnih celicah obnavljajočih tkiv, nezrelih predstopnjah hematopoetskih celic, bazalnih celicah kože, premenopavzalnem proliferacijskem endometriju, epitelu črevesnih kript in matičnih celicah različnih tkiv. Ponovna aktivacija telomeraze je prisotna tudi v 85-95% primarnih malignih tumorjev pri človeku. Zato telomerazi in njeni reaktivaciji pripisujejo ključno vlogo v procesu kancerogeneze (24,25).

1.2.1 STRUKTURA TELOMEROV

Terminalni konec telomerov sestavljajo zaporedja (TTAGGG), ki se večkrat ponavljajo (n-krat). Povprečna dolžina te regije je 2-15 kb. Sledi ji distalna subtelomerna regija, ki je kompleksno področje segmentno podvojene DNK in je dolga nekaj 100 kb. To področje na splošno označujejo kot subtelomerno ponovitev DNK (angl. Subtelomeric repeat DNA) in je skupna večim kromosomom ter je zato nespecifična. Naslednja, v smeri proti centromeri, je intersticijska degenerativna regija (TTAGGG)_n, ki subtelomerno regijo deli na distalno in proksimalno strukturno podenoto, z različnimi vzorci homologije z drugimi konci kromosomov. Pod njo ležijo proksimalna subtelomerna področja, ki so daljša od distalnih in predstavljajo najbolj centromerni predel subtelomerne regije. Vanje segajo različno dolge regije, specifične za posamezen kromosom (angl. Chromosome unique sequence). To so mesta kamor se vežejo subtelomerne sonde FISH (23,26). Strukturno organizacijo telomernega in subtelomernega področja ter strukturo kromosoma prikazuje slika 3.



Slika 3: Strukturna organizacija telomerne in subtelomerne regije ter struktura kromosoma (Povzeto po Knight, 26).

Na molekularni ravni je subtelomerna regija enega kromosoma v povprečju v 95% identična z enakim področjem drugega, pri čemer se tovrstne homologije pogosto raztezajo čez več kilobaz. Na primer, homologija med terminalnim 30kb p in ročico q človeškega kromosoma 4, je 98%. To je pomembno, saj ravno nekatere subtelomerne regije vključujejo funkcionalne gene. Na telomeri 4p se nahajajo trije eksoni za gen cinkovega prsta. Preostali eksoni istega gena pa so razporejeni tudi na akrocentrikih (kromosomi pri katerih se centromera nahaja v bližini enega konca kromosoma) 13p, 15p, 21p in 22p (27). Subtelomerna regija Xq oziroma Yq vključuje gen za receptor interlevkina 9, z delnimi regijami z visoko stopnjo podobnosti blizu telomernih regij 16p, 9p in 10q (27,28,29). Predvidevajo, da je ravno visoka stopnja podobnosti lahko vzrok za kromosomske preureditve med telomeri, in sicer zaradi delovanja rekombinacijskih procesov (27,28).

1.2.2 FUNKCIJA TELOMEROV

Subtelomerne kromosomske regije vključujejo kompleksno in dinamično DNK, ki je skupaj s povezanimi proteini bistvenega pomena za stabilnost genoma in popolno replikacijo DNK (26). Terminalna regija posreduje ključno biološko aktivnost: regulacijo celičnega cikla, celično staranje in imortalizacijo. Sodeluje tudi pri lokalizaciji kromosomov v jedru in uravnavanju transkripcije subtelomernih genov. Ključni vlogi telomerov v celici sta torej ohranjanje njene vitalnosti in zaščita dednih informacij (23). Za telomerne regije je značilna najvišja stopnja rekombinacije, kar pomeni da se proces prekrivanja in nepravilnega parjenja kromosomov najpogosteje pojavlja prav v telomernih področjih, posledica česar so kromosomske preureditve. Opisana struktura in funkcija telomerov pa potrjuje to, da so preureditve na terminalnih kromosomskih delih fenotipsko pomembne in razmeroma pogoste (23,16).

1.3 SUBTELOMERNE KROMOSOMSKE PREUREDITVE PRI IDIOPATSKI DUŠEVNI MANJRAZVITOSTI (IDM)

Subtelomerne regije kromosomov so z geni najbogatejša področja genoma in so, kot smo že omenili še posebej nagnjene k rekombinaciji. Zato imajo tovrstne preureditve najverjetneje klinične posledice tudi pri IDM. Med subtelomerne preureditve uvrščamo delecije, duplikacije in neuravnotežene translokacije (16,21). Te so največkrat zelo majhne, zato jih ne moremo zaznati s standardnimi citogenetskimi analizami. Zaradi njihove velikosti in kompleksnosti je bilo subtelomerne regije v preteklosti tudi izredno težko analizirati na molekularni ravni (26). Z odkritjem novih metod (FISH, CGH, MLPA) pa danes lahko izvajamo hitrejše in natančnejše analize teh področij tudi pri otrocih z IDM. Z uporabo molekularno-genetskih in citogenetskih metod so razkrili, da so vzrok številnih primerov IDM ravno kriptične (nerešljive z barvanjem GTG) subtelomerne preureditve (15,30). Pomembnost kromosomskih preureditev kot vzrokov za IDM je znana, saj so preureditve, ki vključujejo kromosomske konce našli pri približno 5% primerov (26,31). Ravnan in sodelavci so izvedli študijo na 11.688 naključno izbranih preiskovancih z DM/RZ, kar je daleč največ do sedaj. Za iskanje subtelomernih preureditev pri posameznikih so uporabili metodo FISH. Študija predstavlja izsledke analize pogostosti in vzorce subtelomernih preureditev, in sicer tako patoloških kot tudi nepatoloških variant.

Delež klinično pomembnih subtelomernih preureditev je bil približno 2,5%, z dodatnimi 0,5% odkritih domnevnih družinskih variant. Približno polovica klinično pomembnih preureditev so bile terminalne delecije, od katerih jih je večina nastala de novo. Preostale pa so bile večinoma neuravnotežene translokacije med dvema kromosomoma ali dvema ročicama istega kromosoma. Približno 60% neuravnoteženih translokacij je bilo podedovanih od starša, sicer nosilca uravnotežene oblike preureditve. Ostale preureditve pa so vključevale: tandemske duplikacije, uravnotežene translokacije, delne delecije in insercije. V devetih primerih je šlo za intersticijsko delecijo netelomernih kontrolnih lokusov. Najpogostejše klinično pomembne preureditve so bile delecije: 1p, 22q, 4p, 9q, 8p, 2q in 20p. Najpogostejše družinske variante pa so bile: delecija ali duplikacija 10q ter deleciji 4q in Yq (32).

1.3.1 PREVALENCA SUBTELOMERNIH PREUREDITEV PRI IDIOPATSKI DUŠEVNI MANJRAZVITOSTI (IDM)

Prevalenca (pogostost) izraža skupno število obolelih oseb znotraj določene populacije ob določenem času, in sicer ne glede na to, kdaj se je bolezen pojavila. Presejalno testiranje posameznikov z IDM za subtelomerne preureditve, je leta 1992 predlagal Ledbetter (33,34). Leto kasneje pa je Wilkie opisal splošni pristop k analizi subtelomernih preureditev in tako kot prvi opozoril na pomen majhnih subtelomernih kromosomskih preureditev pri pojasnjevanju vzrokov za IDM (35). Flint in sodelavci so leta 1995 izvedli pilotsko študijo in z njo pokazali, da so lahko vsaj 6% primerov IDM pojasnili s submikroskopskimi preureditvami, ki so vključevale telomerno oziroma subtelomerna področja (36). Prvo večjo študijo odkrivanja subtelomernih preureditev, ki je bila osnovana na analizi FISH, je leta 1999 izvedel Knight s sodelavci. Dokazali so, da je pri 7,4% otrok z zmerno do hudo DM (21/284) in pri 0,5% z blago DM (1/182) prišlo do subtelomernih kromosomskih preureditev (37). Joyce in sodelavci pa so na osnovi svoje študije zaključili, da subtelomerne kromosomske preureditve predstavljajo glavni vzrok IDM (34).

Sistematično presejanje je torej razkrilo velik razpon pogostosti pojavljanja subtelomernih preureditev. Natančno oceno njihove prevalence pri osebah z IDM pa je težko dobiti, in sicer zaradi omejenega števila poročil, različnih načinov presejalnih testov subtelomernih preureditev (FISH, CGH, MLPA) in različnih metod, uporabljenih za potrjevanje pozitivnih rezultatov. K tej raznolikosti pa še dodatno prispevajo razlike v naslednjih

dejavnikih: kvaliteta izoliranih kromosomov in resolucija proganja, klinična merila za vključitev bolnikov, velikosti preiskovanih vzorcev ter občutljivost uporabljene metode (7,38). Prevalenca subtelomernih kromosomskih preureditev pri IDM je bila med leti 1998 in 2001 od 0,5% - 23,5% (34). Tabela 2 prikazuje kronološki pregled presejalnih študij subtelomernih regij pri IDM, ki so bile opravljene v letih 1999 do 2012 (39).

Tabela 2: Pregled rezultatov presejalnih študij prevalence subtelomernih preureditev pri preiskovancih z IDM (39).

Referenca	Metoda	Število preiskovancev	Delež subtelomernih sprememb (%)
Knight in sodelavci [1999]	FISH	284 (zmerna-huda) 182 (blaga)	7,4 0,5
Ballif in sodelavci [2000]	FISH	154	2,7
Fan in sodelavci [2001]	FISH	150	4,0
Riegel in sodelavci [2001]	FISH	254	5,0
Rosenberg in sodelavci [2001]	Analiza mikrosatelitov	120	4,1
Rossi in sodelavci [2001]	FISH	200	6,5
Anderlid in sodelavci [2002]	FISH	111	9,0
Baker in sodelavci [2002]	FISH	250	3,6
Rio in sodelavci [2002]	Fluorescentna genotipizacija	150	8,0
Van Karnebeek in sodelavci [2002]	FISH	184	0,5
Jalal in sodelavci [2003]	FISH	372	6,8
Koolen in sodelavci [2004]	MLPA	210	6,7
Ravnan in sodelavci [2006]	FISH	11688	2,5
Rooms in sodelavci [2006]	MLPA	275	2,9
Ahn in sodelavci [2007]	FISH, MLPA	455	5,9
Stegmann in sodelavci [2008]	MLPA	466	3,2
Shao in sodelavci [2008]	CGH	8105	7,2
Wu in sodelavci [2010]	MLPA, SNP	451	5,1
Rafati in sodelavci [2012]	MLPA	322	0.98

Legenda k tabeli: MLPA (angl. multiplex ligation-dependent probe amplification)- od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond; FISH (angl. fluorescence in situ hybridization)-fluorescenčna in situ hibridizacija; CGH (angl. comparative genomic hybridization)-primerjalna genomska hibridizacija; SNP (angl. single nucleotide polymorphism)-polimorfizem posameznih nukleotidov.

1.3.2 IZBOR PREISKOVANCEV

Na splošno se zaradi tehnične zahtevnosti in stroškov metod za analizo subtelomernih regij priporoča učinkovit klinični predizbor. Tovrstni izbor za vključitev v preiskovano skupino pa je pomemben tudi z vidika izboljšanja stopnje odkrivanja subtelomernih nepravilnosti pri preiskovancih z RZ oz. DM (18,7).

V ta namen je bil oblikovan kontrolni seznam, ki je sestavljen iz petih pomembnih pokazateljev možnih subtelomernih preureditev, in sicer: družinskega pojavljanja DM, prenatalnega zaostanka v rasti, postnatalne nepravilnosti v rasti, dveh ali več obraznih dismorfizmov, enega ali več dismorfni telesnih znakov ter vidnih kongenitalnih sprememb. V kontrolnem seznamu (tabela 3) so navedeni značilni fenotipski znaki, z ustreznim številom dobljenih točk. Na podlagi števila točk, ki jih preiskovanec zbere, lahko torej sklepamo, s kakšno verjetnostjo bomo pri njem zaznali subtelomerno preureditev. Testiranje preiskovancev z več kot tremi točkami izrazito poveča diagnostično občutljivost (18).

Tabela 3: Kontrolni seznam za testiranje subtelomernih regij (7).

Skupine in klinični znaki DM oz. RZ	Vrednost (točke)
1.Pojav v družini	
skladno z Mendlovim dedovanjem	2
neskladno z Mendlovim dedovanjem	1
2.Prenatalni vzrok zaostanka v rasti	2
3.Postnatalne nepravilnosti rasti	(največ 2)
nizka rast	1
visoka rast	1
mikrocefalija (mikrokranija)	1
makrocefalija (makrokranija)	1
4.Dva /več obrazna dismorfizma	
anomalije nosu, ušes, hipertelorizem	2
5.Drugi dismorfizmi in kongenitalne nepravilnosti	(največ 2)
anomalije rok	1
anomalije srca (PDA, ASD, VSD)	1
Hipospadija +/- nespuščeni testisi	1

Legenda k tabeli:

PDA (angl. patent ductus arteriosus); ASD (angl. atrial septal defect); VSD (angl. ventricular septal defect).

2. NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA

Kljub pogostemu pojavljanju DM, v približno tretjini primerov ne uspemo najti vzroka zanj (IDM). Pomemben vzrok so lahko kriptične kromosomske preureditve, ki nastanejo na subtelomernih področjih.

Namen naloge:

1. S postopkom simultane FISH analizirati subtelomerne regije kromosomov preiskovancev z diagnozo RZ ali DM, pri katerih bi predhodno, s klasično citogenetsko analizo ugotovili normalne kariotipe. Ugotoviti želimo pogostost pojavljanja kriptičnih subtelomernih preureditev v izbrani skupini ter ali so le-te vzrok za patološke fenotipe in ali se pogostost tovrstnih preureditev pri preiskovancih ujema z, v strokovni literaturi objavljenimi rezultati.
2. Določiti uporabnost simultane analize FISH za klinično testiranje RZ oz. DM in ugotoviti ali je to zanesljiva in uporabna metoda za analizo subtelomernih regij.

