

Прегледни рад

## ПРИМЈЕНА ЕРЕЈ КОМПАРАТИВНЕ ГЕНОМСКЕ ХИБРИДИЗАЦИЈЕ У МЕДИЦИНСКОЈ ГЕНЕТИЦИ

Вања Томић<sup>1</sup>, Стојко Видовић<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Педагошки факултет Бијељина, Универзитет у Источном Сарајеву, Семберских ратара  
66,76300 Бијељина

<sup>2</sup>Департман за хуману генетику, Медицински факултет, Универзитет у Бања Луци, Саве  
Мркаља 14, 78000 Бања Лука

### Abstract

**TOMIĆ Vanja, S. VIDOVIĆ: IMPLEMENTATION OF ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION IN MEDICAL GENETICS.** [<sup>1</sup>Teacher's Training Faculty, University of East Sarajevo; <sup>2</sup>Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Banja Luka]

Array comparative genomic hybridization (aCGH) is a significant advancement in the technology which enables the detection of chromosomal rearrangements that are too small to be detected by microscopic examination. Array CGH allows the detection of CNVs at high resolution of 5-10 kilobases. The principle of the method is based on comparison of the whole genome of the reference sample with the sample which needs to be examined (patient). The samples are labeled with different fluorescent dyes and are used as probes which cohybridize with the targeted oligonucleotides on the silicone slide. With appropriate design of oligonucleotide probes, which can be targeted on specific regions of chromosomes or across the entire genome, it is possible to detect imbalances in the microscopic and submicroscopic chromosomal rearrangements which include deletions, duplications, aneuploidy, marker chromosome and loss of heterozygosity. Analysis of the results is performed on *Agilent 2.0 genomic software* which enables the detection of the base pairs at the beginning and at the end of mutations, chromosomal regions, the number of probes, the size of the aberrations, and which genes are affected by mutations. Array CGH is not able to detect balanced chromosomal rearrangements, as well as whether the mutation is inherited from parents or it occurs *de novo*. Previous studies have shown that detection of chromosome aberrations of aCGH varies between 28% and 45%, and 19% higher detection than it can be detected by the conventional method of GTG bands. Implementation of this method in medical diagnostics provides better genetic analysis of patients with a diagnosis of autism, developmental delay, epilepsy, congenital anomalies of various types, facial dysmorphic features, the appearance of balanced hereditary or *de novo* rearrangements in a phenotypically-normal persons.

**Key words:** array comparative genomic hybridization, unbalanced chromosomal rearrangements

### Сажетак

Ереј компаративна геномска хибридизација (aCGH) је значајан напредак у технологији који омогућава детекцију хромозомских реаранжмана који су сувише мали да би се детектовали микроскопским прегледом. Примјеном методе aCGH омогућава се детекција варијација у броју копија које представљају структурне промјене у ДНК на високој резолуцији од 5-10 килобаза. Принцип рада ове методе заснива се на компарацији читавог генома референтног узорка са узорком пацијента. Са одговарајућим дизајном олигонуклеотидних проба које се могу постављати циљано на одређене регионе хромозома или дуж читавог генома, могуће је дијагностификовати небалансиране микроскопске и субмикроскопске хромозомске реаранжмане који обухватају

делеције, дупликације, анеуплоидије, маркер хромозом, те губитак хетерозиготности. Анализа резултата ради се на *Agilent 2.0 genomic software*-у који је у могућности да детектује базне парове на почетку и крају мутације, регионе хромозома, број проба, величину аберације, те који гени су захваћени мутацијама. Недостатак аCGH је у томе што није у могућности да детектује балансиране хромозомске реаранжмане, те да ли су мутације наслеђене од родитеља или су настале *de novo*. Досадашња истраживања су показала да детекција хромозомских аберација варира између 15% и 20%, те око 19% више детекција него што се може детектовати класичном методом GTG трака. Примјеном ове методе у медицинској дијагностици омогућава се боља генетичка анализа код пацијената са дијагнозом аутизама, застоја у развоју, епилепсијом, конгениталним аномалијама различитог типа, фацијалним дисморфизмом, на изглед балансираним наследним или де ново реаранжманима код фенотипски нормланих особа.

