

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena J. Ruml Stojanović

**KARAKTERIZACIJA GENETIČKE OSNOVE
ZAOSTAJANJA U RAZVOJU I
INTELEKTUALNIH POTEŠKOĆA KOD DECE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jelena J. Ruml Stojanović

**A CHARACTERISATION OF THE GENETIC
BASIS OF DEVELOPMENTAL DELAY AND
INTELLECTUAL DISABILITY IN CHILDREN**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020.

Mentor:

Doc. dr Goran Čuturilo, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Prof. dr Ivana Novaković, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. **Doc. dr Dragana Bogićević**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. **Prof. dr Ivana Kavečan**, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

3. **Doc. dr Nela Maksimović**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zrinki i Jovanu

ZAHVALNICA

Hvala svim kolegama iz Službe kliničke genetike Univerzitetske dečje klinike, a posebno doc. dr Goranu Čuturilu na ukazanom poverenju i korisnim savetima prilikom izrade disertacije. Hvala prof. dr Ivani Novaković i celom timu Laboratorije za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja, Klinike za neurologiju, KCS, na nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja kao i dugogodišnjoj uspešnoj saradnji. Hvala pacijentima i njihovim porodicama na učešću u istraživanju.

Hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci i strpljenju.

Razvoj citogenetičkih tehnika pedesetih godina prošlog veka omogućio je da se 1959. godine prvi put postavi genetička dijagnoza kod pacijenta sa Daunovim sindromom. Od tada pa do danas, razvijen je veliki broj metodoloških pristupa za analizu hromozomskih i genskih promena koje leže u osnovi zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća. Otkriveno je preko sedamsto gena i veliki broj hromozomskih aberacija koje se nalaze u osnovi ovih entiteta. Zbog izrazite genetičke, ali i kliničke heterogenosti, često je potrebno mnogo vremena pre nego što se pacijentu postavi dijagnoza. Pored očiglednih benefita kao što su primena specifične terapije, prevencija očekivanih komplikacija ili reproduktivno planiranje, postavljanje dijagnoze omogućava pacijentima i njihovim porodicama da lakše prihvate bolest, kao i da donesu bolje odluke u oblasti edukacije, profesionalne orijentacije i socijalnih integracija.

Ova disertacija u svojoj osnovi ima analizu korelacije kliničkih parametara sa promenama u broju kopija sa jedne strane i genskim alteracijama sa druge strane kod dece sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama. Glavni cilj je formiranje dijagnostičkog algoritma genetičkih testiranja koji bi omogućio brže postavljanje genetičke dijagnoze i time unapredio ukupan kvalitet zdravstvenog zbrinjavanja ove dece i njihovih porodica.

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA GENETIČKE OSNOVE ZAOSTAJANJA U RAZVOJU I INTELEKTUALNIH POTEŠKOĆA KOD DECE

Uvod: Zaostajanje u razvoju i intelektualne poteškoće se u opštoj populaciji sreću sa učestalošću od 1-3% i predstavljaju najčešću indikaciju za upućivanje deteta kliničkom genetičaru. Mogu se javiti kao izolovan entitet ili zajedno sa urođenim anomalijama, neurološkim problemima i/ili autizmom ili drugim poremećajima. Genetički uzroci zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća uključuju širok spektar promena, od numeričkih i strukturnih hromozomskih aberacija, preko promena u broju kopija u genomu do mnogobrojnih genskih varijanti po tipu autozomno-dominantnih, autozomno-recesivnih, X-vezanih pa i mitohondrijskih alteracija. Uticaj ovih promena je veći što je teža klinička slika. Zbog izrazite genetičke heterogenosti ovih bolesti mnogo pacijenata prolazi kroz takozvanu dijagnostičku odiseju koja se odnosi na veliki broj urađenih genetičkih i drugih dijagnostičkih testova pre nego što se postavi dijagnoza. Otkrivanje genetičkog uzroka bolesti između ostalog omogućava uvid u prognozu bolesti, primenu specifične terapije, prevenciju očekivanih komplikacija i informisanje pacijenata o genetičkom aspektu planiranja porodice. Prema trenutno važećim preporukama za pacijente sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, urođenim anomalijama, i bolestima iz spektra autizma prvi test izbora je analiza molekularnog kariotipa. Novije studije ukazuju da se sekvenciranjem celog egzoma/genoma, kao prvim testom, mogu uspešno ispitivati deca sa suspektnim genetičkim bolestima, uključujući tu i zaostajanje u razvoju i intelektualne poteškoće. Konkretno i zvanične preporuke i smernice za upotrebu metoda sekvenciranja nove generacije za navedenu indikaciju još uvek ne postoje.

Cilj: Ovo istraživanje je imalo za cilj utvrđivanje uzročnih varijanti, njihovog tipa i učestalosti kod dece sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama, kao i ispitivanje korelacije genotipa i fenotipa. Na osnovu dobijenih rezultata planirano je kreiranje dijagnostičkog algoritma za primenu različitih genetičkih metoda u zavisnosti od kliničkih karakteristika pacijenta.

Materijal i metode: U ovo ispitivanje je uključeno 220 pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama. Promene u broju kopija u genomu su analizirane MLPA metodom i metodom molekularnog kariotipa. Genske varijante su analizirane metodom sekvenciranja nove generacije (NGS), korišćenjem panela „klinički egzom“. Za statističku obradu podataka korišćeni su Pirsonov hi-kvadrat test i Fišerov test tačne verovatnoće.

Rezultati: MLPA metodom je identifikovana patogena varijanta u broju kopija kod 11 pacijenata čime je postignuta dijagnostička moć od 10%. Analizom molekularnog kariotipa je identifikovana patogena/verovatno patogena varijanta kod 29 pacijenata čime je postignuta dijagnostička moć od 26,4%. Analizom panela “klinički egzom” je identifikovano 55 patogenih/verovatno patogenih varijanti kod 48 pacijenata čime je postignuta dijagnostička moć od 43,6%. Ispitivanjem korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa utvrđeno je da je patološki nalaz molekularnog kariotipa u korelaciji sa prisustvom multiplih *major* mana i mikrocefalijom. Ispitivanjem korelacije kliničkih parametara i rezultata analize „kliničkog egzoma“ utvrđeno je da je patološki nalaz sekvenciranja „kliničkog egzoma“ u korelaciji sa prisustvom jedne *major* mane.

Zaključak: Ukupno, u našoj studiji je postavljena genetička dijagnoza kod 79 od 220 ispitanika (35,9%). Identifikovano je 37 genskih varijanti koje prethodno nisu opisane u literaturi i četiri retke promene u broju kopija. Sve genske varijante su unesene u javno dostupnu ClinVar bazu. Formiran je dijagnostički algoritam za genetičko testiranje pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama.

Ključne reči: zaostajanje u razvoju, intelektualne poteškoće, MLPA, molekularni kariotip, „klinički egzom“, sekvenciranje nove generacije, dijagnostički algoritam

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

SUMMARY

A CHARACTERISATION OF THE GENETIC BASIS OF DEVELOPMENTAL DELAY AND INTELLECTUAL DISABILITY IN CHILDREN

Introduction: Developmental delay and intellectual disability have a prevalence of 1-3% in general population and represent the most common reasons for referral to clinical geneticist. They can occur as an isolated phenotype or can be associated with congenital anomalies, neurological problems and/or autism or other clinical symptoms. Genetic causes of developmental delay and intellectual disability include wide range of changes, namely numerical and structural chromosomal aberrations, variations in copy number within the genome, as well as number of gene variants which include autosomal-dominant, X-linked, autosomal-recessive and mitochondrial alterations. The effects of these changes increase with the severity of phenotypic presentation. Due to the extreme genetic heterogeneity that characterizes these diseases, many patients undergo a diagnostic odyssey involving numerous genetic and other diagnostic tests before making a diagnosis. Finding out the genetic cause of the disease helps with the prognosis and enables application of specific therapy, prevention of expected complications and better understanding about the genetic aspects of family planning. Chromosomal microarray is considered as a first-tier clinical diagnostic test for children with developmental delay/intellectual disability, multiple congenital anomalies and autism spectrum disorder. Recent studies have shown that whole exome/genome sequencing, as a first-tier test can be used successfully for diagnostics in children with suspected genetic diseases, including those with developmental delay and intellectual disability. Official guidelines and recommendations for the next generation sequencing testing for listed indication are still lacking.

Aim: The aim of the present study was to determine the causative variants, their type and frequency in children with moderate and severe developmental delay/intellectual disability as well as genotype-phenotype correlations. Based on the acquired results, the aim was to create a diagnostic algorithm for applying different genetic methods according to the patient's clinical characteristics.

Material and methods: This study comprised 220 patients with moderate and severe developmental delay and intellectual disability. Copy number variations within the genome were analysed with MLPA and microarray methodology. Gene variants were analysed using next generation sequencing (NGS), with targeted „clinical exome“ panel. Statistical analysis was performed using Pearson Chi-square and Fisher's Exact tests.

Results: MLPA revealed presence of pathogenic copy number variants in 11 patients achieving diagnostic yield of 10%. Microarray analysis revealed presence of pathogenic/likely pathogenic variants in 29 patients achieving diagnostic yield of 26,4%. Sequencing of “clinical exome” revealed presence of 55 pathogenic/likely pathogenic variants in 48 patients achieving diagnostic yield of 43,6%. Correlation analysis of clinical parameters and microarray results showed correlation between the pathological microarray results and multiple major anomalies and microcephaly. On the other hand, correlation analysis of clinical parameters and “clinical exome” sequencing results showed correlation between the pathological results of “clinical exome” and one major anomaly.