Delovna hipoteza:

Predpostavljamo, da je simultana FISH zanesljiva in uporabna metoda za presejalno analizo subtelomernih regij pri preiskovancih z diagnozo RZ ali DM.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA POTEKA DELA



3.2 METODE IN MATERIALI

3.2.1 IZBOR IN VKLJUČITEV PREISKOVANCEV

Za namen naše raziskave smo zbrali 160 preiskovancev z napotno diagnozo RZ/DM, ki so bili napoteni v citogenetski laboratorij Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike, UKC Ljubljana, in sicer v obdobju med letoma 2010 in 2012. Vsi preiskovanci so bili napoteni na kariotipizacijo in analizo subtelomernih regij.

Za njihovo vključitev v raziskavo smo sledili naslednjim kriterijem:

- Napotna diagnoza: duševna manjrazvitost, razvojni zaostanek, dismorfni znaki, epilepsija, sum na kromosomopatijo, nenormalna nevrološka simptomatika.
- Normalen kariotip po proganju GTG, pri resoluciji 400-550 prog na haploidni genom.
- Izključeni jasni klinični sindromi (npr. Downov sindrom, sindrom fragilnega X,...).

Od skupaj 160 preiskovancev so 103 ustrezali opisanim kriterijem.

Klinične podatke, kot so diagnoza, klinične značilnosti, starost, spol, pojavljanje DM v družini in točke iz kontrolnega seznama za analizo subtelomernih regij, smo pridobili iz razpoložljive medicinske dokumentacije.

Izbrane preiskovance smo glede na klinične znake razdelili v naslednje skupine: DM, RZ, dismorfni znaki, mikro/makrokranija in epilepsija.

Vsem smo odvzeli po 6 ml periferne krvi za citogenetske preiskave. Starši oz. zakoniti zastopniki so sodelovanje v raziskavi prostovoljno potrdili z lastoročnim podpisom v obrazec za privolitev v genetsko oz. citogenetsko testiranje.

3.2.2 GOJENJE CELIC PERIFERNE KRVVI

Za citogenetske preiskave moramo predhodno gojiti celice preiskovanca tako, da jih dobimo čim več v metafazi celične delitve. V tej fazi so namreč kromosomi pravilno kondenzirani, kar omogoča zanesljivo določitev njihove morfologije. Ustrezno gojene celice uporabimo tako za postopke kariotipizacije kot analize FISH.

Vzorec:

Vzorec za citogenetsko analizo je periferna kri, odvzeta v epruveto z dodanim antikoagulantom in sicer Na ali Li-heparinom (optimalno 10-25 IU/ml krvi).

Kemikalije in reagenti:

1) Komercialno pripravljeno gojišče: Chromosome medium 1A, (Gibco®). To je sterilna raztopina hranil, rastnih dejavnikov, antibiotikov in antimikotikov, ki zagotavlja sterilno rast celic bolnika in njihovo optimalno razmnoževanje.

2) Antikoagulant heparin 5000 i.e./ml (Braun).

3) Fitoheماغlutinin (angl. Phytohemagglutinin, PHA); mitogeni laktin iz fižola, stimulator poliklonske delitve limfocitov T (Gibco®).

4) Timidin (angl. Thymidine); sinhronizator celične delitve (Sigma-Aldrich).

Delovno raztopino pripravimo tako, da 120 mg timidina raztopimo v 20 ml razredčene raztopine Hank's (1x). Raztopino nato sterilno prefiltriramo z vakumsko filtracijskim sistemom (0,22 µm), jo razdelimo v sterilne epruvete (1,5 ml) in zamrzujemo do uporabe.

5) Hanks-ova raztopina (angl. Hanks' Balanced Salt solution), HBSS 10x; uravnotežena raztopina soli (Sigma-Aldrich).

Za uporabo 10x koncentrirano HBSS redčimo z redestilirano vodo in vrednost pH uravnamo na 7,2 z nasičeno raztopino NaHCO₃.

6) Podaljševalec strukture kromosomov CRA (angl. Chromosome Resolution Additive) (Genial genetics).

Delovno raztopino vedno pripravimo sproti, in sicer tako, da 10 µl reagenta CRA redčimo z 990 µl redestilirane vode.

7) Raztopina kolcemida KaryoMAX® (angl. Colcemid solution); citostatik, ki inhibira tvorbo delitvenega vretena in tako ustavi celično mitozo v metafazi (Invitrogen).

Aparature in potrošni laboratorijski material:

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka LFV 9 (Iskra PIO)
- Centrifuga 5804 (Eppendorf)
- Inkubator CO₂, I-CO2-150 SH (Kambič)
- Mešalo Vibromix 10 (vortex) (Tehtnica)
- Sterilne platenke za gojenje celičnih kultur (25 cm²) (TPP)
- Sterilne centrifugirke 15 ml (Greiner)
- Pipetor Easypet (Eppendorf)
- Serološke pipete, 10 in 25 ml (TPP)

- Sterilna injekcijska igla in brizga
- Pipete z nastavki (Eppendorf)
- Epruvete 1,5 ml (Eppendorf)
- Sterilne Pasteurjeve pipete (Sarstedt)

Opis postopka:

Mononuklearne celice periferne krvi (limfocite) smo gojili v sterilnih plastenkah (25 cm²), v komercialnih gojiščih. Za vsak vzorec smo pripravili po tri enotne, neodvisne celične kulture.

- V sterilne gojilne plastenke smo odpipetirali po 10 ml komercialnega gojišča, ki smo mu s sterilno injekcijsko iglo in brizgo dodali 5 kapljic raztopine heparina, nato pa še 300 µl raztopine PHA. Sterilno smo prenesli 0,5-1,0 ml periferne krvi preiskovanca ter previdno premešali.
- Celice smo nato gojili v inkubatorju pri 37°C in 5% CO₂ v zraku, v vlažni atmosferi. Pozorni smo bili na to, da je bil pokrovček gojilne plastenke toliko odvit, da je omogočal izmenjavo plinov. Po 48 urah gojenja smo v vsako celično kulturo dodali po 400 µl timidina.
- Po 16 urah dodatnega gojenja posamezne celične kulture, smo vso vsebino prenesli v 15 ml centrifugirke in jih 10 minut centrifugirali pri 1.600 obratov/min. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali s 5 ml svežega gojišča.
- Po 3 urah in 20 minutah inkubacije pri omenjenih pogojih smo celični suspenziji dodali 350 µl raztopine CRA in nadaljevali z inkubacijo še 1 h in 10 minut.
- Nato smo celicam dodali 25 µl raztopine kolcemida in jih ponovno inkubirali v inkubatorju pri enakih pogojih še 20 min, nato pa jih 10 minut centrifugirali pri 1.600 obratih/minuto.
- Primerno vzorcu smo nadaljevali s postopkom hipotonije in fiksacije celic (40,41).

3.2.3 IZOLACIJA LIMFOCITOV IZ PERIFERNE KRVI (HIPOTONIJA IN FIKSACIJA)

Celice iz periferne krvi po gojenju izoliramo in trajno fiksiramo za nadaljnjo citogenetsko analizo. S hipotonično obdelavo dosežemo njihovo nabrekanje in ustrezno razporeditev

kromatina. Z uporabo raztopine za fiksacijo iz celične kulture odstranimo citoplazmo in celične ostanke, obenem pa celice konzerviramo za dolgotrajno shranjevanje.

Celični vzorec:

Vzorec za hipotonijo in fiksacijo je bila suspenzija celic gojenih v komercialnem gojišču.

Kemikalije in reagenti:

1) Kalijev klorid, KCl (Kemika)

2) Deionizirana voda (dH₂O)

Za delo pripravimo vedno svežo sterilno hipotonično raztopino (0,075 M KCl), ki jo prefiltriramo skozi filtre s porami 0,22 µm.

3) Metanol p.a., (LexChem)

4) Ocetna kislina, glacialna p.a., (LexChem)

Raztopino za fiksacijo pripravljamo vedno: metanol in očetna kislina v razmerju 3:1.

Aparature in potrošni laboratorijski material:

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka LFV 9 (Iskra PIO)
- Centrifuga 5804 (Eppendorf)
- Inkubator CO₂, I-CO2-150 SH (Kambič)
- Vodna kopel WB-13H (Kambič)
- Tehnica LA 1200 S (Sartorius)
- Mešalo Vibromix 10 (vortex) (Tehnica)
- Sterilne centrifugirke 15 ml (Greiner)
- Pipetor Easypet (Eppendorf)
- Serološke pipete, 10 in 25 ml (TPP)
- Pipete z nastavki (Eppendorf)
- Sterilne Pasteurjeve pipete (Sarstedt)
- Filtri minisart, velikost por 0,2 µm (Sigma Aldrich)

Opis postopka:

Najprej smo pripravili hipotonično raztopino KCl in jo segreli na 37°C v vodni kopeli.

- 15 ml centrifugirko s celično suspenzijo smo 10 min centrifugirali pri 1.600 obratih/min. Supernatant smo odstranili in sediment temeljito premešali na vorteksu.
- Hipotonijo smo izvajali med mešanjem celične suspenzije na vorteksu. Hipotonično raztopino KCl (7 ml) smo dodajali počasi po kapljicah, ob stalnem mešanju.
- Sledila je 15 minutna inkubacija v vodni kopeli pri 37°C.
- Nato smo v vsako centrifugirko dodali po 1 ml raztopine za fiksacijo in tako ustavili hipotonijo.
- Celice smo centrifugirali 8 minut pri 1.600 obratih/min. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali na vorteksu.
- Dodali smo jim 8 ml raztopine za fiksacijo, dobro premešali ter celice inkubirali 15 minut na sobni temperaturi.
- Sledilo je centrifugiranje, 8 minut pri 1.600 obratih/min; odstranili smo supernatant in preostalo vsebino temeljito premešali na vorteksu. Ponovno smo dodali 8 ml fiksativa.
- Postopek fiksacije smo ponovili vsaj še dvakrat oziroma dokler ni bila raztopina nad celicami bistra.
- Po zadnjem centrifugiranju smo pustili v epruveti približno pol mililitra supernatanta in vsebino dobro premešali.
- Fiksirano suspenzijo celic smo hranili v zamrzovalniku (-20°C), kjer smo jo pustili najmanj dve uri pred nanosom na objektna stekelca oz. pred pripravo preparatov za nadaljne delo (40,41).

3.2.4 PRIPRAVA PREPARATOV ZA KARIOTIPIZACIJO IN FISH

Objektna stekelca moramo pred uporabo v citogenetskih postopkih obvezno temeljito očistiti. Le na ta način zagotovimo kvaliteten nanos, barvanje in zajemanje slike. Stekelca, ki se uporabljajo za citogenetske preiskave morajo biti najvišje kvalitete, z oznako »super grade«.

Za izvedbo citogenetske analize moramo suspenzijo predhodno fiksiranih celic nanesti na objektna stekelca in jih primerno starati. Za vsakega preiskovanca smo pripravili nanose za

vse tri vzporedne kulture, ter jih uporabili za barvanje kromosomov GTG in za analizo FISH.

Vzorec za nanos:

Vzorec za nanos je dobro premešana suspenzija predhodno gojenih fiksiranih mononuklearnih celic, iz periferne krvi. Celice morajo biti pred nanosom na objektna stekelca vsaj 2 h v zamrzovalniku (-20°C).

Kemikalije in reagenti:

- 1) Destilirana voda (dH₂O)
- 2) Voda
- 3) Krom-žveplena kislina p.a., (LexChem)
- 4) Metanol p.a., (LexChem)
- 5) Ocetna kislina, glacialna p.a., (LexChem)

Aparature in potrošni laboratorijski material:

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka LFV 9 (Iskra PIO)
- Centrifuga 5804 (Eppendorf)
- Mešalo Vibromix 10 (vortex) (Tehtnica)
- Termoblok oz. grelna plošča (Termoproc)
- Svetlobni mikroskop (Olympus)
- Steklene kadičke za objektna stekelca (Assistent)
- Stekleni nosilec za objektna stekelca (Assistent)
- Objektna stekelca super grade (VitroGnost®)
- Pipeta z nastavki (Eppendorf)
- Staničevina
- Pinceta

Opis postopka:

- Čiščenje objektnih stekel

Objektna stekelca smo neposredno iz pakiranja zložili v steklen nosilec, kot smo ga nato postavili v stekleno kiveto, napolnjeno s krom-žvepleno kislino, jo pokrili in pustili stati preko noči. Naslednji dan smo stekelca previdno vzeli iz krom-žveplene kisline, in jih 60

minut spirali pod curkom vroče vode. Temu je sledilo še 60 minutno spiranje pod curkom hladne vode, nakar smo vse dobro sprali z destilirano vodo (dH₂O). Stekelca smo do nanosov preparatov hranili v hladilniku, potopljena v dH₂O.

- Nanos celic na objektna stekelca
 - Vzorce smo vzeli iz zamrzovalnika, zamenjali fiksativ in jih centrifugirali 8 minut pri 1.600 obratov/min. Gostoto celic smo uravnali s količino fiksativa, ki smo ga po centrifugiranju pustili v centrifugirki nad celicami.
 - Objektna stekelca smo s pinceto vzeli iz dH₂O in jih dobro odcedili na staničevini. Na še vedno mokra in hladna smo nanašali po 40 µl vsakega od vzorcev. S konico nastavka na pipeti smo se rahlo dotaknili zgornjega roba stekelca in nanesli suspenzijo celic tako, da se je enakomerno razporedila po celotni površini. Spodnji del objektnega stekelca smo nato rahlo popivnali s staničevino ter tako še dodatno pripomogli k razporeditvi vzorca po celotni površini.
 - Pod svetlobnim mikroskopom smo nato ugotavljali ustreznost nanosa celic za nadaljnjo citogenetsko analizo. Preverili smo gostoto celic, število mitoz (mitotski indeks), količino citoplazme ter obliko kromosomov.

- Staranje mikroskopskih preparatov
- Preparate za kariotipizacijo smo pripravili tako, da smo objektna stekelca z nanešenimi celicami starali na grelni plošči, 90 min pri 90°C. Preparate za analizo FISH pa smo starali na enak način, in sicer 15 min pri 90°C.
- Starani preparati namenjeni za kariotipizacijo so bili tako pripravljene za barvanje GTG, tisti za analizo FISH pa za dehidracijo.