**Кључне ријечи:** ереј компаративна геномска хибридизација, небалансирани хромозомски реаранжмани.

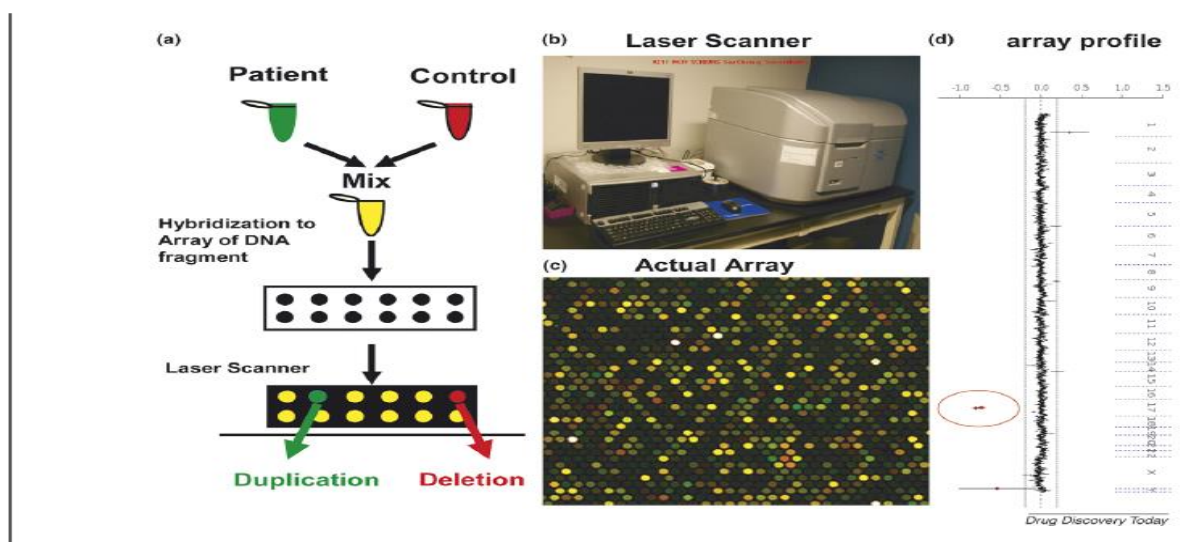
## УВОД

Ереј компаративна геномска хибридизација (аgгау CGH) представља значајан технолошки напредак у области генетике која је тек у скорије вријеме нашла примјену у лабораторијама за клиничку дијагностику. Ова методологија је иницијално имала примјену у научно-истраживачке сврхе, примарно у пољу истраживања генетских аберација карцинома. Аgгау CGH базира се на истом принципу као и традиционални метафазни CGH. У обе технике, укупна геномска ДНК референтног узорка и ДНК пацијента обиљежавају се различитим флуоресцентним бојама и користе се као пробе које хибридизују са циљаним нуклеинским киселинама на силиконској плочици. У аgгау CGH-у циљане нуклеинске киселине могу бити олигонуклеотиди, сDNK, или геномски фрагменти који су клонирани у векторима као што су плазмиди, козмиди или бактеријски артифицијални хромозоми (BAC). Резолуција аgгау-а зависи од величине циљаних нуклеинских киселина и густине којом је покривен геном. Анеуплоидије хромозома и структурне аберације (делеције, дупликације, инверзије, транслокације) предстаљају један од узрока менталних ретардација, конгениталних аномалија, аутизма, дисморфизма и спонтаних побачаја. Конвенционална метода цитогенетике (GTG) трака користи се дуго у методологији дијагностификовања ових аберација (Bartnik et al, 2014). Међутим, рутинска анализа кариотипа није довољно сензитивна метода која би омогућила детекцију аберација на резолуцији мањој од 4 Мб (мега базе). Примјена флуоресцентне *in situ* хибридизације (FISH) омогућила је прецизнију дијагностику и до скоро је била примарна метода која се користила у сврху детекције хромозомских реаранжмана. Предност аgгау CGH-а у односу на FISH базира се на могућности ереја да детектује варијације у броју копија (CNVS) на мултиплим локусима у геному. Варијације у броју копија које се могу детектовати ерејем укључују делеције, дупликације, анеуплоидије, губитак хетерозиготности, унипаренталну дизомију, те маркер хромозом. Недостатак аgгау CGH-а огледа се у немогућности детекције балансираних структурних реаранжмана, тачкастих мутација, те да ли су наслеђене или су настале *de novo*. С друге стране, FISH технологија на метафазним или интерфазним ћелијама лимитарана је бројем проба које се симултано могу користити. Такође, примјена FISH-а захтјева прецизнију клиничку дијагнозу потенцијалних локуса у геному на којима је дошло до структурних промјена (Shinaw 2008). Досадашња истраживања показала су да детекција варијација у броју копија

примјеном arraу-а варира између 15% и 20%, те 19% више него што се може детектовати класичним методама цитогенетике (Miller et al, 2010).