Conclusion: Overall, the present study achieved the diagnosis of 79 out of 220 patients (35,9%). Thirty-seven novel gene variants and four rare copy number variants were identified. All gene variants were shared through publicly available ClinVar database. A diagnostic algorithm for genetic testing of patients with moderate and severe developmental delay and intellectual disability is proposed.

Keywords: developmental delay, intellectual disability, MLPA, microarray analysis, „clinical exome“, next generation sequencing, diagnostic algorithm

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Molecular medicine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Inteligencija i rani razvoj	1
1.1.1. Definicija inteligencije.....	1
1.1.2. Rani razvoj.....	1
1.2. Definicije i klasifikacija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća	3
1.2.1. Zaostajanje u razvoju.....	4
1.2.2. Intelektualne poteškoće	5
1.2.3. Klasifikacija.....	5
1.3. Etiologija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća	6
1.3.1. Genetički faktori	6
1.3.2. Negenetički faktori	11
1.3.3. Patofiziologija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća.....	12
1.3.4. Somatske varijante, nekodirajuće varijante i kompleksno nasleđivanje.....	16
1.4. Detekcija delecija i duplikacija kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama	18
1.4.1. Kariotip	18
1.4.2. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH).....	18
1.4.3. Višestruko umnožavanje proba zavisno od ligacije (MLPA).....	19
1.4.4. Molekularni kariotip	20
1.5. Detekcija genskih varijanti kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama.....	22
1.5.1. Genski paneli	23
1.5.2. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“	25
1.5.3. Sekvenciranje celog egzoma.....	26
1.5.4. Sekvenciranje celog genoma	27
1.6. Značaj postavljanja uzročne dijagnoze	28
1.7. Specifična terapija neurorazvojnih bolesti.....	29
1.8. Preklapanje fenotipa neurorazvojnih bolesti.....	32

1.9. Preporuke i vodiči za testiranje pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama.....	34
2. CILJEVI RADA.....	37
3. MATERIJAL I METODE.....	38
3.1. Ispitanici.....	38
3.1.1. Odabir pacijenata i saglasnost za učešće u istraživanju.....	38
3.1.2. Biološki materijal.....	39
3.2. Metode.....	40
3.2.1. Kliničko ispitivanje.....	40
3.2.2. Izolacija genomske DNK.....	41
3.2.3. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK.....	41
3.2.4. Višestruko umnožavanje proba zavisno od ligacije (MLPA).....	42
3.2.5. Molekularni kariotip.....	47
3.2.6. Klasifikacija promena u broju kopija u genomu.....	48
3.2.7. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“.....	50
3.2.8. Klasifikacija genskih varijanti.....	53
3.2.9. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH).....	54
3.2.10. Baze podataka.....	55
3.3. Statistička analiza podataka.....	55
4. REZULTATI.....	57
4.1. Demografska i klinička evaluacija ispitanika.....	57
4.2. Rezultati MLPA analize.....	57
4.2.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije.....	57
4.2.2. Prikaz pacijenta br. 13.....	60
4.2.3. Prikaz pacijenta br. 33.....	60
4.2.4. Stopa detekcije MLPA analize.....	61
4.3. Rezultati analize molekularnog kariotipa.....	62
4.3.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije.....	62
4.3.2. Prikaz pacijenta br. 129.....	66
4.3.3. Prikaz pacijenta br. 111.....	69

4.3.4. Analiza korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa	70
4.4. Rezultati sekvenciranja „kliničkog egzoma“	75
4.4.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije.....	75
4.4.2. Analiza korelacije kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“	85
5. DISKUSIJA	90
6. ZAKLJUČCI	115
7. LITERATURA	117

1. UVOD

1.1. Inteligencija i rani razvoj

1.1.1. Definicija inteligencije

Ne postoji jedinstvena definicija inteligencije. Sa namerom da naprave sveobuhvatnu definiciju, Legg i Hutter (Legg and Hutter, 2006) su iz literature prikupili 70 najcitiranijih definicija inteligencije, uključujući one koje su pronašli u medicinskim rečnicima i koje su dali psiholozi i naučnici koje se bave veštačkom inteligencijom. Zaključili su da većina definicija na drugačiji način formuliše istu ideju, i da bi definicija inteligencije trebalo da uključi tri aspekta:

- Sposobnosti koje osoba ispoljava prilikom interakcije sa sredinom
- Uspešnost u izvršavanju ciljeva i zadataka
- Sposobnost adaptacije u različitim situacijama i sredinama

Iz ove tri osnovne komponente inteligencije proizašla je neformalna definicija po kojoj je inteligencija mera sposobnosti osobe da postigne ciljeve u najrazličitijim okruženjima (Legg and Hutter, 2006). Osobine kao što su sposobnost učenja, adaptacije i razumevanja su sadržane u ovoj definiciji s obzirom da su neophodne za postizanje uspeha u najrazličitijim situacijama i sredinama.

1.1.2. Rani razvoj

Razvoj deteta je interaktivni proces sazrevanja, koji rezultuje napretkom motornih, kognitivnih, jezičkih, socio-emocionalnih sposobnosti, kao i sposobnosti za brigu o sebi (McDonald Culp, 2010). Razvoj napreduje kroz seriju miljokaza ili koraka i obično podrazumeva usavršavanje jednostavnijih veština pre učenja složenijih (Walker *et al.*, 2007).

Multipli faktori utiču na postizanje razvojnog potencijala, uključujući telesno zdravlje, ishranu, odgovarajuću negu, odsustvo zanemarivanja i zlostavljanja i rano učenje.

Svi oni interaguju jedan sa drugim i međusobno podstiču proces razvoja, a u njihovoj osnovi su bi-direkcionalne interakcije inicirane od strane deteta ili staratelja, podržane sredinom (Black *et al.*, 2017). Odgovarajuća nega se pre svega odnosi na kućno okruženje koje podržava zdravlje deteta i pravilnu ishranu, na emotivnu podršku, ali i razvojnu stimulaciju kroz igru i istraživanja, kao i zaštitu deteta od problematičnih situacija (Black and Aboud, 2011). Pozitivne asocijacije između odgovarajuće nege i zdravlja i rasta i razvoja deteta, demonstrirane su u brojnim studijama i podržane naučnim dokazima (Black *et al.*, 2017). Prve tri godine života su naročito kritičan period za rast i razvoj dečjeg mozga, sa velikim potencijalom da utiču na kasniji socijalni, ekonomski i zdravstveni kvalitet života (Shonkoff *et al.*, 2012). Briga o detetu nadilazi porodice i proteže se na čitavu zajednicu i podršku koju porodice dobijaju od nje (Bhutta *et al.*, 2014).

Značaj ranih fizičkih, socio-emocionalnih, kognitivnih i motoričkih razvojnih intervencija za rani razvoj je pokazan je u brojnim studijama (Daelmans *et al.*, 2015; Peacock-Chambers *et al.*, 2017; Lucas *et al.*, 2018; Edmond *et al.*, 2019). Za razvoj dece do treće godine naročito su značajne intervencije koje podstiču interakciju između deteta i okoline, posebno roditelja, kao i specifična ponašanja roditelja kao što je čitanje, pravilno i dosledno vaspitanje i trening spavanja (Peacock-Chambers *et al.*, 2017). Osim porodice, veliki značaj u podsticanju razvoja ima i primarna zdravstvena zaštita koja je zadužena za informisanje roditelja/staratelja o značaju i načinima odgovarajuće brige i stimulacije dece (Hurley *et al.*, 2016; Peacock-Chambers *et al.*, 2017; Vaivada *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2018). Pokazano je da vrlo jednostavne intervencije čak u neonatalnom periodu, kao što su rano dojenje, kontakt kože bebe sa kožom roditelja ili pranje ruku, značajno smanjuju morbiditet i mortalitet dece do pete godine (Edmond *et al.*, 2019). Smatra se da su “zlatni” minuti, sati i dani nakon rođenja, veoma značajni za zdravlje i razvoj odojčeta (Lassi *et al.*, 2010; Lassi *et al.*, 2015; Black *et al.*, 2017).

Postoje brojni dokazi da se u toku ranog razvoja u nervnom sistemu dešavaju velike promene u mijelinizaciji (Shonkoff *et al.*, 2009). Iskustva i stimulacije tokom ranog razvoja aktiviraju određene neurone i neuronske mreže i učvršćuju ih kroz proces mijelinizacije, dok se neuronske mreže koje se ne koriste eliminišu kroz proces koji se naziva sinaptički *pruning*, čime se postiže povećanje efikasnosti neuronalne transmisije (Tierney and Nelson,

2009). Ova plastičnost mozga zasnovana na iskustvu omogućava bebama da se prilagode na različite sredinske uslove (Holtmaat and Svoboda, 2009). U periodu ranog razvoja postoje takozvani senzitivni ili kritični periodi kada su pojedini regioni mozga posebno podložni uticaju različitih iskustava (Britto and Pérez-Escamilla, 2013).