3.2.5 BARVANJE GTG

S kariotipizacijo določimo število in strukturo kromosomov, pri čemer identifikacijo posameznih kromosomov omogoča izgled njihovega proganja (angl. GTG banding). Iz krvne kulture perifernih limfocitov, ki smo jih poliklonsko stimulirali s fitohemaglutininom, skladno s standardno metodo proganja GTG, pripravimo celične preparate z metafaznimi kromosomi. Te najprej obdelamo s proteolitičnim encimom tripsinom, nato pa jih pobarvamo s kromosomskim barvilom, raztopino Giemse.

Vzorec:

Barvamo preparate, ki so primerno starani za kariotipizacijo.

Kemikalije in reagenti:

- 1) Destilirana voda (dH₂O)
- 2) Fosfatni pufer, DPBS 10x (angl. Dulbecco's Phosphate-buffered saline-DPBS) (Invitrogen).

Za delo si pripravimo raztopino 1x DPBS tako, da 100 ml 10x PBS redčimo z dH₂O do 1.000 ml. Preverimo pH vrednost (7,4) in ga prefiltriramo z vakuumskim filtracijskim sistemom (0,22 µm).

- 3) Tripsin 250TM Difco (angl. Trypsin), (DB Diagnostic System)

Raztopino tripsina pripravimo vedno sproti oz. svežo tako, da v kadički za objektna stekelca raztopimo 0,5 g tripsina v 200 ml delovne raztopine NaCl in 50 ml 1x DPBS. Na koncu uravnamo še pH vrednost na 7,0.

- 4) Barvilo Giemsa (angl. Giemsa stain, modified solution) (Sigma Aldrich)

Priprava barvila: 8,2 ml osnovne raztopine Giemse dodamo 250 ml fosfatnega pufrja, dobro premešamo in uravnamo pH na 6,8. Raztopino barvila pripravimo vedno sproti, v kadički za objektna stekelca.

- 5) Natrijev klorid (NaCl), puriss p.a., (Riedel-de- Hæn)

Delovno raztopino pripravimo iz 8,5 g NaCl, ki jih raztopimo v 1.000 ml dH₂O in nato prefiltriramo z vakuumskim filtracijskim sistemom (pore 0,22 µm).

- 6) Dinatrijev hidrogen fosfat (Na₂HPO₄) (Sigma-Aldrich)

- 7) Kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich)

- 8) Fosfatni pufer (za Giemso)

Pripravimo osnovni raztopini A (9,5 g Na₂HPO₄ v 1.000 ml dH₂O) in B (9,1 g KH₂PO₄ v 1.000 ml dH₂O). Delovna raztopina fosfatnega pufrja: 127 ml raztopine A dodamo 123 ml raztopine B in dopolnimo z dH₂O do 5 l. Nato z dodajanjem ene ali druge raztopine uravnamo pH na 6,8.

Aparature in potrošni laboratorijski material:

- Vakuumski filtracijski sistem 500 ml, velikost por 0,22 µl (TPP)
- Tehnica LA 1200 S (Sartorius)
- Magnetno mešalo Rotamix S-10 (Tehnica)
- pH meter MP220 (Mettler Toledo)
- Svetlobni mikroskop BX51 (Olympus)

- Magnetna mešala
- Steklene kadičke za objektna stekelca (Assistent)
- Steklen nosilec za objektna stekelca (Assistent)
- Pipetor Easypet (Eppendorf)
- Serološke pipete 10 ml (TPP)
- Laboratorijska steklovina: čaša, merilni valj
- Sušilec za lase
- Staničevina

Opis postopka:

Vse pufre, raztopine in barvilo Giemsa smo vedno pripravljali sproti. Preparate smo barvali pri sobni temperaturi. Objektna stekelca z nanešenimi celicami preiskovancev smo zložili v stekleni nosilec in jih pomakali v kadičke z raztopinami, v naslednjem vrstnem redu:

1. raztopina tripsina, 15 sekund;
2. spiranje v raztopini 1x PBS;
3. raztopina Giemse, 2 minuti in 15 sekund

Preparate smo najprej sprali z vodo, nato še z dH₂O, stekelca dobro odcedili na staničevini ter jih posušili s sušilcem za lase. Vedno smo pod mikroskopom preverili kvaliteto barvanja. Kadar je bilo to potrebno, smo prilagodili bodisi čas tripsinizacije ali pa čas inkubacije v raztopini Giemse. Tako smo pripravili preparate za mikroskopsko analizo (slikanje) in za kariotipizacijo (40).

3.2.6 KARIOTIPIZACIJA IN ANALIZA

Kariotipizacija je standardna citogenetsko metoda, s katero določimo število in strukturo kromosomov. Analiziramo GTG-barvane kromosome, ki so v metafazi celične delitve. V zadnjo fazo analize kromosomov so lahko vključene samo celotne, nepopokane in nezlomljene metafaze.

Vzorec:

Preparat z metafaznimi kromosomi, ki so primerno starani in barvani s postopkom GTG.

Aparature in potrošni laboratorijski material:

- Mikroskopski sistem za kariotipizacijo in FISH: mikroskop BX61 (Olympus), kamera, računalnik s programsko opremo CytoVision in tiskalnik.
- Imerzijsko olje (Olympus)

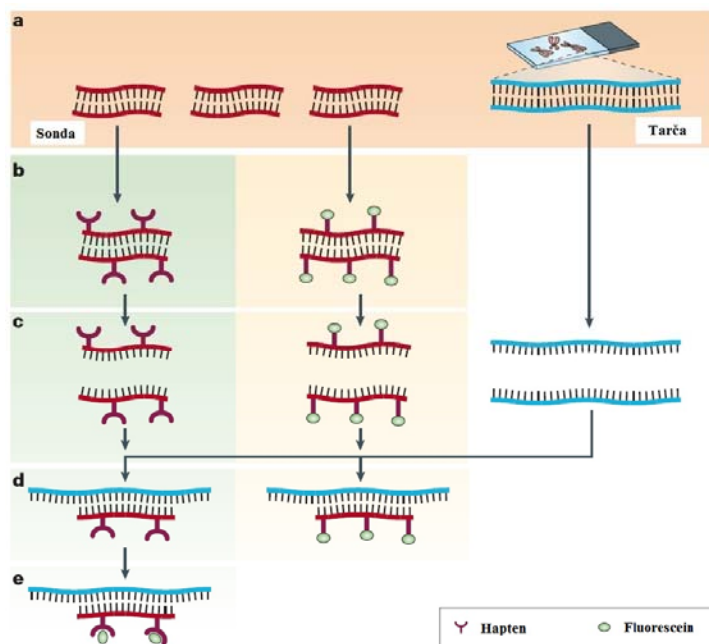
Postopek:

Sistem omogoča avtomatsko »skeniranje« preparatov, iskanje za analizo primernih metafaz in njihovo slikanje. S pomočjo programske opreme CytoVision smo kromosome ločili in jih razvrstili v kariogram, glede na njihove dolžine, lego centromer ter vzorce proganja.

Pri analizi metafaze smo primerjali vsak set homolognih kromosomov, vključno s kromosomom X in Y kromosomom, in sicer progo za progo. V primeru prekrivanja kromosoma smo morali homologa pregledati na novi metafazi, da smo lahko izključili morebitne strukturne preureditve na mestu prekrivanja.

3.2.7 ANALIZA FISH SUBTELOMERNIH REGIJ

Metoda za ugotavljanje subtelomernih preureditev je osnovana na simultani fluorescentni *in situ* hibridizaciji. To je molekularno-citogenetska metoda, s pomočjo katere lahko kvantitativno ovrednotimo in lokaliziramo prisotnost ali odsotnost specifičnih kromosomskih preureditev v metafaznem jedru posamezne celice. Osnovni princip je hibridizacija specifičnih sond DNK na komplementarna zaporedja genomske DNK. Pri tem lahko uporabimo bodisi neposredno (s fluoresceinom označeni oligonukleotidi) ali posredno (s haptenom označeni oligonukleotidi) označene sonde DNK (16,40,41,42). Slika 4 prikazuje princip metode FISH s posrednim (levo) in neposrednim (desno) označevanjem. Preparate ovrednotimo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa, ob uporabi ustreznih filtrov, glede na uporabljeni fluorofor, in sicer tako, da spremljamo odsotnost oziroma prisotnost pričakovanih signalov.



Slika 4: Princip fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) z neposrednim (desno) in posrednim (levo) označevanjem sond DNK (42)

Simultano analizo FISH smo izvedli z uporabo večsondnega kompleta za analizo subteloernih regij (Vysis ToTelVysion Multi-color FISH Probe kit, Abbott Molecular). Ta vsebuje 41 teloernih sond, skupaj 64 s kontrolnimi sondami, in sicer CEP (Centromere Enumeration Probe) in LSI (Locus Specific Identifier Probe). Tako lahko hkrati pregledamo kar 41 subteloernih regij. Sonde so specifične za subtelomere p in q kromosomov od 1 do 12 ter 16 do 20; subtelomere q akrocentričnih kromosomov 13, 14, 15, 21 in 22 ter psevd-avtosomnih regij Xp/Yp in Xq/Yq subtelomer. Sonde FISH za ročice p akrocentrikov pa zaradi izrazito ponavljajočih se terminalnih zaporedij niso na voljo (43).

Sonde so na voljo v 15 mešanicah in so neposredno označene s fluoroforom, ki sveti v zelenem in/ali oranžnem spektru (Spectrum Green™ in/ali Spectrum Orange™). Sonde LSI in CEP pa so označene s fluoroforom, ki sveti v modrem spektru (Spectrum Aqua™). Priloga I prikazuje podroben opis njihovih lastnosti. Po hibridizaciji in vizualizaciji nam metoda omogoča pojasnitev specifičnih kromosomskih preureditev kot so delecije, duplikacije in translokacije specifičnih teloernih regij.

Vzorec:

Vzorec za analizo FISH je celični preparat z metafaznimi kromosomi. Za nanos sond uporabimo preparat, ki je predhodno primerno staran in dehidriran.

Kemikalije in reagenti:

1) Absolutni etanol p.a. (Ethanol anhydrous) (LexChem) in destilirana voda (dH₂O)

Za delo si pripravimo naraščujoče koncentracije etanola, in sicer 75%, 85% in 100%.

2) Detergent Nonidet P-40 (NP-40, Ethoxylated octyl phenol) (Abbott)

3) Komercialno pripravljena raztopina SSC 20x (angl. Saline-sodium citrate) (LexChem)

Za delo si pripravimo raztopino 2x SSC z 0.1% NP-40 in 0,4x SSC z 0,3% NP-40.

4) Raztopina za spiranje, 2x SSC z 0.1% NP-40:

Pripravimo jo tako, da temeljito zmešamo 50 ml 20x SSC (pH=5,3) s 425 ml dH₂O.

Dodamo 0,5 ml NP-40 in z magnetnim mešalom mešamo dokler se ves ne raztopi. Nato dodamo še 24,5 ml dH₂O, do končnega volumna 500 ml in preverimo pH raztopine, ki mora biti 7,0±0,2. Raztopino prefiltriramo z vakuumskim filtracijskim sistemom (filtri 0,22 µm).

5) Raztopina za spiranje, 0,4x SSC z 0,3% NP-40:

Pripravimo jo tako, da temeljito zmešamo 10 ml 20x SSC (pH=5,3) s 475 ml dH₂O, dodamo 1,5 ml NP-40 in z magnetnim mešalom mešamo dokler se ta v celoti ne raztopi. Dodamo 13,5 ml dH₂O, do končnega volumna 500 ml in preverimo pH, ki mora biti 7,0-7,5. Raztopino končno prefiltriramo z vakuumskim filtracijskim sistemom (filtri 0,22 µm).

6) Komercialni komplet sond za analizo subtelomernih preureditev, Vysis ToTelVysion Multi-color FISH Probe kit (Abbott)

7) Barvilo DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) (Abbott)

8) Imerzizsko olje (Olympus)

Aparature in potrošni laboratorijski material:

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka LFV 9 (Iskra PIO)

- pH meter MP220 (Mettler Toledo)

- Vakuumski filtracijski sistem 150 ml, 0,22 µm (TPP)

- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

- Mešalo Vibromix 10 (vortex) (Tehtnica)

- Magnetno mešalo Rotamix S-10 (Tehtnica)

- Denaturacijsko-hibridizacijski sistem Thermobrite (StatSpin)
- Vodna kopel WB-13 H (Kambič)
- Mikroskopski sistem za kariotipizacijo in FISH: mikroskop BX61 (Olympus), kamera, računalnik s programsko opremo CytoVision in tiskalnik.
- Kivete za objektna stekelca, 100 ml (Brand)
- Objektna stekelca za mikroskopiranje, super grade (VitroGnost ®)
- Krovna stekelca (22 mm x 22 mm) (Majbert)
- Pipete s sterilnimi nastavki (Eppendorf)
- Rubber cement fixogum lepilo (Marabu)
- Laboratorijska steklovina: čaša, merilni valj
- Staničevina, pinceta, pasteurjeva pipeta

Postopek priprave preparatov in FISH analiza:

Postopek čiščenja objektnih stekelc in nanose celic nanje smo opisali v podpoglavju 3.2.4. Po izolaciji in optimalnem nanosu celic smo preparate starali za analizo FISH, in sicer na grelni plošči, 15 minut pri 90°C. Na vsakem objektnem stekelcu smo označili mesta za kasnejši nanos sond. Tik pred njihovo aplikacijo smo preparate dehidrirali v etanolnih raztopinah z naraščujočimi koncentracijami (75%→85%→100%). V vsaki od njih smo preparate pustili po 5 minut in jih nato dobro posušili. Na tako pripravljene preparate smo nato nanесли sonde. Na koščke parafilma smo pripravili hibridizacijsko mešanico iz 0,5 µl raztopine s sondo in 3,5 µl hibridizacijskega pufra. Mešanico smo nato odpipetirali na predhodno označeno področje na objektnem stekelcu, ki je bilo po naši oceni najprimernejše za hibridizacijo. Preparat smo previdno pokrili s krovnim stekelcem tako, da ni bilo mehurčkov in stekelce zalepili z lepilom (fixogum). Preparat smo nato postavili v hibridizator (denaturacija in hibridizacija) za 16 ur. Nato smo najprej odstranili krovna stekelca in začeli s spiranjem preparata v temi, tako kot sledi:

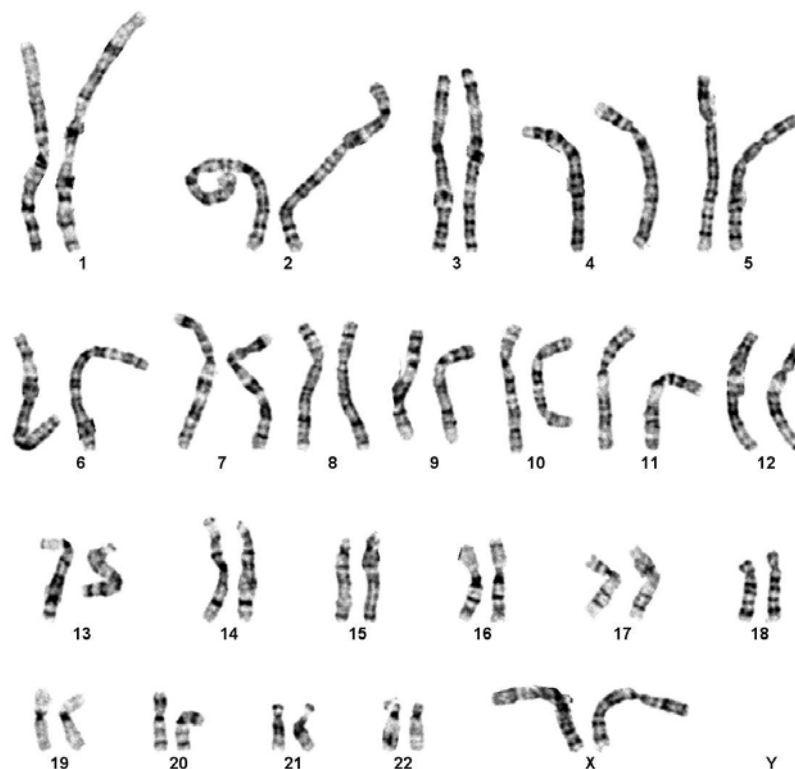
- objektna stekelca smo za 2 min potopili v raztopino za spiranje 2x SSC pri sobni temperaturi;
- nato smo jih dali za 2 min v raztopino za spiranje 0,4x SSC, ogreto na 72 °C;
- na koncu smo jih za 2 min ponovno potopili v raztopino za spiranje 2x SSC, pri sobni temperaturi.

Objektna stekla smo popivnali s staničevino in jih posušili v temi. Tik preden smo začeli s pregledovanjem preparatov, smo nanje nanесли po 5 μ l barvila DAPI in jih prekrili z velikimi krovnimi stekelci. Nato smo jih pregledali pod fluorescentnim mikroskopom Olympus BX61, pri 1.000-kratni povečavi. Pri izvajanju analize FISH smo sledili navodilom proizvajalca. Pri vsakem bolniku smo pregledali 5 metafaz na posameznem mikroskopskem polju. Če smo zasledili kakršnokoli nepravilnost, smo pregledali vse metafaze na tistem polju (40,41). Specifičnost in občutljivost vseh sond FISH smo predhodno preverili na negativnih kontrolnih vzorcih (zdravi preiskovanci).

3.2.8 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Glede na vrsto vzorca je predpisano minimalno število metafaz, ki jih je potrebno analizirati. V splošnem moramo v celoti pregledati najmanj 2 metafazi, in sicer pri minimalni resoluciji, glede na napotno diagnozo (44). Priporočilo E.C.A (General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics 2012) zahteva za vsakega preiskovanca z nepojasnjeno diagnozo (postnatalne napotitve v primerih DM, RZ, dismorfni znakov) minimalno resolucijo 550 prog/haploidni genom (44). V laboratorijski praksi smo zaradi številnih prekrivanj kromosomov sestavljali in pregledali najmanj 10 metafaz, od teh pa smo natančneje pregledali minimalno 5 kariogramov. Slika 5 prikazuje kariogram po barvanju GTG z resolucijo 550 prog/haploidni genom.

Vsem preiskovancem smo uspešno sestavili kariograme in jim določili kariotipe. Rezultate kariotipizacij in analiz FISH pa smo določili skladno z aktualno nomenklaturo ISCN (angl. An international system for human cytogenetic nomenclature) (45).



Slika 5: Primer normalnega ženskega kariograma (barvanje GTG), resolucija 550 prog /haploidni genom.

3.2.9 ANALIZA PODATKOV

Vse podatke o preiskovancih smo obdelali ter izvedli njihovo selekcijo, s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel.

Prevalenco oz. pogostost subtelomernih preureditev v vzorcu smo izračunali s formulo:

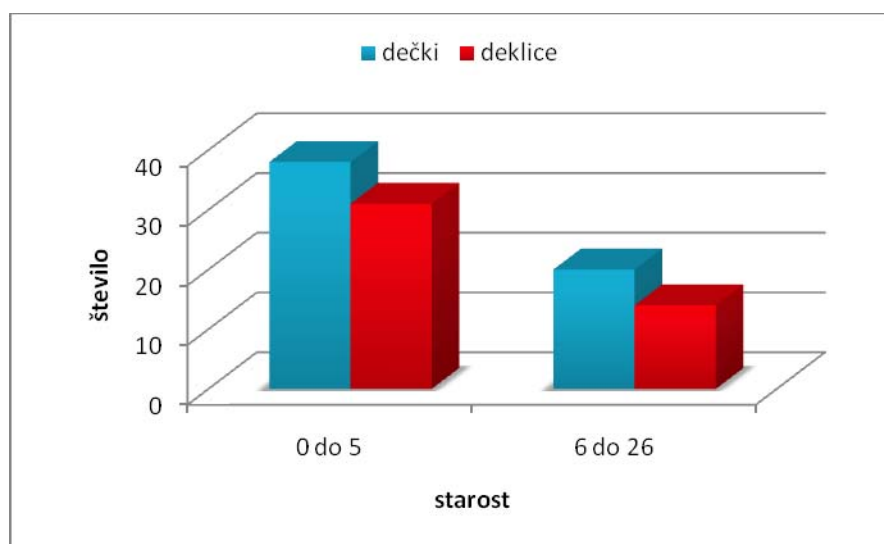
$$P = \frac{Ex}{n}$$

Legenda: *P* je pogostost, *Ex* število preiskovancev z odkrito preureditvijo, *n* pa število vseh testiranih preiskovancev.

4. REZULTATI

4.1 PREISKOVANCI

Za karyotipizacijo in analizo subtelomernih regij kromosomov smo uporabili vzorce izoliranih celic 103 preiskovancev, ki med seboj niso bili v sorodu. Od teh je bilo 58 (56,3%) dečkov in 45 (43,7%) deklic, starih od 0 do 26 let (povprečje 5,3 let). Razmerje med spoloma je bilo 1,29:1 v korist dečkov. Do vključno 5 let je bilo starih 69 otrok (66,9%), od tega 38 dečkov (55,1%) in 31 deklic (44,9%). Starejših od 5 let (do 26 let) je bilo 20 dečkov (58,8%) in 14 deklic (41,2%). Število preiskovancev glede na spol in starost prikazuje graf 1.



Graf 1: Struktura preiskovancev glede na spol in starost

Glede na napotno diagnozo oz. klinične znake, smo izbrane preiskovance razdelili v sledeče skupine: DM, RZ, dismorfni znaki, mikro/makrokranija in epilepsija. Poleg nenormalne nevrološke simptomatike namreč ravno dismorfni znaki, epilepsija ter mikro/makrokranija pogosto spremljajo klinične znake pri IDM. Deleži posameznih kliničnih znakov pri preiskovancih so prikazani v tabeli 4.

Tabela 4: Deleži kliničnih znakov pri izbranih preiskovancih (n=103).

Klinični znak oz. diagnoza	Prisotnost	Odsotnost
Razvojni zaostanek (RZ)	65,0% (67/103)	35,0% (36/103)
Duševna manjrazvitost (DM) *	13,2% (9/68)	86,8% (59/68)
Dismorfni znaki	41,7% (43/103)	58,3% (60/103)
Epilepsija	23,3% (24/103)	76,7% (79/103)
Mikro/makrokranija	8,7% (9/103)	91,3% (94/103)

Legedna k tabeli: * DM lahko zanesljivo določimo pri otrocih, starejših od 5 let.

4.2 POGOSTOST SUBTELOMERNIH KROMOSOMSKIH DELECIJ ZAZNANIH Z METODO SIMULTANE FISH

Z metodo simultane FISH smo v skupini 103 preiskovancev, našli subtelomerne delecije pri petih osebah, kar znaša 4,85%. Prva preiskovanka, pri kateri smo odkrili subtelomerno kromosomsko preureditev, je imela hemizigotno delecijo na ročici q kromosoma 13. V drugem primeru smo našli hemizigotno delecijo subtelomerne regije na ročici p kromosoma 17. Pri tretji preskovanki smo odkrili subtelomerno delecijo na ročici q kromosoma 6. V četrtem primeru je šlo za delecijo na distalnem delu ročice q kromosoma 10, v zadnjem, petem pa za terminalno delecijo subtelomerne regije ročice p na kromosomu 8. Preiskovanci, pri katerih smo odkrili subtelomerne delecije, so bili na osnovi kontrolnega seznama ocenjeni z od 3 do 5 točkami. Ostali, pri katerih subtelomernih preureditev nismo zaznali, pa so dosegli od 1 do 3 točke. Rezultate predstavljamo v tabeli 5.

Tabela 5: Laboratorijski izsledki kariotipizacije in simultane analize FISH pri petih preiskovancih s subtelomernimi kromosomskimi preureditvami.

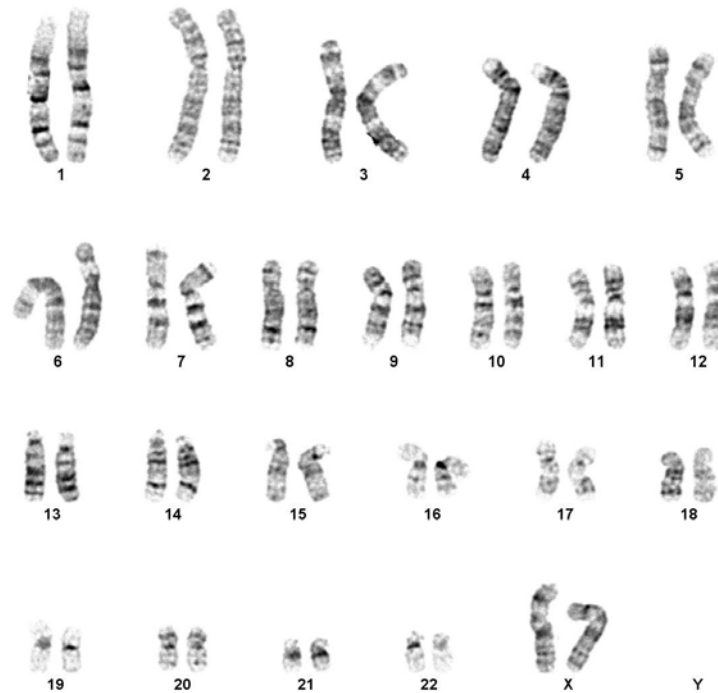
Številka primera	Kariotip	Rezultat FISH	Kontrolni seznam (točke)
1 (♀), 17 let	46,XX	ish del(13)(q34-qter)(D13S327-)	3
2 (♂), 6 let	46,XY	ish del(17)(17pter)(282M16/SP6 -)	3
3 (♀), 2 leti	46,XX	ish del(6)(6qter)(VIJyRM2158-)	5
4 (♂), 2 leti	46,XY,del(10)(q26.1)	ish del(10)(q26.3)(D10S2290-)	4
5 (♂), 1 leto	46,XY,del(8)(p23.1)	ish del(8)(p23.3)(D8S504 -)	3

4.3 OPISI POSAMEZNIH PRIMEROV UGOTOVLJENIH SUBTELOMERNIH DELECIJ

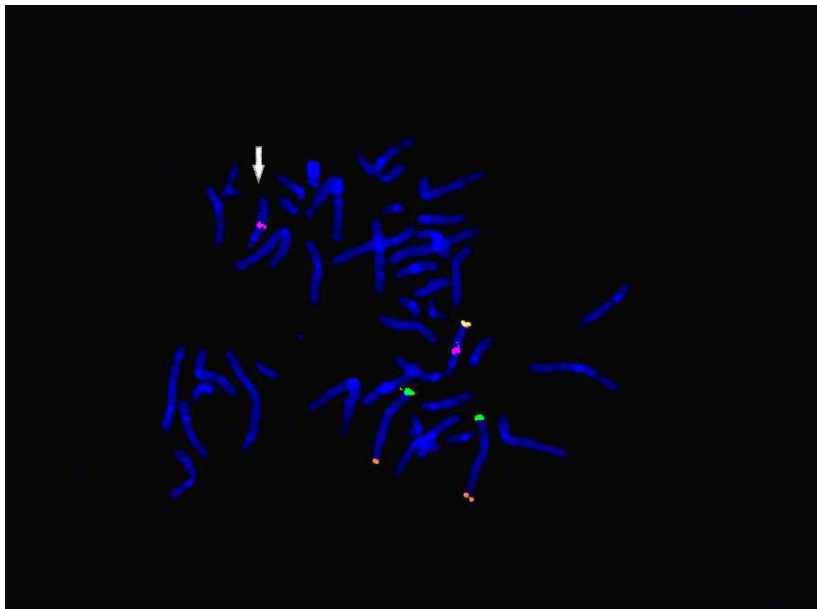
4.3.1 Primer 1

Sedemnajstletnica z diagnozo epilepsije ter umske in gibalne manjrazvitosti, je bila naročena na poglobljeno laboratorijsko diagnostiko, zaradi iskanja vzroka njenega razvojnega zaostanka in epilepsije. Poleg navedenega je imela tudi dismorfne znake, hipertelorizem (nenormalno zvečana razdalja med očmi), epikantus (navpična očesna guba), konvergentni strabizem (škiljenje, odklon očesa navznoter). Njen govor je bil težje razumljiv. Prisotna je bila tudi izrazito okorna motorika, s hudo motnjo koordinacije gibov. Glede na kontrolni seznam je dosegla 3 točke.