### Методологија Array CGH-а

Код arraу CGH-а једнаке количине обиљежене геномске ДНК пацијента и референтног узорка кохибридизују на силиконску плочицу или чип који садржи нуклеинске киселине. У неким лабораторијима као контроле користе се комерцијално доступне ДНК секвенце мушкараца и жена или се могу користити ДНК узорци здравих особа из опште популације. Геномска ДНК пацијента и контроле различито се обиљежавају са Cyanine 3 (Cy3) и Cyanine (Cy5), (Слика 1). Хибридизација репетативних секвенци може бити блокирана додавањем Cot-1 ДНК. Пробе које се налазе на силиконској плочици или чипу су дијелови хумане геномске ДНК у форми бактеријског артифицијалног хромозома (BACs), P1 (PAC) клонова величине од 75 до 200 кб, мали инсерти клонова као што су козмиди величине 30-40 кб или олигонуклеотиди. Геномска резолуција arraу CGH платформи је детерминисана размаком и дужином ДНК проба (Cheung et al, 2006). Већина клинички доступних arraу CGH платформи су циљани микроереји који су дизајнирани да детектују анеуплоидије, микроделеције и микродупликације или друге небалансиране реаранжмане. Постоје платформе које су дизајниране да покривају комплетан геном на начин да су равномјерно распоређене дуж генома по принципу један клон по мегабази или један клон на 100 кб. Пробе које су комерцијално доступне, а које покривају комплетан геном су олигонуклеотидни ереји на којима су пробе рапоређене на сваких 6 кб (Shinawi, 2008). Најчешћи дизајн проба који се користи у лабораторијама је SurePrint G3 Custom CGH+SNP Microarray 4x180k који садржи 120 000 CGH проба, а обрада података врши се се на *Agilent 2.0 genomic software*-у (Redon & Carter, 2010).



**Слика 1.** Принцип arraу CGH технологије. Узорци пацијента и контроле се обиљежавају различитим флуоресцентним бојама, те хибридизују на силиконској плочици или чипу која садржи нуклеинске киселине (Shinawi, 2008).

## Предности и недостаци примјене CGH-а у медицинској дијагностици

Боља резолуција и прецизније мапирање аберација једна је од главних предности ереја у односу на друге цитогенетичке методе. Такође, култивација ћелија није неопходна, што знатно доприноси уштеди времена приликом саме дијагностике. Већина доступних ереј платформи које се користе у дијагностици, захтијевају свега неколико микрограма геномске ДНК, те пробе које се амплификују дуж читавог генома дају могућност детекције небалансираних аберација за које се сматрало да нису клинички значајне. Array CGH-ом могу се детектовати дупликације које не могу бити детектоване метафазним или интерфазним FISH анализама. Студије су показале да се array CGH-ом детектује мозаицизам који није видљив цитогенетичком анализом (Ballif et al, 2006). Међутим, као и код других дијагностичких метода постоје лимити и код array CGH-а. Примјеном ове методологије није могуће детектовати балансиране реаранжмане као што су транслокације или инверзије, као ни полиплоидије, те да ли су аберације наслеђене од родитеља или су настале *de novo*. Такође, примјена платформи које покривају комплетан геном на високој резолуцији су веома скупе, те врло често детектују небалансиране аберације које нису клинички разјашњене (Park et al, 2011).