Brojne studije su pokazale da rana životna iskustva utiču i na gensku ekspresiju. Efekat brige roditelja za dete se ostvaruje posredstvom uticaja na epigenetičke faktore kao što su metilacija DNK, posttranslaciona modifikacija histona i male nekodirajuće RNK (Kundakovic and Champagne, 2015). Epigenetičke promene mogu biti permanentne i kao takve se prenositi sa generacije na generaciju (Kanherkar *et al.*, 2014).

Za decu sa poteškoćama, intervencije u periodu ranog razvoja su ključne kako bi ostvarili svoj puni potencijal. Prema internacionalnoj klasifikaciji funkcionisanja, poteškoća i zdravlja Svetske zdravstvene organizacije, poteškoća nije samo biološka ili socijalna, već nastaje u interakciji zdravstvenog stanja i sredinskih i ličnih faktora (*International Classification of Functioning, Disability and Health Children & Youth Version*, 2007). Invaliditet, tj. poteškoća, se može pojaviti na tri nivoa: poremećaj strukture ili funkcije tela, limitirana sposobnost za određenu aktivnost kao što je kretanje ili čitanje, i/ili onemogućena integracija u društvo, kao što je nedostupno školovanje. Dakle, osobe sa invaliditetima uključuju one koji imaju dalekosežne psihičke, mentalne, intelektualne, senzorne ili motoričke poteškoće, koje mogu onemogućiti njihovu punu i efektivnu integraciju u društvo. Neke bolesti koje su asocirane sa invaliditetima se mogu identifikovati prenatalno, druge se identifikuju nakon rođenja ili kasnije u životu, dok neke osobe celog života ostanu bez dijagnoze. Dijagnostičke mogućnosti zavise od mnogo faktora, uključujući prirodu i težinu bolesti, kao i dostupnost ustanova u kojima se dijagnoza može postaviti. (*International Classification of Functioning, Disability and Health Children & Youth Version*, 2007).

1.2. Definicije i klasifikacija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća

Zaostajanje u razvoju i intelektualne poteškoće se u opštoj populaciji sreću sa učestalošću od 1-3% (Moeschler *et al.*, 2014) i predstavljaju najčešću indikaciju za

upućivanje deteta kliničkom genetičaru (Rauch *et al.*, 2006). Mogu se javiti kao izolovan entitet u kom slučaju je u pitanju nesindromski oblik bolesti, ili zajedno sa urođenim anomalijama, neurološkim problemima i/ili autizmom ili drugim poremećajima, kada se radi o sindromskom obliku bolesti. Češće se javljaju kod dečaka u odnosu na devojčice (1,4:1). Zaostajanje u razvoju i intelektualne poteškoće su izrazito klinički i genetički heterogene bolesti. Imaju značajan uticaj na sposobnost adaptacije (engl., *fitness*). U svakom konkretnom slučaju, jačina uticaja na *fitness* će zavisiti od stepena zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća, i prisustva tj. odsustva dodatnih patoloških stanja. Upravo iz ovog razloga, teško zaostajanje se najčešće javlja sporadično dok se blaže forme bolesti češće javljaju familijarno i šire kroz populaciju (Vissers, *et al.* 2016) .

1.2.1. Zaostajanje u razvoju

Značajno zaostajanje u razvoju se definiše kao kašnjenje u usvajanju razvojnih miljkaza u nekom od razvojnih domena (fina i gruba motorika, jezik i govor, socijalne interakcije i društvenost, kognitivne funkcije, sposobnost za obavljanje svakodnevnih radnji), pri čemu je rezultat primenjenog standardizovanog testa za procenu ranog razvoja minimum dve standardne devijacije niži od proseka (Bellman *et al.*, 2013). Značajno zaostajanje u dva ili više razvojna domena kod dece do pete godine je označeno kao globalno zaostajanje u razvoju (Shevell *et al.*, 2003). Zaostajanje može biti i u pojedinačnim domenima, kao što je motoričko zaostajanje ili zaostajanje u jeziku/govoru. Trajni razvojni (motorički ili kognitivni) deficit neće imati sva deca sa zaostajanjem u razvoju, već on može biti i prolazan, npr. tokom perioda duže bolesti (Choo *et al.*, 2019). Teži oblici zaostajanja u razvoju najčešće prethode intelektualnim poteškoćama i prepoznaju se veoma rano (Moeschler *et al.*, 2014).

Na prognozu bolesti kod dece sa zaostajanjem u razvoju mogu uticati brojni faktori, uključujući etiologiju bolesti, oblast u kojoj dete zaostaje, uzrast u kome je izvršena intervencija, kao i stepen angažovanosti roditelja/staratelja (Choo *et al.*, 2019). U slučaju kasnog postavljanja dijagnoze zaostajanja u razvoju, gubi se mogućnost ranih intervencija, što rezultuje u problemima u učenju i ponašanju, kao i funkcionalnim nedostacima kasnije

u životu (Shevell *et al.*, 2005). Mnoge studije su pokazale da rana identifikacija zaostajanja u razvoju i rana intervencija mogu imati dalekosežan pozitivan uticaj na razvoj i krajnja postignuća (Scherzer *et al.*, 2012). Ključnu ulogu u ranoj identifikaciji zaostajanja u razvoju ima primarna zdravstvena zaštita (Choo *et al.*, 2019).

1.2.2. Intelektualne poteškoće

Zaključak o postojanju intelektualnih poteškoća se ne može doneti samo na osnovu koeficijenta inteligencije (engl., *intelligence quotient*, IQ), već se intelektualne poteškoće definišu kao značajna intelektualna ograničenja ($IQ < 70$) praćena poteškoćama u adaptivnom ponašanju, koja se javljaju pre 18 godine (Schalock *et al.*, 2007). Stoga, dijagnoza se postavlja kod dece koja su starija od pet godina, s obzirom na to da za decu mlađu od tog uzrasta ne postoje odgovarajući testovi za određivanje koeficijenta inteligencije (Shevell *et al.*, 2003). Termin intelektualne poteškoće je zamenio do skoro korišćeni izraz “mentalna retardacija” kako bi se izbegla stigmatizacija obolelih osoba (Carey, 2011).

1.2.3. Klasifikacija

Svetska zdravstvena organizacija (Carulla *et al.*, 2011) prepoznaje četiri kategorije intelektualnih poteškoća u odnosu na stepen zaostajanja:

- Laka duševna zaostalost (IQ 50-69).

U odraslom životnom dobu duševni razvoj odgovara uzrastu od 9 do 12 godina. Najveći broj pacijenata sa intelektualnim poteškoćama je u ovoj kategoriji. Laka duševna zaostalost podrazumeva usporen psihomotorni razvoj, kasnije prohodavanje i kašnjenje u razvoju govora, koji je slabije razumljiv i često preopširan. Mišljenje je konkretno, ispoljavanje emocija otvoreno i direktno. Pamćenje je često očuvano. Osobe sa lakim zaostajanjem najčešće mogu da se brinu o sebi (hranjenje, oblačenje, čuvanje od opštih opasnosti, održavanje higijene,

kontrola sfinktera) i obično pohađaju specijalne škole sa gradivom koje im je prilagođeno. Mogu obavljati jednostavne poslove.

- Srednje teška (umerena) duševna zaostalost (IQ 35-49).

U odraslom životnom dobu duševni razvoj odgovara uzrastu od 6 do 9 godina. Psihomotorni razvoj je upadljivo usporen. Govor je slabo razvijen a kontakt sa okolinom oskudan. Potreban je stalan nadzor i kontrola. Mišljenje je konkretno, pojmovi nejasni, pamćenje redukovano i mehaničko.

- Teška duševna zaostalost (IQ 20-34).

U odraslom životnom dobu duševni razvoj odgovara uzrastu od 3 do 6 godina. Veoma usporen psihomotorni razvoj. Govor je sveden na mali broj razumljivih reči. Osoba je u nemogućnosti da bilo šta nauči vežbom. Neophodna je stalna pomoć i nega.

- Duboka duševna zaostalost (IQ<20).

U odraslom životnom dobu duševni razvoj odgovara uzrastu ispod 3 godine. Osobe sa dubokim zaostajanjem imaju veoma ograničenu, praktično nemoguću samozaštitu, kontrolu sfinktera, komunikaciju i pokretljivost.

1.3. Etiologija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća

1.3.1. Genetički faktori

Genetički faktori imaju veoma značajnu ulogu u nastanku zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća i njihov uticaj je veći što je teža klinička slika. Srednje teške i teške forme bolesti se obično javljaju sporadično, i u najvećoj meri su uzrokovane heterozigotnim *de novo* mutacijama, dok se u osnovi blažih formi zaostajanja nalaze kompleksni modeli nasleđivanja. Evaluacija genetičkog uzroka zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća može biti veoma izazovna zbog izrazite genetičke heterogenosti ovih bolesti. Mnogo pacijenata prolazi kroz takozvanu dijagnostičku odiseju, koja se odnosi na dug put koji pacijenti prođu do postavljanja dijagnoze, te veliki broj urađenih genetičkih i drugih dijagnostičkih testova tokom godina (Vissers *et al.*, 2016).