Preiskovanki smo določili normalen ženski kariotip (46,XX). Rezultat analize FISH subtelomernih regij, in sicer ish del(13)(qter)(D13S327-), je pokazal, da gre za hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice q na kromosomu 13. Prisoten je bil namreč samo en jasen rumeni signal, po hibridizaciji na subtelomerni regiji 13q34, lokus D13S327. Rezultat kariotipizacije in analize FISH prikazujeta slika 7 in 8.



Slika 7: Primer 1 (kariogram 17-letnega dekleta), kariotip 46,XX, ločljivost 400-500 prog/haploidni genom.

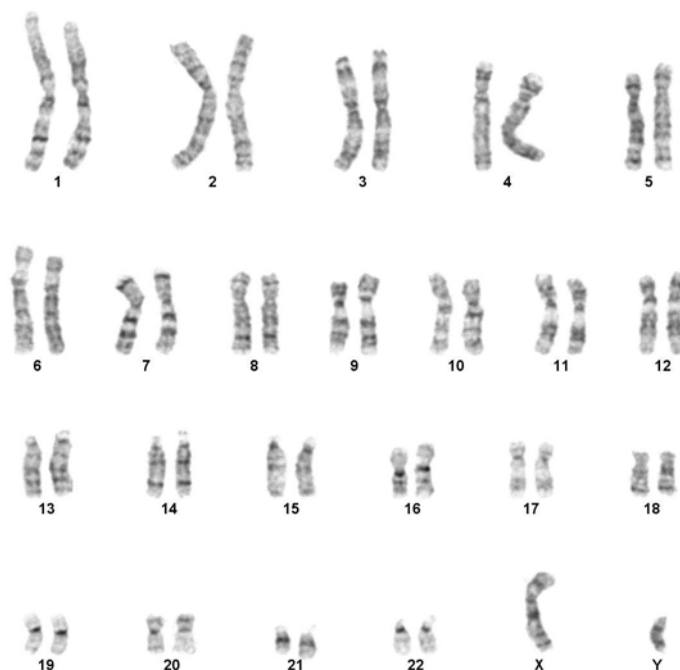


Slika 8: Rezultat analize FISH (ToTelVysion) pri preiskovanki 1. Regija q kromosoma 13 je obarvana rumeno. Ugotovili smo hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice q na kromosomu 13 (puščica). Normalna porazdelitev opisane subtelomerne regije je prikazana na sliki 14.

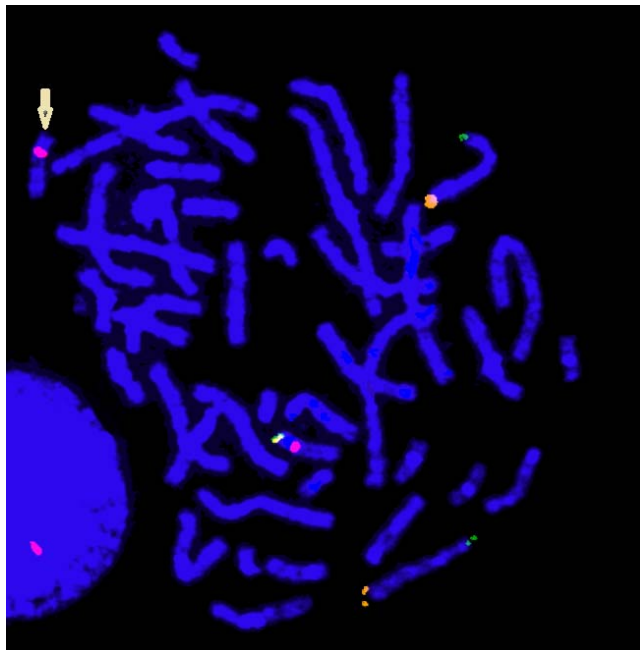
4.3.2 Primer 2

Pri še ne 6-letnem dečku z globalnim razvojnim zaostankom na področju govora in okorno motoriko s prisotnimi blažjimi kognitivnimi težavami, v smislu motnje pozornosti oz. koncentracije, so predhodno izključili sindrom fragilnega X. Prisotni so bili tudi dismorfni znaki, epikantus, progenija (naprej pomaknjena čeljust), manjša glava. Glede na kontrolni seznam je dosegel 3 točke. V njegovi družini ni bilo nevroloških obolenj. Deček redno obiskuje psihologa, logopeda in je voden v razvojni ambulanti in pri specialistih za sluh. V vrtcu ima dodatno učno pomoč, v prihodnje pa so zanj predlagali šolo s prilagojenim programom.

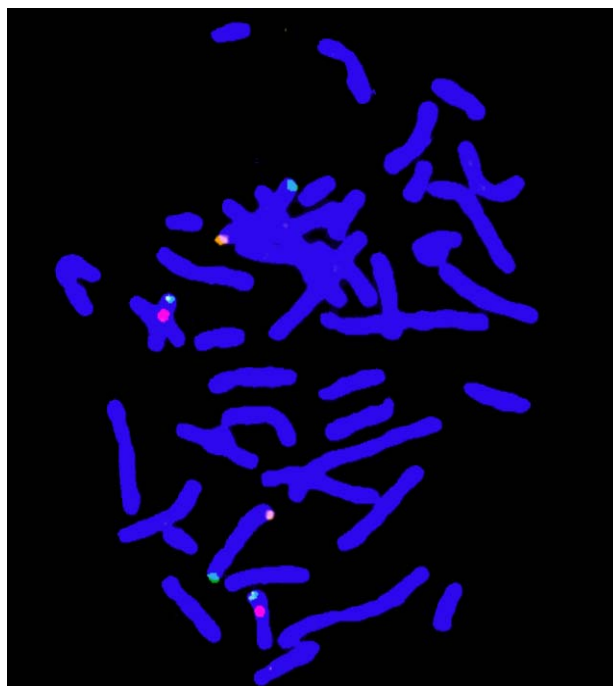
Določili smo normalen moški kariotip (46,XY). Kariogram je prikazan na slika 9. Pri analizi subtelomernih regij pa smo odkrili hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice p na kromosomu 17. Rezultat analize FISH je bil ish del(17)(17pter)(282M16/SP6-). Subtelomerna sonda, ki se prilega na regijo 17p13.3 je bila označena z rumeno barvo. Rezultat analize (slika 10) pa je pokazal odsotnost signala SP6 na enem kromosomu, kar potrjuje, da gre za hemizigotno delecijo na subtelomernem področju 17pter.



Slika 9: Primer 2 (kariogram 6-letnega dečka), kariotip 46,XY, ločljivost 400-500 prog/haploidni genom.



Slika 10: Rezultat analize FISH (ToTelVysion) pri preiskovancu 2. Regija p kromosoma 17 je obarvana rumeno. Ugotovili smo hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice p na kromosomu 17 (puščica)



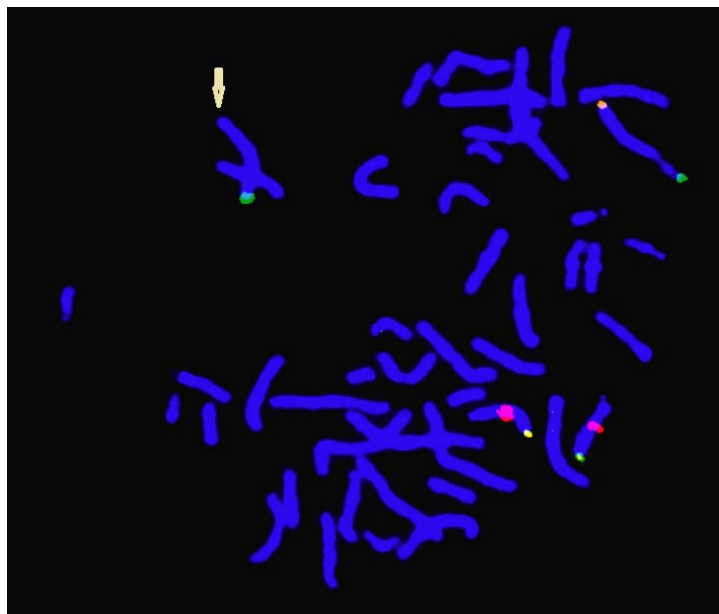
Slika 11: Rezultat analize FISH (ToTelVysion, mešanica sond št. 8), ki vključuje regijo p kromosoma 17. Prikazana je normalna ureditev subtelomernih regij.

4.3.3 Primer 3

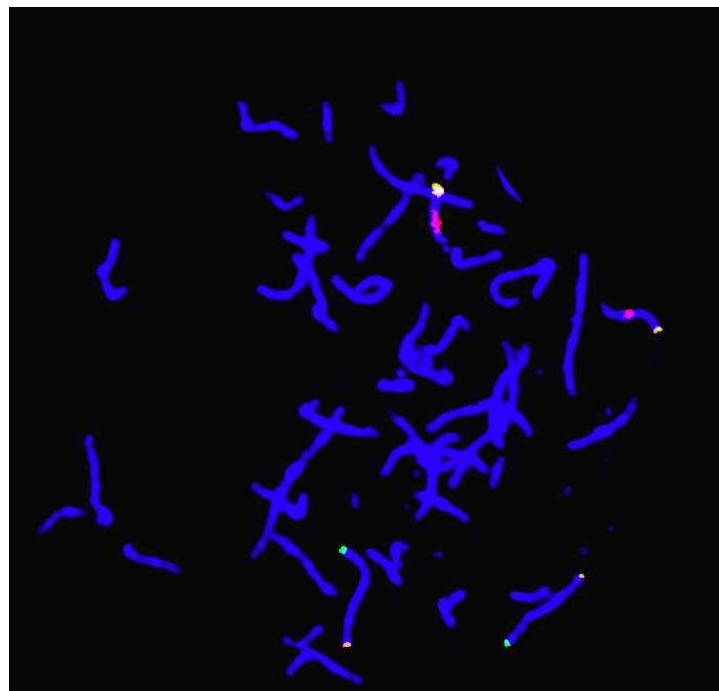
Deklica, ki je bila nedonošena zaradi prezgodnjega razpoka plodovih ovojev. Pri sedaj 2-letni deklici, ki obiskuje nefrofizioterapijo, delovno terapijo in socialnega pedagoga, z diagnozo mikrokranije, razvojnega zaostanka, strabizma (škilavost) in dismorfnih znakov, je bila opravljena kariotipizacija. Rezultat je pokazal normalen ženski kariotip (46,XX). Kariogram prikazuje slika 12. V kontrolnem seznamu je dosegla 5 točk. Rezultat analize FISH subteloernih regij je bil: ish del(6)(6qter)(VIJyRM2158-). Pri deklici je torej prisotna hemizigotna delecija subteloerne regije ročice q na kromosomu 6. Sonda, ki se prilega na regijo 6q27 (VIJyRM2158) je bila obarvana oražno. Odsotnost ustreznega signala pa prikazuje slika 13.



Slika 12: Primer 3 (kariogram 2-letne deklice), kariotip 46,XX, ločljivost 400-500 prog/haploidni genom.



Slika 13: Rezultat analize FISH (ToTelVysion). Regija q kromosoma 6 je obarvana oranžno. Ugotovili smo hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice q na kromosomu 6 (puščica).



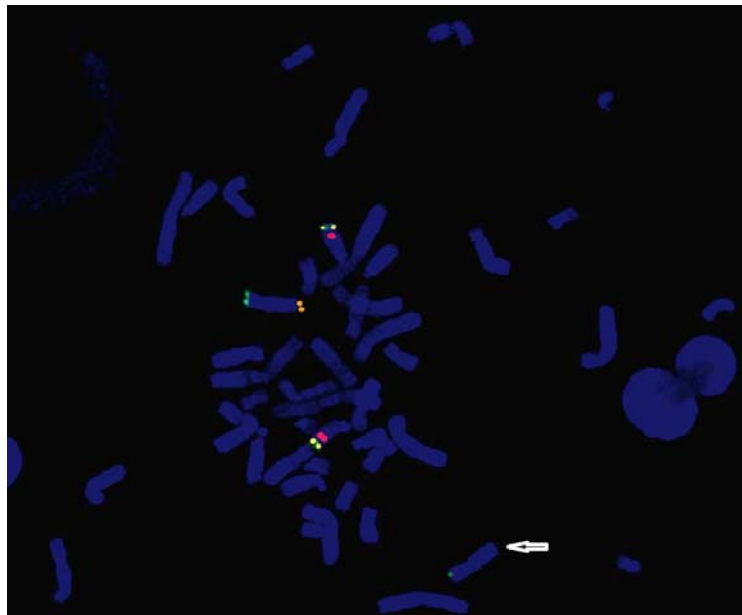
Slika 14: Rezultat analize FISH (ToTelVysion, mešanica sond št. 6). Vključena je regija q kromosoma 6 - normalna ureditev subtelomernih regij.

4.3.4 Primer 4

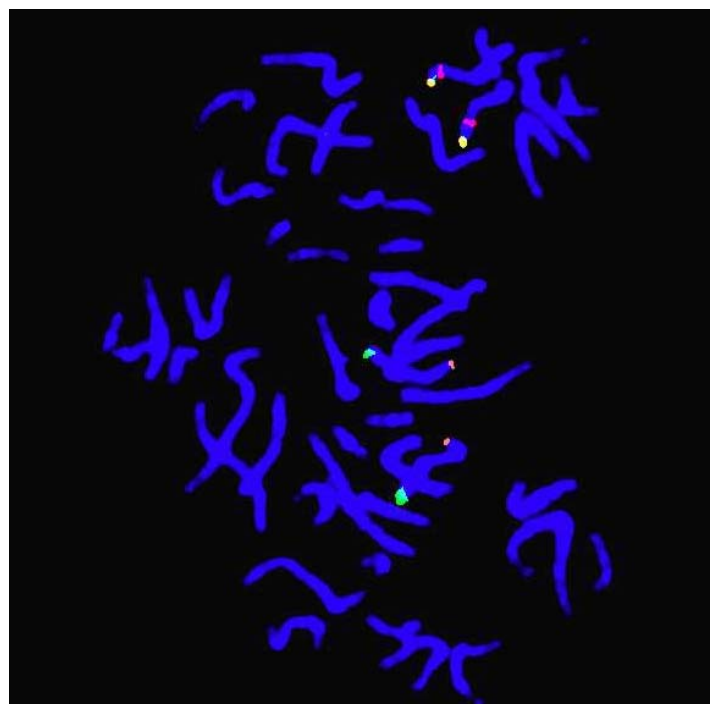
Dveletni deček je bil napoten na kariotipizacijo in analizo subtelomernih regij zaradi globalnega razvojnega zaostanka, dismorfnih znakov, konvergentnega strabizma in motenj mišičnega tonusa. V družini naj ne bi bilo posebnosti glede nevroloških obolenj. Glede na kontrolni seznam je dosegel 4 točke. Določili smo mu kariotip 46,XY,del(10)(q26.1). Kariogram prikazuje slika 15. Analiza subtelomernih regij je pokazala odsotnost specifičnega signala za področje 10q26.3 na lokusu D10S2290. Deček ima torej hemizigotno delecijo na subtelomernem področju dolge ročice kromosoma 10 (slika 16).