### Дијагностичке апликације

У посљедњих неколико година примјена array CGH-а у постнаталној дијагностици показала се као врло ефикасна. Многе студије потврдиле су тачност, ефикасност и прецизност дијагностике када су у питању небалансиране аберације хромозома. Array CGH у постнаталној дијагностици омогућава прецизну дијагнозу, карактеризацију синдрома, корелацију генотипа и фенотипа, превенцију и прогнозу болести. Тачне дијагнозе врло често изостану код пацијената са застојем у развоју (DD/ID) и менталним ретардацијама (MR) који чине 1-3% свјетске популације, а за њих је карактеристична смањена когнитивна и адаптивна функција (Flint et al, 2003). Када су DD/ID повезане са мултиплим конениталним аномалијама, као најчешћи узрок болести сматрају се аберације хромозома. Етиологија ових болести је хетерогена и прозрокована како са генетским факторима тако и факторима околине (Bartnik et al, 2014). Термин застој у развоју обично се употребљава када је ријеч о пацијентима млађим од 5 година, док се термин ментална ретардација користи уколико је IQ мањи од 70, што значи да се већина оваквих дијагноза постави у раној младости. Дијагноза се базира на моторном, говорном, когнитивном и социјалном застоју (Uwineza et al, 2014). Стопа детекције DD/ID и MR примјеном FISH-а варира између 2.5–7% (Ravnan et al, 2006), што сугерише да би примјена технологија са већом резолуцијом потенцијално побољшала стопу детекције. Иницијалне студије у којима је коришћен array CGH код пацијената са необјашњеном менталном ретардацијом и кариотипом интерпретираним као нормалним, стопа детекције CNVS износи око 15%. Од 54 пацијента који су селектовани према клиничким критеријумима, молекуларним и цитогенетичким подацима дијагностификовани су структурни реаранжмани код 26 пацијената (48%) (Iourov et al, 2015), док се код 15 пацијената (28%) CNVs показале као клинички релевантне. Када је ријеч о конгениталним аномалијама (Uwineza et al, 2014), од 50 пацијената, клинички значајне варијације у броју копија детектоване су код 13 пацијената (26%). Величина CNVs варирала је између 0,9 Мб до 34 Мб. Такође, истраживања на узорку од 318 пацијената са дијагнозама менталних ретардација и мултиплих конгениталних аномалија, описане су потенцијалне патолошке CNVs код 52

пацијента (16,4%) величине 0,25 до 15 Мб (Gijsbers et al, 2009), те 4 губитка хетерозиготности величине 200 кб до 15 Мб, који се често јављају и у здоровој популацији.

## ЗАКЉУЧАК

Имплементација arraу CGH-а као ефективнијег и свеобухватнијег дијагностичког алата, значајно је побољшала детекцију CNVs. Посебан допринос у дијагностици се огледа код пацијената са аутизмом, мултиплим конгениталним аномалијама, фацијалним дисморфизмима, застојем у развоју, те менталним ретардацијама. Дobar дизајн платформи, односно ДНК проба, које су и комерцијално доступне, омогућава детекцију до 20% аберација хромозома које се примјеном досадашњих метода цитогенетике нису могле дијагностификовати. Увођењем ове методе у добру клиничку праксу, поред постојећих апликативних метода, омогућава се прецизнија дијагноза генетичких поремећаја, те боља карактеризација синдрома, што представља посебан значај код ријетких наслеђених болести.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ballif, B.C. et al. (2006). Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 2757–2767.
2. Bartnik, M., Nowakowska, B., Derwińska, K., Wiśniowiecka-Kowalnik, B., Kędzior, M., Bernaciak, J., Bezniakow, N. (2014). Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *J Appl Genetics*, 55:125–144.
3. Cheung, S.W. et al. (2006). Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am. J. Med. Genet. A* 143,1679–1686.
4. Flint, J., & Knight, S. (2003). The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 310–316.
5. Gijsber, A., Lew, J., Bosch, C., Schuurs-Hoeijmakers, J., Haeringen, A., & Ruivenkamp, C. (2009). A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: Test arrays first. *European Journal of Human Genetics*, 1394 – 1402.
6. Iourov, I., Vorsanova, S., Kurinnaia, O., & Zelenova, M. (2012). Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalie. *Molecular Cytogenetics*, 5:46-5:46.
7. Miller, D., Adam, M., Aradhya, S., & Ledbetter, D. (2010). Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalie. *The American Journal of Human Genetics*, 749–764-749–764.
8. Park, S., Jung, E., Ryu, R., Kang, H., & Ko, J. (2011). Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular Cytogenetics*, 4-12.
9. Ravnan, J.B. et al. (2006). Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of B the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J. Med. Genet.* 43, 478–489.

10. Redon, R., & Carter, N. (2009). Comparative Genomic Hybridization: Microarray design and data interpretation. *Methods Mol Biol*, 37–49.
11. Shinawi, M., & Cheung, S. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today*, 13, 760-770.
12. Uwineza, A., Caberg, J., Hitayezu, J., Hellin, A., Jamar, M., & Dideberg, V. (2014). Array-CGH analysis in Rwandan patients presenting development delay/intellectual disability with multiple congenital anomalies. *Medical Genetics*, 15:79.

Примљено: 14. 10. 2015.

Одобрено: 28. 04. 2016.