Genetički uzroci zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća uključuju promene u broju kopija (engl., *copy number variation*, CNV) i genske varijante mnogobrojnih autozomno-dominantnih, X-vezanih i autozomno-recesivnih gena. Autozomno dominantne alteracije su najčešće i nalaze se u osnovi bolesti kod oko 40% pacijenata, promene u broju kopija su zastupljene sa oko 25%, X-vezane recesivne alteracije su zastupljene oko 10% kod dečaka, dok su autozomno recesivne forme nasleđivanja retke u populacijama u kojima nema konsagviniteta. Kumulativna stopa detekcije, primenom svih raspoloživih metodologija, kod pacijenata sa srednje teškim i teškim intelektualnim poteškoćama je 55-70% (Vissers *et al.*, 2016).

- Promene u broju kopija

Hromozomske aberacije su već dugo poznate kao česti uzroci zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća. Aneuploidije koje se mogu identifikovati tradicionalnim citogenetičkim metodama se nalaze u osnovi bolesti kod oko 10% pacijenata (Rauch *et al.*, 2006). Među njima, najčešća je trizomija hromozoma 21 koja predstavlja genetički uzrok Daunovog sindroma i u osnovi je 6-8% intelektualnih poteškoća (Vissers *et al.*, 2016). Druge ređe hromozomske aberacije uključuju trizomiju hromozoma 13 (Patauov sindrom) i trizomiju hromozoma 18 (Edvardsov sindrom). Monozomije bilo kog autozomalnog hromozoma su uglavnom letalne u najranijim stadijumima embrionalnog razvića. Strukturne hromozomske aberacije su raznovrsne a uključuju delecije, duplikacije, inverzije, translokacije i druge kompleksnije alteracije. Velike strukturne aberacije hromozoma su često asocirane sa sindromskim intelektualnim poteškoćama kao u slučaju Volf-Hirshornovog sindroma (delecija 4p) ili sindroma mačjeg plača (delecija 5p). Aberacije koje su manje od 5-10Mb, dakle one koje se ne mogu identifikovati na svetlosnom mikroskopu, se obično nazivaju promenama u broju kopija, a podrazumevaju mikrodelecije i mikroduplikacije koje su veće od 1Kb (Rehm *et al.*, 2013). Veliki broj malih promena u broju kopija je identifikovan kod zdravih osoba. Takve varijante su obično manje od 5Kb i ne sadrže značajne gene (Park *et al.*, 2019). Do danas je identifikovan i veliki broj promena u broju kopija koje su asocirane sa sindromskim intelektualnim poteškoćama u okviru mikrodelecionih i mikroduplikacionih sindroma

(Nevado *et al.*, 2014). S obzirom da CNV obično rezultuju u promeni doze većeg broja gena, ovi sindromi se još nazivaju i sindromima genskog kontinuiteta, a neki od češćih su sindrom delecije 22q11.2 (del(22)(q11.2)), Vilijamsov sindrom (del(7)(q11.23)) i Miler-Dajkerov sindrom (del(17)(p13.3)). U pojedinim slučajevima pojedinačni dozno zavisni geni mogu biti identifikovani kao uzroci intelektualnih poteškoća kod mikrodelecionih i mikroduplikacionih sindroma kao što je duplikacija *RAI1* kod Potocki-Lupski sindroma, delecija *CHD7* kod Čardžovog sindroma, duplikacija *MECP2* kod MECP2-duplikacionog sindroma i delecija *EHMT1* kod Klefstra sindroma (van Bokhoven 2011). Kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama kriptične promene u broju kopija su naročito česte u subtelomernim regionima hromozoma koji su veoma bogati genima (Novo-Filho *et al.*, 2016). Literaturni podaci ukazuju da su subtelomerni rearanžmani u osnovi bolesti kod 5-20% pacijenata sa idiopatskim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama (Flint *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1999; Xu and Chen, 2003; Rooms *et al.*, 2004). Dok su neki subtelomerni rearanžmani asocirani sa dobro definisanim kliničkim sindromima, druge vrlo često prati netipična klinička slika. Uz neurorazvojne simptome, pacijenti obično imaju i određene dismorfološke karakteristike i/ili urođene anomalije.

U posebnu grupu mikrodelecionih sindroma bi se mogle svrstati bolesti imprintinga. Osnovu genomskog imprintinga čine epigenetičke modifikacije kao što su acetilacije i metilacije histona i metilacije DNK, koje omogućavaju ekspresiju specifičnih alela u zavisnosti od toga kog su parentalnog porekla (Eggermann *et al.*, 2015). Delecija hromozomskog segmenta koji sadrži aktivni alel imprintovanog gena, rezultovaće u strukturnoj parcijalnoj monozomiji ali funkcionalnoj nulizomiji i nastanku sindroma kao što su Angelmanov sindrom (maternalna delecija, del(15)(q11.2q13)) i Prader-Vilijev sindrom (paternalna delecija, del(15)(q11.2q13)).

Alteracija u broju kopija dozno zavisnih gena ima primarnu ulogu u patogenezi bolesti (Cooper *et al.*, 2011). Pokazano je i da disrupcija regulatornih elemenata lociranih u nekodirajućim regionima takođe može imati ključnu ulogu (Zhang and Lupski, 2015). Procena patogenosti retkih individualnih promena u broju kopija predstavlja veliki izazov, kako zbog poteškoća u identifikaciji konkretnih dozno-zavisnih gena tako i zbog njihove varijabilne ekspresivnosti (Park *et al.*, 2019). Klinički značaj neke promene u broju kopija

se određuje na osnovu obrasca nasleđivanja (segregacione analize), veličine, tipa (delecija ili duplikacija), sadržaja gena i poređenjem sa varijantama koje su publikovane u literaturi i različitim bazama podataka (Martin *et al.*, 2015).

- Genske varijante

Pored hromozomskih aberacija u osnovi zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća se nalaze i alteracije brojnih gena. Većina uzročnih genskih varijanti se nalazi u egzonima ili kanonskim mestima iskrajanja introna. Preostale varijante se nalaze u intronima, regulatornim sekvencama i nekanonskim mestima iskrajanja (Antonarakis *et al.*, 2000). Najnovija istraživanja su pokazala da *de novo* mutacije u regulatornim elementima koji su aktivni u fetalnom mozgu, leže u osnovi 1-3% pacijenata sa intelektualnim poteškoćama (Short *et al.*, 2018).

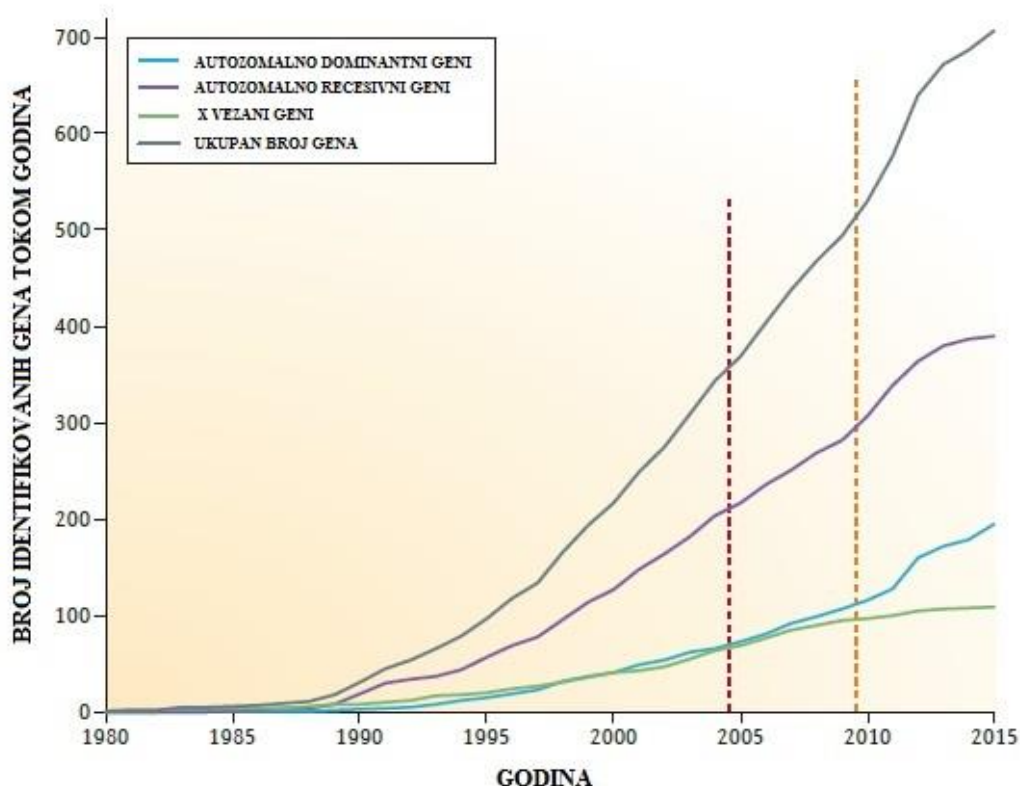
Glavni uzrok teških, izolovanih, nesindromskih intelektualnih poteškoća su dominantne *de novo* intragenske mutacije, na šta ukazuje veliki broj istraživanja sprovedenih poslednjih godina (De Ligt *et al.*, 2012; Gilissen *et al.*, 2014; Hamdan *et al.*, 2014).

Do danas, uzročne varijante X-vezanih intelektualnih poteškoća su identifikovane u preko 100 gena. Među njima, najčešće su patogene varijante *FMRI* gena, uzročnika sindroma fragilnog X. Njegov ukupan doprinos intelektualnim poteškoćama je kod dečaka 0,5%. Iako nijedan od preostalih X-vezanih gena pojedinačno ne doprinosi dijagnozi intelektualnih poteškoća više od 0,1%, njihov ukupan doprinos kod dečaka je oko 10%.