Slika 15: Primer 4 (kariogram dvehletnega dečka), kariotip 46,XY,del(10)(q26.1), ločljivost \square 550 prog/haploidni genom.



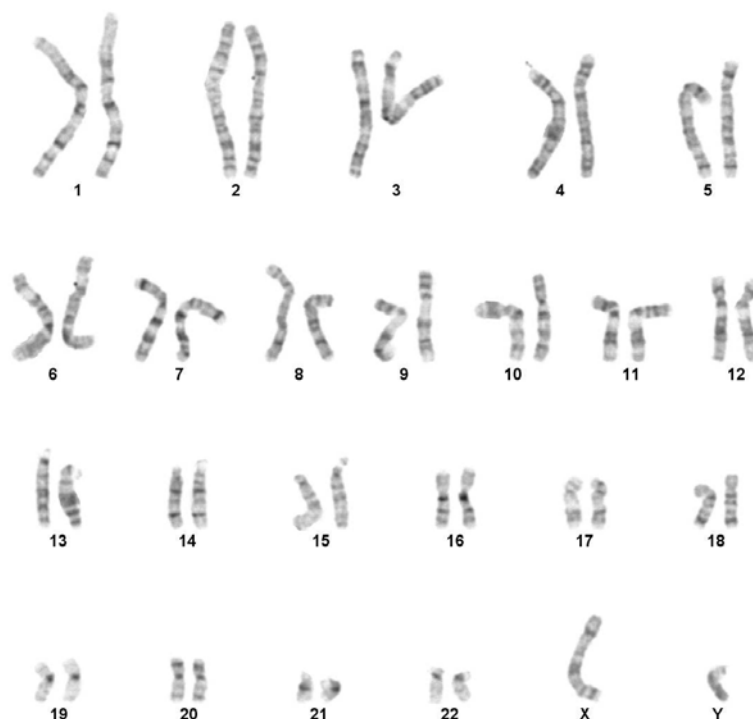
Slika 16: Rezultat FISH analize (ToTelVysion). Regija q kromosoma 10 je obarvana oranžno. Ugotovili smo hemizigotno delecijo subteloerne regije ročice q na kromosomu 10 (puščica).



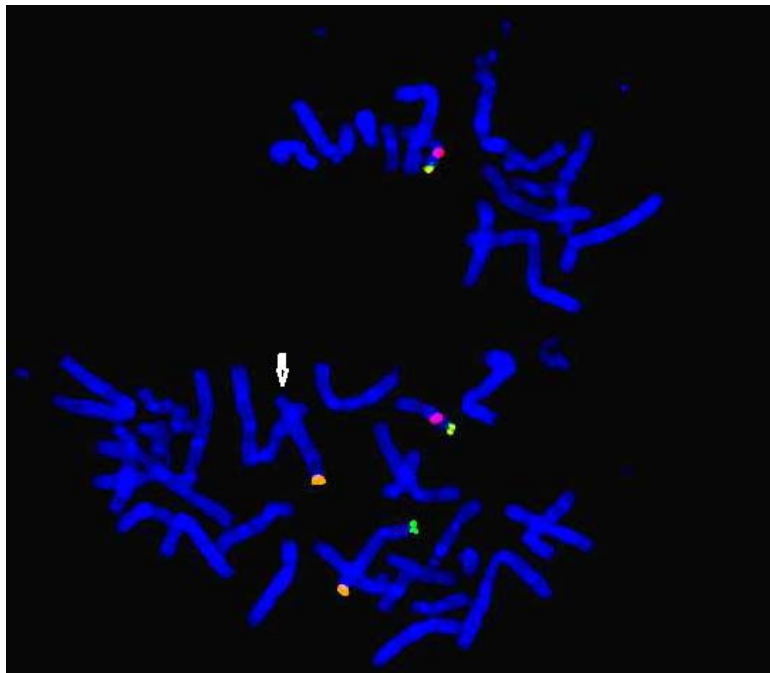
Slika 17: Rezultat analize FISH (ToTelVysion, mešanica sond št.10) - normalna ureditev subteloernih regij ročice q na kromosomu 10.

4.3.5 Primer 5

Pri enoletnem dečku z diagnozo razvojni zaostanek, je bil porod sprožen 3 tedne pred terminom, in sicer zaradi zastoja plodove rasti. V porodnišnici je bil narejen Ultra zvok glave, ki je kazal na intraventrikularno krvavitev ploda. V družini ni nevroloških obolenj. Deček je vključen v vrtec in obiskuje razvojno ambulanto ter logopeda. Glede na kontrolni seznam je prejel 3 točke. Analiza FISH subtelomernih regij kromosomov je pokazala hemizigotno terminalno delecijo ročice p na kromosomu 8. Odsoten je bil namreč zelen signal sonde, ki hibridizira na terminalno regijo 8p23.3 lokusa D8S504. Rezultat kariotipizacije je bil 46,XY,del(8)(p23.1). Kariogram je prikazan na sliki 18. Izsledki analize FISH pa so prikazani na sliki 19.



Slika 18: Primer 5 (kariogram 1-letnega dečka), kariotip 46,XY,del(8)(p23.1), ločljivost 550 prog/haploidni genom.



Slika 19: Rezultat analize FISH (ToTelVysion), terminalna regija kromosoma 8 je obarvana zeleno. Ugotovili smo hemizigotno terminalno delecijo subtelomerne regije ročice p na kromosomu 8 (puščica). Normalne porazdelitve te subtelomerne regije prikazuje slika 11.

5. RAZPRAVA

Preureditve subtelomernih regij kromosomov so vzrok za pomemben delež idiopatske duševne manjrazvitosti (IDM) in kliničnih znakov, ki jo spremljajo (18,26,31,34,37). Za večino subtelomernih preureditev je klinični fenotip še vedno neopredeljen, zato je presejanje vseh subtelomernih regij kromosomov izjemno pomembno diagnostično orodje (20).

Za odkrivanje subtelomernih preureditev imamo na razpolago številne molekularno-genetske in citogenetske metode, med katerimi se najpogosteje uporablja metoda simultane FISH, s telomernimi sondami na metafaznih kromosomih. Prednosti te metode, v primerjavi s klasično citogenetsko analizo, sta njena specifičnost in občutljivost. Metoda je po drugi strani zamudna, draga in zahteva izkušenega izvajalca. Slabosti metode FISH sta tudi slabša oz. težja detekcija kromosomskih podvojitvev in odvisnost od kvalitetne razporeditve metafaznih kromosomov (46). Analiza subtelomernih regij s simultano FISH je pomembna, saj z njo presegamo resolucijo klasične citogenetske analize.

Pri barvanju GTG z ločljivostjo 450-500 prog/haploidni genom namreč, zaradi omejene ločljivosti svetlobnega mikroskopa, ne uspemo zaznati preureditev, ki so manjše od 5Mb. Opazimo lahko le večje kromosomske spremembe (5-10 Mb). Terminalni kromosomski konci po barvanju GTG ostanejo neobarvani in zato majhne preureditve na teh predelih lahko zgrešimo tudi pri višji resoluciji (high resolution karyotyping) s 550-800 progami/haploidni genom (16,21). Metodo simultane FISH smo uporabili za ugotavljanje kriptičnih s klasično citogenetsko analizo nedoločljivih subtelomernih preureditev, saj so te vzrok za pomemben delež IDM.

5.1 PREISKOVANCI

Z upoštevanjem vključitvenega kriterija »normalen kariotip«, smo izključili vse preiskovance s patološkimi kariotipi. Pri nekaterih preiskovancih so bili klinični znaki del jasno opredeljenega in določenega sindroma, npr. sindroma fragilnega X in Downovega sindroma oz. pogostih mikrolepcijskih sindromov, za katere je poleg znanega specifičnega fenotipa značilna tudi DM, npr. DiGeorgeov sindrom, Prader Willijev

sindrom. Končni nabor je zajemal 103 preiskovance, ki so ustrezali vsem vključitvenim kriterijem. V primeru dveh preiskovancev (4 in 5), pri katerih smo z metodo FISH zaznali subtelomerno preureditev, smo po ponovni evaluaciji kariotipa, z zavedanjem ugotovljene spremembe, le to zaznali tudi s klasično citogenetsko analizo. Oba preiskovanca sta sicer v celoti ustrezala vključitvenemu kriteriju »normalen kariotip«. Obe preureditvi nista bili kriptični, pač pa (sub)telomerni, zato smo ju tudi vključili v nalogo. Obe spremembi smo dejansko detektirali z metodo FISH in bi ju s klasično citogenetsko preiskavo zagotovo spregledali.

Postavitev diagnoze DM zahteva točne in veljavne ocene inteligence, pri čemer lahko otrokovo inteligenco natančno ocenimo šele po petem letu starosti (2). Preiskovance smo zato, glede na njihovo starost razvrstili v dve skupini, in sicer na tiste stare do 5 let in tiste, starejše od 5 let. Razširjen pregled subtelomernih regij pri osebah z motnjami v duševnem razvoju je zelo zaželen, vendar pa zaradi kompleksnosti metode FISH in visokih stroškov, tovrstnega testiranja ni mogoče izvajati pri predhodno neselekcioniranih pacientih. Ključen je torej njihov klinični predizbor. De Vries in sodelavci so zato postavili pet-točkovni kriterij, ki izboljša diagnostično stopnjo subtelomernih preureditev pri osebah z RZ/DM. Z učinkovitim predizborom lahko kar za 20% zmanjšamo število preiskovancev, ne da bi pri tem kakšnega s subtelomerno preureditvijo, izpustili. Testiranje preiskovancev z več kot tremi predselekcijskimi točkami poveča diagnostično občutljivost (18). V našem primeru so bili vsi preiskovanci, pri katerih smo odkrili subtelomerne kromosomske preureditve, po pet-točkovnem kriteriju dosegli od 3-5 točk. Vsi preostali, pri katerih subtelomernih preureditev nismo zaznali, pa so imeli 1-3 točke. Naši rezultati torej nedvomno potrjujejo pomen kliničnega predizbora in uporabnost pet-točkovnega kriterija.

Glede na napotno diagnozo in klinične znake smo preiskovance razdelili v naslednje skupine: DM, RZ, dismorfni znaki, mikro/makrokranija in epilepsija. Vsi omenjeni znaki pogosto spremljajo IDM. Glede pogostosti kliničnih znakov med preiskovanci smo ugotovili, da je bil pri 65,0% prisoten RZ, DM pa le pri 13.2%. To se ujema s starostjo preiskovancev in s predhodno opisano mejo za postavitev diagnoze DM. Omeniti velja, tudi to, da so bili med spremljevalnimi kliničnimi znaki RZ/DM najpogosteje prisotni dismorfni znaki (41,7% preiskovancev), epilepsija - tudi infantilni spazmi in cerebralni

paroksizem (23,3% preiskovancev) ter mikro/makrokranija (8,7% preiskovancev). Mišična hipo in hipertoničnost (motnja mišičnega tonusa) pa sta bili prisotni pri 39,8% preiskovancev. Kariotipizacijo in analizo subtelomernih regij kromosomov s simultano FISH, smo izvedli na vzorcih izoliranih celic 103 preiskovancev, ki med seboj niso bili v sorodu. Od tega je bilo 58 (56,3%) dečkov in 45 (43,7%) deklic, starih od 0 do 26 let (povprečje 5,3 let). Razmerje med spoloma je bilo 1,29:1 v korist dečkov. Do vključno 5 let je bilo starih 69 otrok (66,9%), od tega je bilo 38 dečkov (55,1%) in 31 deklic (44,9%). Starejših od 5 let (do 26 let) pa je bilo 20 dečkov (58,8%) in 14 deklic (41,2%).

5.2 POGOSTOST

V okviru magistrske naloge smo določili uporabnost metode simultane FISH za klinično testiranje subtelomernih regij. Hkrati smo določili tudi pogostost pojavljanja subtelomernih preureditev pri preiskovancih z RZ/DM, dismorfni znaki, mikrokranijo in drugimi nepravilnostmi, ob sicer normalnem kariotipu.

Kot smo že omenili smo analizo subtelomernih regij kromosomov izvedli pri 103 preiskovancih. Pri petih med njimi, smo odkrili subtelomerne kromosomske preureditve, kar predstavlja 4,85%. V tabeli 2 smo predstavili pregled študij o prevalenci (pogostosti) subtelomernih preureditev med preiskovanci z IDM (39). Pogostost pojavljanja subtelomernih preureditev je sicer težko natančno določiti, saj je odvisna od številnih dejavnikov kot so: različne tehnike iskanja subtelomernih preureditev, uporabe različnih potrditvenih metod, različno število preiskovancev (n), različna klinična merila za vključitve preiskovancev in različna občutljivost uporabljenih metod (7,38). Pogostost pojavljanja subtelomernih preureditev v naši skupini je primerljiva z rezultati študije 5380 preiskovancev (4,4%). V njej pa so avtorji uporabljali drugo analitsko metodo (aCGH) kot mi (21). Podobno kot mi, so tudi oni med najpogostejšimi razlogi za napotitev bolnikov na analizo subtelomernih regij navedli RZ/DM, dismorfne znake, kongenitalne anomalije in nevrološke napade.