Autozomno-recesivno nasleđivanje je često kod sindromskih intelektualnih poteškoća, dok su izolovane intelektualne poteškoće vrlo retko uzrokovane alteracijama gena koje se nasleđuju recesivno. Izuzetak su populacije u kojima postoji veća učestalost konsagviniteta, i u kojima čak do 60% bolesnika ima recesivno nasleđivanje (Musante and Ropers, 2014). Do danas je otkriveno preko 100 uzročnih gena autozomno-recesivnog zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća (Vissers *et al.*, 2016).

Zahvaljujući studijama autozomno-dominantnih, X-vezanih i autozomno-recesivnih formi bolesti, do danas je identifikovano oko 700 uzročnih gena sindromskih i nesindromskih formi intelektualnih poteškoća. Smatra se da će metode sekvenciranja nove

generacije (engl., *next generation sequencing*, NGS) omogućiti da taj broj u narednim godinama pređe hiljadu (Slika 1) (Vissers *et al.*, 2016).



Slika 1. Grafički prikaz rasta broja otkrivenih gena asociраних sa izolovanim i sindromskim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, prikazan prema tipu nasleđivanja. Vertikalne isprekidane linije predstavljaju momenat uvođenja analize molekularnog kariotipa (crvena) i sekvenciranja nove generacije (narandžasta) za detekciju novih uzročnih gena. Na slici se jasno vidi da ne postoji saturacija u identifikaciji uzročnih gena osim za X-vezane forme ove bolesti. Preuzeto od (Vissers *et al.*, 2016).

Dok je većina X-vezanih gena otkrivena, veliki broj autozomnih gena je još uvek nepoznat, uključujući i česte uzročnike bolesti. Na primer, pokazano je da tek nedavno otkriveni geni, *ARID1B* i *DEAD*, pojedinačno mogu da objasne više od 1% dijagnoza intelektualnih poteškoća (Santen *et al.*, 2012; Snijders Blok *et al.*, 2015). Od genskih varijanti najzastupljenije su nesinonimne nukleotidne izmene izgubljenog smisla (engl., *missense*), nesinonimne nukleotidne izmene bez smisla (engl., *nonsense*), varijante koje

menjaju otvoreni okvir čitanja (engl., *frameshift*), varijante koje ne menjaju otvoreni okvir čitanja (engl., *in-frame*), varijante koje se nalaze na mestima iskrajanja introna (engl., *splice-site*) i druge (Chiurazzi and Pirozzi, 2016).

1.3.2. Negenetički faktori

Sredinski faktori, samostalno ili u kombinaciji sa genetičkim faktorima, mogu biti uzroci nastanka zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća. Većina ovih faktora ispoljava svoje efekte još u toku prenatalnog života. Istraživanja su pokazala da perinatalna asfiksija i prenatalne infekcije i krvarenja, uz velike hromozomske aberacije, predstavljaju uzroke najtežih oblika intelektualnih poteškoća (Chiurazzi and Pirozzi, 2016).

Izlaganje fetusa tokom trudnoće različitim teratogenima ima varijabilan efekat u zavisnosti od tipa teratogena, doze i dužine izloženosti teratogenu i stadijuma gestacije. Dejstvo teratogena je naročito štetno u prvoj polovini trudnoće. Teratogeni uključuju infektivne agense (rubela, citomegalovirus, varičela, toksoplazmoza, sifilis), fizičke agense (jonizujuće zračenje, hipertermija), bolest majke (dijabetes, fenilketonurija), sredinske hemikalije (herbicidi, organska jedinjenja žive, industrijski rastvarači), lekove (talidomid, fentoin) i druge toksične supstance kao što su droga i alkohol. Konzumiranje alkohola tokom trudnoće u odgovarajućim, jasno definisanim dozama, dovodi do ireverzibilnog oštećenja mozga bebe i vodeći je negenetički faktor rizika za nastanak intelektualnih poteškoća (O'Leary *et al.*, 2013). Drugi čest uzročnik koji se može preduprediti je pušenje. Istraživanja su pokazala da pušenje duplira rizik za prenatalno zaostajanje u razvoju i prevremeno rođenje deteta koji za posledicu mogu imati dugoročne poteškoće kao što je cerebralna paraliza ili intelektualne poteškoće (Olds *et al.*, 1994).

Podaci u literaturi ukazuju i da nelečena hipotireoza kod majke u toku trudnoće, može predstavljati rizik za sniženi IQ, redukovane motoričke sposobnosti, kao i generalno lošiji psihomotorički razvoj, zaostajanje u ekspresivnom govoru i neverbalnoj kogniciji, i autizam (Päkkilä *et al.*, 2015).

Česti sredinski faktori kod kojih je moguća prevencija su deficijencija joda i neuhranjenost (majke i/ili deteta) i oni predstavljaju glavne uzročnike zaostajanja u

razvoju/intelektualnih poteškoća u zemljama u razvoju. Pokazano je i da je anemija uzrokovana deficijencijom gvožđa u asocijaciji sa zaostajanjem u neurorazvoju (Beard, 2008). Učestalost faktora veoma varira između različitih područja, a zavisi kako od životnog stila i standarda majke, tako i od kvaliteta javno zdravstvenih sistema (Chiurazzi and Pirozzi, 2016).

1.3.3. Patofiziologija zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća

Razvoj funkcionalnog mozga zavisi od preciznih i kompleksnih faza proliferacije neurona i glijalnih ćelija, njihove migracije i sazrevanja. Neke intelektualne poteškoće su asocirane sa velikim malformacijama mozga (npr. holoprozencefalija, šizencefalija, porencefalija, agenezija žuljevitog tela, cerebelarna hipoplazija) ili sa poremećajima neuronalne migracije (npr. lizencefalija, pahigirija, dupli korteks, ventrikularna nodularna heterotopija) koji se mogu detektovati slikovnim tehnikama. U slučajevima kada je mozak morfološki normalne strukture, neuronske veze mogu biti poremećene disfunkcijom glije (npr. poremećaji mijelinizacije) ili interakcija neurona može biti poremećena na sinaptičkom nivou, kako zbog redukovano broja dendritskih nastavaka tako i zbog neefikasne (ili preefikasne) sinaptičke transmisije (Dierssen and Ramakers, 2006). Na samom kraju, ako su i neuroni i glijalne ćelije dobro pozicionirane, povezane, i adekvatno funkcionišu, uzrok bolesti može biti toksična neurodegeneracija, tj. oštećenje ćelija taloženjem toksičnih jedinjenja, kao kod metaboličkih bolesti. Stoga, detaljna klinička evaluacija predstavlja ključ za postavljanje kliničke dijagnoze i identifikovanje specifičnog uzroka zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća (Battaglia and Carey, 2003; Moeschler *et al.*, 2014; Srour and Shevell, 2014).

Glavni molekularni i ćelijski mehanizmi koji se nalaze u osnovi zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća uključuju neurogenezu, neuronalnu migraciju, sinaptičke funkcije i regulaciju genske ekspresije.

- Neurogeneza

Tokom razvoja neurogeneza i ćelijska migracija se odvijaju u strogo kontrolisanim prostorno vremenskim uslovima, a neuroni formiraju kompleksne aksonalne i dendritske mreže. Poremećaji u procesima neurogeneze obično dovode do nastanka intelektualnih poteškoća asociranih sa mikrocefalijom (obim glave koji je za tri standardne devijacije manji od proseka za uzrast) (Kaindl *et al.*, 2010; Nicholas *et al.*, 2010). Mikrocefalija nastaje kao posledica defektne funkcije centrozoma ili mehanizama popravke DNK i asocirana je sa genima koji imaju ulogu u ćelijskoj deobi i regulaciji ćelijskog ciklusa kao što su *WDR62*, *CDK5RAP2*, *CASC5*, *ASPM*, *CENPJ*, *STIL* i drugi (Faheem *et al.*, 2015).

- Neuronalna migracija

Adekvatna regulacija neuronalne migracije je esencijalna za normalan razvoj i intelektualno funkcionisanje. Bolesti neuronalne migracije mogu biti posledica disrupcije različitih stadijuma migracionog procesa, uključujući početak migracije, samu migraciju i obustavu migracije. Svi ovi poremećaji dovode do nepravilne distribucije neurona u cerebralnom korteksu i nastanku bolesti kao što je lizencefalija koja podrazumeva takozvani “gladak” mozak, bez girusa i sulkusa, i asocirana je sa teškim intelektualnim poteškoćama (Verrotti *et al.*, 2010). Klasična lizencefalija tip 1 nastaje kao posledica alteracija u *LIS1*, koji kodira za protein asociran sa mikrotubulama. Poznato je da *LIZ1* (*LIS1*) interaguje sa citoplazmatičnim dineinom, fosfoproteinom *NDEL1* i kinetohorom *CLIP-170*, kao deo kompleksa koji je jako važan u procesu neuronalne migracije (Wynshaw-Boris, 2007). Lizencefalije predstavljaju veliku grupu bolesti, a osim *LIS1*, mogu biti uzrokovane i alteracijama *DCX*, *TUBA1A*, *DYNC1H1*, *POMT1*, *POMT2*, *ARX*, *RELN*, *VLDLR* i drugih gena (Di Donato *et al.*, 2018). Osim lizencefalija, u poremećaje neuronalne migracije se ubrajaju i pahigirije, heterotopije sive mase i neke druge cerebralne disgenezije (Guerrini and Parrini, 2010).