Doslej najštevilnejša študija, ki so jo na 11.688 preiskovancih izvedli Ravnan in sodelavci, je ugotovila stopnjo odkrivanja klinično značilnih subtelomernih preureditev pri približno 2,5% bolnikov, kar je manj kot v našem primeru. V omenjeni študiji so tako kot

mi uporabljali metodo FISH, vanjo pa so vključili preiskovance s podobnimi napotnimi diagnozami oz. kliničnimi znaki kot v našem primeru (32).

Pomembnost kromosomskih preureditev, ki so vzrok za IMR je dobro poznana. Tiste, ki vključujejo kromosomske konce so našli pri približno 5% primerov (26,31). V povprečju se torej rezultati našega dela ujemajo z objavljenimi izsledki. Menimo, da so strožji vključitveni kriteriji pomemben dejavnik za pravilnejšo oceno pogostosti pojavljanja subtelomernih preureditev pri posameznikih z RZ/DM, ki je poleg tega odvisna tudi od vrste raziskave. Stopnja DM je eden glavnih napovedovalcev verjetnosti, da bomo vzrok za težave posameznika našli na nivoju subtelomernih kromosomskih preureditev (16,18).

Prvo večjo študijo iskanja subtelomernih preureditev, ki je bila osnovana na analizi FISH je leta 1999 izvedel Knight s sodelavci. Ugotovili so, da je do subtelomernih kromosomskih preureditev prišlo pri 7,4% otrok z zmerno do hudo DM (21/284) in pri 0,5% tistih z blago DM (1/182)(37). V našem primeru ne moremo tako natančno opredeliti rezultatov, saj je bilo v naši skupini 65% preiskovancev mlajših od pet let in jim zato natančne diagnoze DM še niso mogli postavili, poleg tega pa smo razpolagali s preskopo medicinsko dokumentacijo. Zaradi tega v našo raziskavo nismo vključili družinskih anamnez, ki pravtako pomembno prispevajo k postavitvi diagnoze. Pri 5 pozitivnih preiskovancih je bila v dveh primerih družinska anamneza sicer znana, a negativna, v ostalih treh pa podatkov o tem nismo imeli.

5.3 CITOGENETSKE IN KLINIČNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV S SUBTELOMERNIMI DELECIJAMI

Z metodo simultane FISH smo med 103 preiskovanci z RZ/DM odkrili skupno 5 takih s subtelomernimi preureditvami, natančneje delecijami.

Pri preiskovanki 1, smo našli hemizigotno delecijo na ročici q kromosoma 13. Na poglobljeno laboratorijsko diagnostiko je bila naročena z diagnozo RZ in epilepsije. Poleg tega so bili pri njej prisotni tudi dismorfni znaki (izrazita deformacija levega stopala), hipertelorizem (nenormalno povečana razdalja med očmi), epikantus (navpična očesna guba) in konvergentni strabizem (škilavost, odklon očesa navznoter). Njen govor je bil težje razumljiv, prisotna pa je bila tudi izrazito okorna motorika s hudo motnjo koordinacije gibov. Preiskovanki smo določili normalen ženski kariotip (46,XX). Rezultat

analize FISH subtelomernih regij, ish del(13)(qter)(D13S327-), je pokazal, da gre za hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice q na kromosomu 13, saj smo zaznali le en jasen rumen signal, po hibridizaciji sonde na subtelomerno regijo 13q34 lokus D13S327.

Fenotip 13q delecijskega sindroma so prvič opisali leta 1969. Značilen je za RZ, mikrokranijo (majhna glava), hipertelorizem, hipoplazijo ali odsotnost palcev, hipoplastični ledvici in dvoumne genitalije. Odvisen je od lokacije in velikosti »delitiranega« segmenta in ga delimo v tri skupine:

- skupina 1 z delecijo proksimalno od domnevne kritične regije q32, ki se odraža v zaostanku rasti, blagi DM in manjših nenormalnostih;
- skupina 2, ki vključuje delecijo q32 z »najresnejšim« fenotipom, z zaostankom rasti, hudo DM, mikrokranijo, dismorfni znaki, gastrointestinalnimi okvarami, pomanjkljivostmi udov in okvarami centralnega živčnega sistema (CŽS);
- skupina 3 s terminalnimi delecijami q33-q34, z DM brez večjih nepravilnosti in brez zaostanka v rasti (47).

Delecijski sindromi 13q so redki, še posebej tisti iz 3. skupine. Fenotipsko naša preiskovanka ne ustreza opisanemu sindromu. Drugi avtorji so z visoko resolucijsko SNP mikromrežo (angl. single nucleotide polymorphism array) zaznali del 13q34 v velikosti 1,1 Mb, ki je do danes najmanjša opisana delecija na tej kromosomski regiji. Vanjo so vključeni številni geni, odgovorni za razvoj srca (48).

Drugi primer odkrite preureditve je bila hemizigotna delecija subtelomerne regije na ročici p kromosoma 17. Pri dečku z globalnim RZ in okorno motoriko z blažjimi kognitivnimi težavami, so predhodno izključili sindrom fragilnega X. Prisotni so bili tudi dismorfni znaki, epikantus (navpična očesna guba), progenija (naprej pomaknjena čeljust), mikrokranija (majhna glava). Določili smo normalen moški kariotip (46,XY). Z analizo subtelomernih regij smo odkrili hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice p na kromosomu 17. Rezultat analize FISH je bil ish del(17)(17pter)(282M16/SP6).

Miller-Diekerjev lisencefalični sindrom (MDLS) spremljajo mikrokranija, lisencefalija, značilen videz obraza (vidno čelo, majhen nos z obrnjenimi nosnicami, štrleča zgornja ustnica, majhna čeljust), ter RZ oz. DM (49). Nastane lahko zaradi delecije oz. mutacije gena *LIS1* v kromosomski regiji 17p13.3. Mutchinick in sodelavci so opisali primer otroka z delecijo, ki je vključevala kritično regijo znotraj 17p13.3, pri čemer pa je bil lokus *LIS1*

nespremenjen. Zaključili so, da gre za posebno obliko fenotipa ne-*LISI* MDLS (19). Delecija celotnega gena *LISI* (601545) ali njegova mutacija najverjetneje povzroča lisencefalijo. Dismorfizmi obraza pri MDLS pa so posledica delecij drugih genov, ki se nahajajo distalno od *LISI*. Delecije dodatnih genov, npr. *CRK*, v kombinaciji z delecijo *LISI*, so razlog za težje oblike lisencefalije pri pacientih z MDLS (49).

Tretji preiskovanki z odkrito subtelomerno preureditvijo smo določili normalen ženski kariotip (46,XX), pri presejanju subtelomernih regij z analizo FISH pa smo zaznali hemizigotno delecijo subtelomerne regije ročice q kromosoma 6, in sicer na regiji 6q27, ish del(6)(6qter)(VIJyRM2158-). Poleg mikrokranije, diskranije (spremenjena oblika glave), RZ, strabizma in dismorfnih znakov (valgus stopal-deformirano stopalo, ozka zgornja ustnica, gotsko nebo) so bili pri deklici prisotni še ASD (angl. atrial septal defect), generalizirana hipotonija in sindrom malega očesa.

Subtelomerne delecije dolge ročice kromosoma 6 so redke, saj je njihova frekvenca pri osebah z RZ/DM in/ali dismorfni znaki približno 0,05%. Leta 1997 so Hopkins in sodelavci definirali tri fenotipske skupine povezane z delecijo 6q, ki so vidne po barvanju GTG:

- skupina A ima proksimalno 6q: del(6)(q11-q16);
- skupina B intersticialno: del(6)(q15-q25);
- skupina C pa distalno delecijo: del(6)(q25-qter), ki je povezana z RZ/DM, nepravilnostmi mrežnice, volčjim žrelom, spolno hipoplazijo, nepravilnostjo udov, vodenoglavostjo, srčnimi napakami in napadi. Glede na to in regijo, na kateri smo odkrili subtelomerno delecijo, ugotavljamo, da ima naša preiskovanka fenotip, ki sodi v terminalno delecijo skupine C (50).

Četrty primer je bil preiskovanec, ki smo mu določili kariotip 46,XY,del(10)(q26.1). Poleg globalnega RZ, dismorfnih znakov (slabo oblikovani in nižje položeni uhlji, valgus stopal), konvergentnega strabizma in motenj mišičnega tonusa, je bila kot del napotne diagnoze navedena tudi trigonocefalna glava (trioglata glava). Z analizo subtelomernih regij smo dokazali odsotnost specifičnega signala za subtelomerno regijo q26.3 na lokusu D10S2290 dolge ročice kromosoma 10. De Vries in sodelavci opisujejo, da imajo preiskovanci z mikroskopsko vidno delecijo 10q26.1-qter konsistenten fenotip, ki vključuje: DM, RZ

(prenatalen in postnatalen), z mikrokranijo, trigonocefalno glavo, strabizmom, hipertelorizmom, nizko položenimi ušesi, nespuščenimi testisi oz. spolnimi napakami ter srčnimi in ledvičnimi nepravilnostmi (31).

V zadnjem, petem primeru smo ugotovili terminalno delecijo subtelomerne regije ročice p na kromosomu 8. Analiza FISH subtelomernih regij kromosomov je pokazala hemizigotno terminalno delecijo ročice p na kromosomu 8. Odsoten je bil zelen signal specifične sonde, ki hibridizira na terminalno regijo 8p23.3 lokusa D8S504. Deček je bil napoten na preiskavo z diagnozo RZ, vedenjsko pa ni problematičen. Rezultat kariotipizacije je bil 46,XY,del(8)(p23.1).

Majhne terminalne delecije 8p23.1 ugotavljajo pogosteje. Pomemben vidik tega fenotipa je blaga DM ter nepravilnosti s hudimi vedenjskimi motnjami v otroštvu. Opažene so namreč nenadne in ekstremne spremembe vedenja, z izbruhi agresivnosti in destruktivnosti. Toleranca frustracije je izjemno nizka, vedenje pa naj bi se izboljšalo šele v pozni adolescenci. Možno je, da je za to klinično sliko odgovorna lokacija »nevrovedenjskih« genov na distalnem delu 8p. Terminalna ali intersticialna delecija 8p23.1 lahko »izbriše« gene za srce značilni transkripcijski dejavnik (*GATA4*), kar je razlog, za pogosto pojavljajoče srčne napake (19). Fenotip našega preiskovanca zaenkrat sicer še ne ustreza opisanemu, kljub temu da gre za delecijo omenjene regije. Možen razlog zato je, da določeni klinični znaki pri enoletnem preiskovancu še niso izraženi.

Pri vseh preiskovancih, pri katerih smo z metodo simultane FISH zaznali subtelomerno preureditev, bi bilo smiselno, le to potrdili še z drugo, neodvisno metodo, npr. z od ligacije odvisnim hkratnim pomnoževanjem sond (MLPA). Ta metoda se uporablja za relativno kvantifikacijo zaporedij približno 45 specifičnih regij DNK, v eni sami reakciji, poleg tega pa je občutljiva in zahteva le majhno količino DNK. Princip metode temelji na identifikaciji tarčnih zaporedij s hibridizacijo parov sond MLPA, ki se vežejo na prilegajoča zaporedja in se kasneje povežejo z ligacijo. Za vsako specifično tarčno zaporedje imamo na razpolago set dveh sond, ki hibridizirata na prilegajoče se zaporedje, ena poleg druge. Sestavljeni sta iz kratkega specifičnega tarčnega zaporedja in univerzalnega smernega (forward) ali protismernega (reverse) zaporedja

oligonukleotidnega začetnika PCR. Po hibridizaciji na tarčno zaporedje, para sond povežemo s termostabilno ligazo (16,22). Metoda MLPA je točna, zanesljiva in cenovno ugodna alternativa za simultano FISH. Poleg tega je tehnično nezahtevna in uporabna za detekcijo delecij in/ali duplikacij pri različnih genetskih boleznih. Z njo lahko izrazito skrajšamo čas analize, saj sočasno preiskujemo različne kromosomske regije (46).

Poleg tega bi bilo smiselno izvesti tudi parentalno analizo, za podporo morebiti potrebnemu genetskemu svetovanju, ter zato, da bi pri preiskovancih ugotovili izvor dedovanja subtelomerne preureditve.

Za preiskovanca, pri katerih smo s citogenetsko analizo opredelili mesto kromosomskega loma (preiskovanca 4 in 5), smo opravili iskanje v bazi Ecaruca, ki je dostopna na svetovnem spletu. Ecaruca (angl. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations) je evropski citogenetski register neuravnoteženih kromosomskih preureditev, ki služi za pomoč pri interpretaciji ugotovljenih kromosomskih preureditev.

V bazi je za kariotip 46,XX, del(10)(q26.1) oz. 46,XY, del(10)(q26.1) trenutno opisanih 21 primerov. Nobena od opisanih delecij ni bila dedovana po materi (maternalno), ali po očetu (paternalno). De novo je nastalo 17 delecij, za 4 pa ni podanih podatkov o izvoru njihovega dedovanja. Za vse opisane primere navedene delecije, so v kliničnih opisih prisotni bodisi RZ ali DM, dismorfni znaki ter motnje mišičnega tonusa. Vsi ti klinični znaki pa so prisotni tudi pri našem preiskovancu z delecijo tega subtelomernega področja, kar pomeni, da je ta kromosomska preureditev vzrok za razvoj njegovega patološkega fenotipa (51).

Za kariotip 46,XX, del(8)(p23.1) oz. 46,XY, del(8)(p23.1) je v bazi Ecaruca opisanih 43 primerov. Od vseh opisanih delecij nobena ni bila dedovana maternalno, paternalno sta se podedovali dve. Po podatkih, dostopnih v bazi je 29 primerov nastalo de novo, za preostalih 12 pa ni podatkov o izvoru delecije. Tudi v tem primeru se opisani klinični znaki (DM, dismorfni znaki, motnje mišičnega tonusa) ujemajo s tistimi, ki jih ima naš preiskovanec z delecijo na tem subtelomernem področju. To potrjuje, da je kromosomska preureditev, ki smo jo odkrili pri našem preiskovancu dejansko vzrok za nastanek njegovega patološkega fenotipa (51).