- Sinaptička funkcija

Komunikacija između neurona se odvija putem hemijskih sinapsi koje omogućavaju protok informacije sa presinaptičkih krajeva aksona na postsinaptičke regione dendrita. Većina ekscitatornih sinapsi u mozgu se formira na dendritskim nastavcima (Hotulainen

and Hoogenraad, 2010). Molekularna arhitektura sinapsi podrazumeva presinaptičku membranu sa sinaptičim vezikulama u kojima se nalaze neurotransmiteri i postsinaptičku membranu sa neurotransmiterskim receptorima. Presinaptička i postsinaptička membrana su na određenoj distanci (10 do 25nm) na kojoj ih održavaju ćelijski adhezioni proteini (engl., *cell adhesion molecules*, CAMs) (Price *et al.*, 2006). Ovi adhezioni proteini, kao što su neureksini i neroligini, imaju ulogu i u formiranju funkcionalnih presinaptičkih regiona, naročito u fuziji vezikula sa membranom i oslobađanju neurotransmitera. Dok su neureksini presinaptički receptori, neroligini su ligandi neureksina locirani na postsinaptičkoj membrani. Alteracije *NLGN3/4* (neuroigin 3/4) gena su identifikovane kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama i/ili autizmom (Vaillend *et al.*, 2008), dok su alteracije gena iz neureksinske superfamilije, kao što su *CNTNAP2* ili *APBA2*, asociirane sa autizmom i šizofrenijom, što ukazuje da sinaptička disfunkcija može biti uzrok različitih neurorazvojnih bolesti (Bessa *et al.*, 2012).

Na presinaptičkoj membrani, neurotransmiteri kao što su glutamat i gama aminobutirična kiselina (engl., *gamma aminobutyric acid*, GABA), su deponovani u sinaptičkim vezikulama. Prijanjanje i fuziju vezikula sa membranom kontroliše SNARE (engl., *stable N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) kompleks i brojni drugi proteini. Protein STXBP1 reguliše VAMP2, sintaksin 1 i SNAP koji predstavljaju ključne elemente u transportu vezikula. *De novo* patogene varijante i haploinsuficijencija *STXB1* gena su uzročnici autozomno-dominantnog Otatara sindroma, koji odlikuje epileptička encefalopatija i teško razvojno i intelektualno zaostajanje (Saitsu *et al.*, 2008; Saitsu *et al.*, 2010)

Presinaptičke vezikule su prekrivene Rab proteinima, naročito Rab3, koji ima značajnu regulatornu ulogu u transportu sinaptičkih vezikula. Rab proteini su podgrupa Ras familije malih GTPaza, koje su obično aktivne u asocijaciji sa GTP-om, a inaktivne kada je za njih vezan GDP. Vezivanje GDP-a i GTP-a regulišu GTPaza-aktivirajući proteini (engl., *GTPase-activating protein*, GAP) i guanin-nukleotid-disocijacija-inhibitori (engl., *guanosine nucleotide dissociation inhibitor*, GDI) koji promovišu inaktivno stanje i guanin-nukleotid-zamenski faktori (engl., *guanine nucleotide exchange factor*, GEF) koji stimulišu aktivnost Rab proteina. GAP, GDI i GEF proteini regulišu transport vezikula i njihovu

fuziju sa membranom moduliranjem asocijacije/disocijacije Rab proteina sa vezikulama preko kontrole njihovog GDP-vezanog stanja. Dva proteina uključena u ove procese koji su u asocijaciji sa intelektualnim poteškoćama su GDI α i Rab3GAP. X –vezani *GDI-1* gen koji kodira za GDI α je prvi otkriveni gen kod nesindromskih intelektualnih poteškoća (D’Adamo *et al.*, 1998). Rab39B gen koji je ključan za formiranje i održavanje sinapsi, uzrok je X-vezanih intelektualnih poteškoća asociраних sa autizmom, epilepsijom i makrocefalijom (Giannandrea *et al.*, 2010), dok su alteracije *Rab3GAP* u osnovi Varburg-Mikro sindroma, recesivne bolesti koja se odlikuje abnormalnim razvojem mozga i teškim intelektualnim zaostajanjem (Morris-Rosendahl *et al.*, 2010).

Postsinaptička membrana na dendritima uključuje neurotransmitterske receptore, komponente citoskeleta, adapterske proteine, endocitotsku mašineriju, šaperone i brojne signalne regulatorne puteve uključene u diferencijaciju postsinaptičkih regiona i uspostavljanje funkcionalnih sinapsi (Bessa *et al.*, 2012). Veliki broj gena koji su u asocijaciji sa X-vezanim intelektualnim poteškoćama kodira za postsinaptičke proteine. Neki kodiraju za komponente ili regulatore glutamatnih receptora, kao što su GluR3 i SAP102 i PLP1, ili za proteine koji imaju ulogu u maturaciji dendritskih nastavaka i formiranju sinapsi kao što je SHANK2. Pokazano je da su alteracije *SHANK2* u asocijaciji sa intelektualnim poteškoćama i autizmom (Berkel *et al.*, 2010).

- Regulacija genske ekspresije

Genska ekspresija i sinteza proteina su precizno definisani procesi determinisani u sadejstvu dinamike hromatina, transkripcionih aktivatora/represora i regulacije iskrajanja, eksporta, posttranslacione regulacije i degradacije RNK. Alteracije ovih mehanizama mogu dovesti do deregulacije genske ekspresije. Ukoliko do promena u genskoj ekspresiji dođe u nekom od kritičnih razvojnih stadijuma, to može dovesti do patoloških promena u razvoju mozga i/ili njegovom funkcionisanju. Neuronu su visoko specifične ćelije u kojima metabolizam RNK igra ključnu ulogu u njihovom funkcionisanju, naročito tokom neurorazvoja, kada informacione RNK transportovane u aksonalne i dendritske nastavke regulišu rast neurona (Hengst and Jaffrey, 2007). Nakon formiranja sinapsi, nastavlja se transport RNK u dendritske nastavke gde se vrši translacija proteina koji su ključni za

funkcionisanje sinapsi. Ovi procesi igraju ključnu ulogu u sinaptičkom plasticitetu i u korelaciji su sa memorijom i učenjem (Bessa *et al.*, 2012).

Geni asocirani sa intelektualnim poteškoćama koji kodiraju za regulatore puteva signalne transdukcije, transkripcione faktore i kofaktore koji učestvuju u remodelovanju hromatina, regulaciji genske ekspresije i maturacije proteina, su veoma brojni (Renieri *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; McClung and Nestler, 2008). Aktivacija glutamatnih receptora inicira veliki broj postsinaptičkih signalnih kaskada, kao što je MAPK/ERK signalni put. NF1 protein asociran sa neurofibromatozom tip 1 i RSK2 gen asociran sa Kofin-Lovrijevim sindromom su aktivatori ovog signalnog puta. Dok NF1 reguliše MAPK/ERK preko Ras proteina (Simanshu *et al.*, 2017), RSK2 deluje nizvodno od Ras/ERK kaskade i uključen je u transkripcionu aktivaciju remodelovanjem hromatina (Merienne *et al.*, 2001). Sa druge strane, proteini kao što su MECP2, CDKL5 i ZNF41 inhibiraju transkripciju. MECP2 i CDKL5 to čine vezivanjem za metilovanu DNK dok ZNF41 sadrži transkripcioni represorni domen (Bessa *et al.*, 2012). Geni koji kodiraju za RNK vezujuće proteine su takođe asocirani sa intelektualnim poteškoćama. Najproučavaniji je FMRP protein (kodira ga *FMRI*), koji se može vezati za brojne informacione RNK, od koji neke kodiraju za proteine važne za neurorazvoj i plasticitet. Kao odgovor na stimulaciju metabotropnih glutamatnih receptora, FMRP kontroliše lokalizaciju iRNK u dendritima i njihovu translaciju (Bassell and Warren, 2008; Dichtenberg *et al.*, 2008). Drugi molekuli koji su asocirani sa intelektualnim poteškoćama su mikro RNK koje regulišu gensku ekspresiju putem inhibicije translacije ili utišavanjem transkripcije. Mnoge od ovih mikro RNK su eksprimirane u mozgu i imaju esencijalnu ulogu u razvoju neurona (Radhakrishnan and Anand, 2016).

1.3.4. Somatske varijante, nekodirajuće varijante i kompleksno nasleđivanje

Uzročne varijante zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća su uglavnom germinativne alteracije gena, međutim, najnovija istraživanja ukazuju da i drugi genski defekti mogu imati značajnu ulogu (Riviere *et al.*, 2012; Krupp *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2017).