Na koncu torej lahko potrdimo, da so odkrite subtelomerne kromosomske preureditve odgovorne za prisotnost patoloških fenotipov pri izbranih preiskovancih. Odkrivanje vzrokov IDM je velik izziv. V ta namen lahko vsem preiskovancem z diagnozo RZ/DM neznanega vzroka ponudimo presejalno testiranje subtelomernih regij. Metoda simultane FISH je uporabno dopolnilo klasične citogenetske analize. Za izključitev suma na kromosomske preureditve pri osebah z RZ/DM so nujno potrebne točne in zanesljive metode. Trenutno sta v ospredju postopka MLPA in aCGH. S slednjim lahko zaznamo submikroskopske kromosomske preureditve celega genoma, poleg tega pa omogoča natančno razmejitev podvojenih ali delitiranih kromosomskih segmentov. To pa je ključnega pomena za opredeljevanje korelacije genotip-fenotip in za ugotavljanje kandidatnih genov, ki sodelujejo pri razvoju RZ/DM (52).

Uspeli smo potrditi delovno hipotezo, in to kljub temu, da so pri našem delu obstajale objektivne pomanjkljivosti. Ena izmed njih je ta, da bi morali v študijo vključiti večje število preiskovancev. Smiselno bi bilo tudi, da bi ugotovljene subtelomerne preureditve potrdili še z eno, neodvisno metodo, npr. z MLPA. Pri pozitivnih preiskovancih bi bilo potrebno izvesti tudi parentalno analizo, da bi lahko določili izvor ugotovljenih preureditev.

6. ZAKLJUČKI

1. Subtelomerne kromosomske preureditve smo odkrili pri 5 (4,85%) od 103 izbranih preiskovancev. Dokazali smo, da predstavljajo vzroke za njihove patološke fenotipe povezane z RZ/DM. Pogostost subtelomernih kromosomskih preureditev pri izbranih preiskovancih se v povprečju ujema s predhodno objavljenimi izsledki.

2. Simultana FISH je uporabna in zanesljiva metoda za iskanje in potrjevanje subtelomernih kromosomskih preureditev pri izbranih preiskovancih.

7. LITERATURA

1. Schalock RL, Luckasson RA, Shogren KA, Borthwick-Duffy S, Bradley V, Buntinx WH, Coulter DL, Craig EM, Gomez SC, Lachapelle Y, Reeve A, Snell ME, Spreat S, Tassé MJ, Thompson JR, Verdugo MA, Wehmeyer ML, Yeager MH. The renaming of mental retardation: understanding the change to the term intellectual disability. *Intellect Dev Disabil.* 2007; 45: 116-24.
2. Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006; 117: 2304-16.
3. Sogaard M, Tümer Z, Hjalgrim H, Hahnemann J, Friis B, Ledaal P, Pedersen VF, Baekgaard P, Tommerup N, Cingöz S, Duno M, Brondum-Nielsen K. Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter. *BMC Med Genet.* 2005; 6: 21.
4. Tomori M, Zihelr S. Psihijatrija. Ljubljana, Medicinska fakulteta, 1999, 303-16.
5. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic Evaluation of Developmental Delay/Mental Retardation: An Overview. *Am J Med Genet* 2003; 117C: 3-14.
6. Kiely M. The prevalence of mental retardation. *Epidemiologic reviews* 1987; 9: 194-218.
7. Park HK, Kim HJ, Kim HJ, Han SH, Kim YJ, Kim SH. Screening of Subtelomeric Rearrangements in 100 Korean Pediatric Patients With Unexplained Mental Retardation and Anomalies Using Subtelomeric FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). *J Korean Med Sci* 2008; 23: 573-8.
8. Phillips D.M., Longlett S.K., Mulrine C., Kruse J. and Kewney R. School Problems and the Family Physician. Quincy Family Practice Residency Program, Southern Illinois University School of Medicine, Quincy, Illinois *Am Fam Physician* 1999; 59: 2816-24
Dostopno na: <http://www.aafp.org/afp/1999/0515/p2816.html>
9. Schroeder S, Gerry M, Gertz G, Velasquez F. Final Project Report: Usage of the term "Mental Retardation:" Language, Image and Public Education. Social Security Administration; June 2002.
10. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, et al. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2003; 60: 367-80.

11. Shaffer LG. American college of medical genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med.* 2005; 7: 650-4.
12. Bon J. Etiologija in klinična slika duševne manjrazvitosti pri otrocih. *Med razgl* 1998; 37: 535-48.
13. Moravec-Berger D, Balažič J, Ravnik IM, Kovačič I. Mednarodna klasifikacija bolezni in sorodnih zdravstvenih problemov za statistične namene (MKB-10). Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 1995, 369-70.
14. Islam S, Durkin MS, Zaman SS. Socioeconomic status and the prevalence of mental retardation in Bangladesh. *Ment Retard* 1993; 31: 412-7.
15. Xu J, Chen Z. Advances in Molecular Cytogenetics for the Evaluation of Mental Retardation. *Am J Med Gen* 2003; 117C:15-24.
16. Schoumans J: Gene dose imbalances in children with mental retardation. Karolinska university press, Stockholm, 2005.
17. <http://emedicine.medscape.com/article/1180709-overview>
18. de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38: 145-50.
19. Gardner RJM., Sutherland GR.: Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford University Press, New York, 2004.
20. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner H, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004; 41: 892-9.
21. Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y, Neill S, Pursley AN, Chinault AC, Patel A, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A.* 2008;146A: 2242-51.
22. <http://www.mrc-holland.com>
23. Riethman H, Ambrosini A, Paul S. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Res.* 2005; 13: 505-15.
24. Košir Pogačnik R, Nina Slabe, Meden Vrtovec H. Telomere, telomeraza in prezgodnja odpoved jajčnikov. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 832-7.

25. Luzar B, Gale N, Poljak M, Cör A. Telomere in telomeraza pri človeku – zgradba, funkcija in vloga v procesu kancerogeneze. *Med razgl* 2000; 39: 271-9.
26. Knight SJ, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; 37: 401-9.
27. Flint J, Bates GP, Clark K, et al. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1305-13.
28. Flint J, Thomas K, Micklem G, et al. The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet* 1997; 15: 252-7.
29. Kermouni A, Van Roost E, Arden KC, et al. The IL-9 receptor gene (IL9R): genomic structure, chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter, and 18pter. *Genomics* 1995; 29: 371-82.
30. Schluth-Bolard C, Ottaviani A, Bah A, Boussouar A, Gilson E, Magdinier F. Dynamics and plasticity of chromosome ends: consequences in human pathologies. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2010; 14: 501-24.
31. De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*. 2003; 40: 385-98.
32. Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet*. 2006; 43: 478-89.
33. Archer HL, Gupta S, Enoch S, Thompson P, Rowbottom A, Chua I, Warren S, Johnson D, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Williams P, Pilz DT. Distinct Phenotype Associated With a Cryptic Subtelomeric Deletion of 19p13.3-pter. *American Journal of Medical Genetics* 2005; 136A: 38-44.
34. Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet*. 2001; 109: 440-51.
35. Wilkie AO. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1993; 53: 688-701.
36. Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet*. 1995; 9: 132-40.

37. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*. 1999; 354: 1676-81.
38. Velagaleti GV, Robinson SS, Rouse BM, Tonk VS, Lockhart LH. Subtelomeric Rearrangements in Idiopathic Mental Retardation. *Indian J Pediatr* 2005; 72: 679-85.
39. Rafati M, Ghadirzadeh MR, Heshmati Y, Adibi H, Keihanidoust Z, Eshraghian MR, Dastan J, Hoseini A, Purhoseini M, Ghaffari SR. "Familial" versus "sporadic" intellectual disability: contribution of subtelomeric rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2012; 5: 4.
40. Czepulkowski B: *Analyzing Chromosomes*. Springer-Verlag, New York, 2001.
41. Gersen LS, Keagle BM: *The principals of clinical Cytogenetics*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005.
42. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>
43. http://www.abbottmolecular.com/static/cms_workspace/ToITelVysion_Telomere_Base_Pair_Positions_09152011.pdf
44. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. E.C.A. – European Cytogeneticists association newsletter, 2012.
45. Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J.: *ISCN (2009): An international system for human cytogenetic nomenclature*. Karger S., Basel, 2009.
46. Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *Korean J Lab Med* 2009; 29: 71-6.
47. Witters I, Chabchoub E, Vermeesch JR, Fryns J-P. Submicroscopic distal deletion of the long arm of chromosome 13(13q34) with corpus callosum agenesis. *Am J Med Genet* 2009; 149A: 1834-6.
48. Yang YF, Ai Q, Huang C, Chen JL, Wang J, Xie L, Zhang WZ, Yang JF, Tan ZP. A 1.1Mb deletion in distal 13q deletion syndrome region with congenital heart defect and postaxial polydactyly: Additional support for a CHD locus at distal 13q34 region. *Gene*. 2013; 528: 51-4.
49. Lin CY, Chen CP, Liao CL, Su PH, Tsao TF, Chang TY, Wang W. Prenatal diagnosis of monosomy 17p (17p13.3→pter) associated with polyhydramnios, intrauterine growth restriction, ventriculomegaly, and Miller-Dieker lissencephaly syndrome in a fetus. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2009; 48: 408-11.
50. Lee JY, Cho YH, Hallford G. Delineation of subtelomeric deletion of the long arm of chromosome 6. *Ann Hum Genet*. 2011; 75: 755-64.

51. <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/>

52. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet.* 2005; 42: 699-705.

8. PRILOGE

Priloga I: Lastnosti sond iz kompleta Vysis ToTelVysion Multi-color FISH Probe kit, Abbott Molecular.

Št. mešanice	Opis označenega produkta	Lokus	Velikost sonde	Pozicija UCSC Browser Feb 2009
mix #1	1p SpGreen	CEB108/T7	100,6 kb	1043148
	1q SpOrange	VIJyRM2123, 1QTEL10 (D1S3738, GDB: 9043912)	294 kb	248900861
	Xp/Yp Yellow	DXYS129, DXYS153	163 kb	506482
	CEP X Aqua	Xp11.1-q11.1 alfa satelit DNK		
mix #2	2p SpGreen	VIJyRM2052 (GenBank U32389)	181 kb	415273
	2q SpOrange	VIJyRM2112 (D25447), 2QTEL47	73 kb	242888770
	Xq/Yq Yellow	EST Cdy 16c07 for SYBL1-maps within cosmid C8.2 (GenBank Z43206)	8,5 kb	155215488
	CEP X Aqua	Xp11.1-q11.1 alfa satelit DNK		
mix #3	3p SpGreen	3PTEL25 (D3S4559)	184 kb	368406
	3q SpOrange	3QTEL05 (D3S4560)	96 kb	197037915
	22q Yellow	MS607 (GenBank X58044)	96 kb	51174589
	LSI bcr 22q11 Aqua	LSI BCR 22q11		
mix #4	4p SpGreen	GS10K2/T7, 4p02 (D4S3359, GDB: 6244599)	143 kb	230387
	4q SpOrange	AFM A224XH1 (D4S2930)	147 kb	190196310
	21q Yellow	VIJyRM2029	176 kb	48108188
	LSI AML 21q22 Aqua	LSI AML 21q22		
mix #5	5p SpGreen	C84c11/T3	210 kb	560466
	5q SpOrange	GS35o8/T7, 5QTEL70 (D5S2907)	114 kb	180694015
mix #6	6p SpGreen	6PTEL48	82 kb	240069
	6q SpOrange	VIJyRM2158	105 kb	170886082
	13q Yellow	VIJyRM2002 (D13S327)	80 kb	115058299
	LSI 13q14 Aqua	LSI 13q14		
mix #7	7p SpGreen	VIJyRM2185 (GenBank G31341)	69 kb	162450
	7q SpOrange	VIJyRM2000 (GenBank G31340)	99 kb	158958164
	14q Yellow	D14S1420	109 kb	107268415
	LSI TCR 14q11.2 Aqua			
mix #8	8p SpGreen	AFM 197XG5 (D8S504, GDB: 199153)	160 kb	1141058
	8q SpOrange	VIJyRM2053	97 kb	146168433
	17p Yellow	282M16/SP6	84 kb	136647
	CEP 17 Aqua	17p11.1-q11.1 alfa satelit DNK		
mix #9	9p SpGreen	305J7-T7	114 kb	346205
	9q SpOrange	VIJyRM2241 (D9S325)	106 kb	140998174
	17q Yellow	D17S928 (GenBank Z23646)	161 kb	80297642
	CEP 17 Aqua	17p11.1-q11.1 alfa satelit DNK		
mix #10	10p SpGreen	10PTEL006 (GenBank Z96139)	83 kb	344930
	10q SpOrange	D10S2290	116 kb	135222302
	15q Yellow	WI-5214 (D15S936); GenBank-G04801	107 kb	102204518
	LSI PML 15q22 Aqua	LSI PML 15q22		

Nadaljevanje tabele

mix #11	11p SpGreen	D11S2071 (GenBank U12896)	121 kb	139814
	11q SpOrange	D11S1037	153 kb	134796214
	18p Yellow	VIJyRM2102 (D18S552)	165 kb	305567
	CEP 18 Aqua	18p11.1-q11.1 alfa satelit DNK		
mix #12	12p SpGreen	8M16/SP6	102 kb	415458
	12q SpOrange	VIJyRM2196	164 kb	133762815
	18q Yellow	VIJyRM2050, 18QTEL11, STSG193, AFM254VD5, CU18-010L/CU18-010R, STS-F04195, TIGR-A008P37, STSG52963	187 kb	77904682
	CEP 18 Aqua	18p11.1-q11.1 alfa satelit DNK		
mix #13	16p SpGreen	16PTEL05, STSG608831; STSG608938	142 kb	245973
	16q SpOrange	16QTEL013 (GenBank Z96319)	123 kb	90165604
mix #14	19p SpGreen	129F16/SP6	90kb	379833
	19q SpOrange	D19S238E	193 kb	58954260
	LSI 19p13 Aqua			
mix #15	20p SpGreen	20PTEL18 (D20S1157)	164 kb	258227
	20q SpOrange	20QTEL14	163 kb	62922616

Legenda: Spectrum Green- »spektralno zelena«, Spectrum orange- »spektralno oranžna« (43).