Postzigotne, somatske alteracije, uzrokuju značajnu proporciju slučajeva i imaju značajne implikacije na predikciju rizika, dijagnozu i pristup pacijentu (Soden *et al.*, 2014). Somatske patogene varijante se akumuliraju u našim ćelijama tokom razvića i tokom celog života, i mogu dovesti do bolesti ukoliko se nađu u dovoljnom broju ćelija koje će se zbog njihovog prisustva drugačije razvijati i funkcionisati (Poduri *et al.*, 2013). Istraživanja na DNK izolovanoj iz periferne krvi su pokazala da se značajna proporcija tačkastih mutacija i promena u broju kopija javlja postzigotno (Campbell *et al.*, 2014; Acuna-Hidalgo *et al.*, 2015). Na značaj analiziranja uzoraka moždanog tkiva ili čak pojedinačnih neurona, kako bi se u potpunosti razumela uloga somatskih alteracija u nastanku intelektualnih poteškoća i drugih bolesti mozga, ukazale su studije u kojima je dokazano da su somatske mutacije uzročnici kortikalnih malformacija (Riviere *et al.*, 2012; Jamuar *et al.*, 2014). Sekvenciranjem pojedinačnih ćelija pokazano je da su somatske promene u broju kopija prisutne u većini humanih neurona. Neke od njih su nastale tokom neurogeneze pa se mogu detektovati u velikom broju ćelija potvrđujući time njihovu ulogu u nastanku bolesti (McConnell *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014).

Istraživanja korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama su pokazala da pojedinačne genske alteracije retko same mogu u potpunosti objasniti fenotip. U prilog tome ide i činjenica da kod pacijenata sa istim *de novo* germinativnim mutacijama postoji značajna fenotipska varijabilnost. To nije iznenađenje s obzirom na to da se zajedno sa identifikovanom uzročnom varijantom nasleđuje još šest milijardi nukleotida. Varijacije pojedinih nukleotida mogu uticati na ekspresivnost i penetrantnost bolesti. Podaci u literaturi ukazuju da varijabilna penetrantnost i ekspresivnost postoje i kod dobro definisanih uzročnih promena u broju kopija, a uzrok tome je postojanje dodatnih hromozomskih aberacija (Sharp *et al.*, 2008).

Nekodirajuće varijante su locirane izvan gena i objašnjavaju oko 3% dijagnoza intelektualnih poteškoća (Cooper *et al.*, 2010). Identifikacija ovih varijanti i proučavanje njihovih fenotipskih efekata je postalo moguće poslednjih godina zahvaljujući tehnološkom napretku. Otkriveni su brojni utišivači, insulatori i represorni elementi širom genoma, a takođe je i nova CRISPR-Cas9 tehnika primenjena za razumevanje fenotipskih efekata varijanti u ovim regionima. Iako još uvek nema pomaka na polju intelektualnih poteškoća,

uspešnost CRISPR-Cas9 editovanja je pokazana kod retkih malformacija ekstremiteta (Lupianez *et al.*, 2015). Potencijal ovog pristupa u izučavanju intelektualnih poteškoća je veoma veliki i sigurno će doprineti boljem razumevanju bolesti.

1.4. Detekcija delecija i duplikacija kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama

1.4.1. Kariotip

Analiza kariotipa je analiza hromozomskog komplementa sa ciljem detekcije numeričkih i strukturnih hromozomskih rearanžmana koji su česti uzročnici zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća. Ova metoda podrazumeva kultivaciju ćelija koje se dele (najčešće limfocita periferne krvi), preparaciju i bojenje hromozoma, a zatim njihovu analizu na svetlosnom mikroskopu. Omogućava detekciju hromozomskih rearanžmana koji su veći od 5-10 Mb (Yokoyama *et al.*, 2018). Stopa detekcije uzročnih mutacija kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju analizom kariotipa je 3-6,5% (ne računajući Daunov sindrom kao najčešću formu intelektualnog zaostajanja prisutnu kod 6-8% dece sa intelektualnim poteškoćama) (Vissers *et al.*, 2016). Iako je u većini razvijenih zemalja napuštena zbog svojih ograničenja, u zemljama sa limitiranim resursima se još uvek koristi, zbog svoje dostupnosti i cene analize, uglavnom kao prvi dijagnostički test kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama.

1.4.2. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl., *fluorescence in situ hybridization*, FISH) je metoda koja omogućava detekciju hromozomskih rearanžmana sa rezolucijom od 50 do 100 Kb (Wiegant *et al.*, 1991). Priprema preparata za FISH analizu se izvodi prema standardnoj citogenetičkoj proceduri. Nakon hibridizacije fluorescentno obeleženih proba sa metafaznim hromozomima ili interfaznim jedrima, signal se vizuelizuje na fluorescentnom mikroskopu. Kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama, ovom

metodologijom se najčešće analiziraju subtelomerni regioni hromozoma i regioni najčešćih mikrodelecionih i mikroduplikacionih sindroma. Subtelomerni regioni su veoma bogati genima, te njihove alteracije najčešće imaju značajne reperkusije na fenotip. Dodatno, subtelomerni regioni su podložniji aberantnim hromozomskim rearanžmanima u odnosu na druge regione hromozoma (Behjati and Tarpey, 2013). Mikrodelecioni i mikroduplikacioni sindromi su specifični, dobro definisani klinički entiteti, koji predstavljaju češće uzroke zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća, i koji obično zahvataju veći broj gena. Stopa detekcije subtelomernih rearanžmana FISH metodom kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama je procenjena na 7,4%. Ista studija je pokazala da stopa detekcije kod pacijenata sa blagim intelektualnim poteškoćama iznosi svega 0,5% (Knight *et al.*, 1999).

1.4.3. Višestruko umnožavanje proba zavisno od ligacije (MLPA)

Metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije (engl., *Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) je molekularno-citogenetička metoda koja omogućava detekciju promena u broju kopija do šezdeset različitih DNK sekvenci. MLPA se bazira na lančanoj reakciji polimerizacije (engl., *polymerase chain reaction*, PCR) a podrazumeva korišćenje jednog para prajmera za umnožavanje različitih sekvenci. Sekvence se identifikuju kapilarnom elektroforezom na osnovu poznate dužine, a procena prisustva delecije/duplikacije se izvodi na osnovu intenziteta fluorescentnog signala poreklom od proba specifičnih za svaku sekvencu. Za pacijente sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama naročito je značajna MLPA analiza subtelomernih regiona hromozoma, kao i MLPA analiza mikrodelecionih i mikroduplikacionih sindroma, koji su najčešće udruženi sa intelektualnim poteškoćama. Procenjeno je da se MLPA analizom subtelomernih regiona može detektovati 92,6% od ukupnih slučajeva subtelomernih rearanžmana (Santa María *et al.*, 2016). Stopa detekcije MLPA analize subtelomernih rearanžmana kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, korišćenjem kitova SALSA MLPA P036 i SALSA MLPA P070, varira od 5-10% u različitim studijama, u zavisnosti od kriterijuma koji su korišćeni za odabir pacijenata

(Palomares *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Behjati and Tarpey, 2013; Mundhofir *et al.*, 2013; Pohovski *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2014; Damnjanovic *et al.*, 2015; Santa María *et al.*, 2016). Pokazano je da su subtelomerni rearanžmani značajno češći kod pacijenata sa srednje teškim i teškim intelektualnim zaostajanjem u odnosu na one za blažom formom bolesti (Knight *et al.*, 1999; Vissers *et al.*, 2016). MLPA metoda se pokazala kao tačna i pouzdana u identifikaciji delecija, duplikacija i amplifikacija koje se nalaze u osnovi mnogih bolesti, uključujući i one koje su uzrokovane subtelomernim rearanžmanima (Palomares *et al.*, 2006).

U zemljama sa ograničenim resursima postoji tendencija formiranja posebnih dijagnostičkih algoritama za različite poremećaje, kojima se može postići postavljanje dijagnoze kod značajnog broja pacijenata uz prihvatljive troškove (Jehee *et al.*, 2011). U više studija je pokazano da se kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama kombinovanjem kitova za subtelomerne rearanžmane (SALSA MLPA P036 i SALSA MLPA P070) i mikrodelecione/mikroduplikacione sindrome (SALSA MLPA 245), može postići stopa detekcije od 9,3% (Boggula *et al.*, 2014) do 14% (Pohovski *et al.*, 2013).

1.4.4. Molekularni kariotip

Analiza molekularnog kariotipa odnosno analiza kariotipa/hromozoma u formatu mikroniza (engl., *chromosomal microarray*, CMA) omogućava detekciju promena u broju kopija na nivou celog genoma. Postoje dva načina izvođenja ove analize:

- analiza molekularnog kariotipa bazirana na komparativnoj genomskoj hibridizaciji (engl., *comparative genomic hybridisation*, CGH) koja se podrazumeva istovremenu hibridizaciju DNK pacijenta i zdrave osobe (kontrola) sa probama koje se nalaze na mikročipu. S obzirom da su obe DNK fluorescentno obeležene, zaključak o postojanju promena u broju kopija se izvodi na osnovu razlike u jačini fluorescentnog signala DNK pacijenta u odnosu na kontrolnu DNK (Levy and Burnside, 2019).

- SNP (engl., *single nucleotide polymorphism*) molekularni kariotip podrazumeva korišćenje proba poreklom iz genomskih regiona koji se razlikuju između individua na jednoj nukleotidnoj poziciji (SNP). Za razliku od molekularnog kariotipa koji se bazira na CGH, ovaj pristup podrazumeva poređenje fluorescentnog signala poreklom od DNK pacijenta sa signalima DNK normalnih kontrola, koje su posebno analizirane, normalizovane i kombinovane, kako bi predstavljale takozvani referentni set (*in silico* poređenje). Prednost ovog pristupa je što omogućava identifikaciju dugačkih regiona homozigotnosti. Većina SNP baziranih testova molekularnog kariotipa sadrži i probe za promene u broju kopija, i to su takozvani hibridni eseji (Levy and Burnside, 2019).

Prema preporukama Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku, analiza molekularnog kariotipa koja se koristi u kliničke svrhe bi trebalo da omogućiti identifikaciju delecija i duplikacija većih od 400 Kb (South *et al.*, 2013) Zahvaljujući većoj dijagnostičkoj moći tj. većoj stopi detekcije uzročnih, patogenih ili verovatno patogenih varijanti, u odnosu na analizu kariotipa, FISH i MLPA analizu, danas je molekularni kariotip metoda izbora za analizu varijacija u broju kopija (Moeschler *et al.*, 2014).

Ispitivanje korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata sa identifikovanim patogenim delecijama i duplikacijama metodom molekularnog kariotipa, dovelo je do definisanja novih sindroma i otkrića brojnih dozno zavisnih gena. Ovakav način identifikacije novih gena je i dalje aktuelan, čemu svedoče brojni radovi u najznačajnijim naučnim časopisima (Au *et al.*, 2014; Reinstein *et al.*, 2016).

Retrospektivna studija preko dvadeset hiljada pacijenata koji su testirani analizom molekularnog kariotipa je pokazala da je dijagnostička moć ove metode od 15-20%, značajno veća u odnosu na dijagnostičku moć analize kariotipa, kojom se uzročne hromozomske aberacije mogu identifikovati u 3% slučajeva (kada se isključi Daunov sindrom i druge fenotipski prepoznatljive hromozomopatije), te da kod pacijenata sa razvojnim poteškoćama, autizmom i/ili kongenitalnim anomalijama, analizu molekularnog kariotipa treba primeniti kao prvi dijagnostički test (Miller *et al.*, 2010). Rezultati studije

Miler i saradnika su potvrđeni i nedavno sprovedenim studijama (Cheng *et al.*, 2019; Jang *et al.*, 2019). Stope detekcije analize molekularnog kariotipa kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama se kreću od 13% (Shoukier *et al.*, 2013) do 30% (Cappuccio *et al.*, 2016), u zavisnosti od korišćene metodologije i načina odabira pacijenata.

1.5. Detekcija genskih varijanti kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama

Veliki pomak u otkrivanju uzročnih genskih varijanti postignut je pojavom metodologije sekvenciranja nove generacije (NGS). Ova metodologija omogućava simultanu analizu velikog broja gena, zbog čega je naročito pogodna za otkrivanje uzroka genetički heterogenih bolesti kao što su zaostajanje u razvoju i intelektualne poteškoće.

U praksi se koriste raznovrsne platforme za sekvenciranje nove generacije koje se zasnivaju na različitim tehnologijama sekvenciranja DNK. Ono što je svim platformama zajedničko, je da se sekvenciranje mnogobrojnih malih fragmenata DNK odvija paralelno, zbog čega se ova metodologija još naziva i masivno paralelno sekvenciranje ili duboko sekvenciranje. Pri tome, svaka nukleotidna baza se „pročita“ više puta (dubina pokrivenosti sekvence), što je neophodno za dobijanje tačnih rezultata i uvid u prisustvo DNK varijacija. Bioinformatičkom analizom, sekvencirani fragmenti se sklapaju tako što se upoređuju sa sekvencama referentnog humanog genoma. Sekvenciranje nove generacije se može koristiti za sekvenciranje celih genoma ili definisanih specifičnih regiona od interesa, uključujući tu sekvenciranje oko 22.000 gena (sekvenciranje celog egzoma) ili manji broj pojedinačnih gena (Behjati and Tarpey, 2013).

Modaliteti primene sekvenciranja nove generacije kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama obuhvataju analize genskih panela, uključujući i „klinički egzom“, sekvenciranje celog egzoma i sekvenciranje celog genoma (Klein and Foroud, 2017).

Testiranje se može izvoditi na način da se testira samo pacijent ili da se testira pacijent zajedno sa roditeljima i takvo testiranje je označeno kao trio. Generalno se

smatra da je trio sekvenciranje superiornije od pojedinačnog sekvenciranja probanda, s obzirom na to da olakšava detekciju *de novo* varijanti i omogućava potvrdu udružene heterozigotnosti tokom interpretacije varijanti. Rezultati pet studija koje su poredile dijagnostičku moć pojedinačnog i trio sekvenciranja ukazuju da je verovatnoća detekcije uzročnih varijanti dvostruko veća kod trio sekvenciranja (Lee *et al.*, 2014; Farwell *et al.*, 2015; Retterer *et al.*, 2016; Sawyer *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2017). Zvanične preporuke i vodiči koji bi usmerili odluku kliničara ka pojedničanom ili trio sekvenciranju još uvek ne postoje. Ipak, stav Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku je, da kada postoje tehničke mogućnosti, prednost uvek treba dati trio sekvenciranju, kao i da sve laboratorije treba da ustanove minimalnu pokrivenost sekvenci koja je neophodna za detekciju varijanti u skladu sa njihovim dijagnostičkim pristupom (sekvenciranje probanda, trio sekvenciranje, sekvenciranje panela, egzoma ili genoma) (Rehm *et al.*, 2013).

Korišćenje metoda sekvenciranja nove generacije, naročito sekvenciranja celog egzoma i genoma, sa sobom nose veću verovatnoću detekcije takozvanih uzgrednih nalaza, odnosno patogenih varijanti koje se ne odnose na dijagnozu zbog koje je analiza rađena. Ukoliko se identifikuju u presimptomatskom periodu, ovakvi nalazi mogu omogućiti prevenciju morbiditeta ili mortaliteta kod nekih bolesti. Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku je dao listu od 59 gena za koje preporučuje izveštavanje u slučaju detekcije (Kalia *et al.*, 2017).

Kontinuitet u otkrivanju novih gena, unapređivanje znanja o genotipsko-fenotipskoj korelaciji, tehnološka unapređenja, kao i postepeno smanjenje troškova sekvenciranja, doprineće da sekvenciranje nove generacije postane jedinstven pristup u dijagnostici genetičkih bolesti (Noll *et al.*, 2016; Stavropoulos *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2018; Lionel *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2019).

1.5.1. Genski paneli

Genski paneli se najčešće koriste u dijagnostici klinički jasno definisanih entiteta koji su genetički (lokusno) heterogeni, među koje ubrajamo i zaostajanje u razvoju i

intelektualne poteškoće (Bean *et al.*, 2019). Prednost genskih panela se ogleda u tome što predstavljaju visoko validiranu analizu ograničenog broja jasno definisanih gena sa velikom pokrivenošću sekvence i smanjenom verovatnoćom detekcije uzgrednih patogenih varijanti, a uz relativno nisku cenu nakon inicijalne implementacije (Rehm, 2013). Ova metoda omogućava analizu samo onih gena koji su direktno povezani sa uočenim fenotipom (Dierking and Schmidtke, 2014). Zahvaljujući veoma visokoj pokrivenosti sekvence, genski paneli u poređenju sa sekvenciranjem celog egzoma i genoma imaju najnižu stopu lažno pozitivnih rezultata u okviru analiziranog seta gena (Klein and Foroud, 2017). Pojedine studije su pokazale da se kod Mendelovskih bolesti egzomskim sekvenciranjem mogu postići slične stope detekcije kao kod genskih panela, odnosno da egzomsko sekvenciranje može pokriti više od 98% varijanti identifikovanih primenom genskih panela (LaDuca *et al.*, 2017).

Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku je 2019. godine objavio tehničke standarde za dijagnostičke genske panele, od dizajniranja panela do izveštavanja rezultata analize, kako bi se postigla uniformnost između panela koje nude različite laboratorije, s obzirom na to da postoje velika odstupanja, kako u smislu broja i načina odabira gena, tako i u tehničkom smislu (npr. dubina pokrivenosti sekvence) (Bean *et al.*, 2019). Prema ovim standardima genski paneli treba da:

- budu isplativi za konkretnu kliničku indikaciju,
- imaju maksimalnu kliničku senzitivnost tako što će uključiti gene koji imaju definitivan, jak ili srednji nivo dokaza o asocijaciji sa određenom bolešću (Strande *et al.*, 2017),
- imaju maksimalnu kliničku specifičnost, tako što će isključiti gene nepoznatog značaja, sa limitiranim dokazima o asocijaciji sa nekom bolešću ili čak nedostatkom dokaza (Strande *et al.*, 2017)
- uključe dodatne testove za one gene/regione koji ne mogu biti dovoljno dobro ispitani metodologijom sekvenciranja nove generacije, kako bi se maksimizirala klinička korisnost testa,
- u pojedinim slučajevima kada postoje novi dokazi, uključe gene nepoznatog značaja prema jasno definisanim kriterijumima (Bean *et al.*, 2019).

Genski paneli su se pokazali kao efikasna strategija u postavljanju molekularne dijagnoze intelektualnih poteškoća, sa stopom detekcije od 25% (Redin *et al.*, 2014).

1.5.2. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“

Sekvenciranje “kliničkog egzoma”, koji se u stručnoj literaturi još naziva i medicinski egzom ili Mendeliom, podrazumeva sekvenciranje kodirajućih regiona oko 5000 gena koji su asocirani ili su u verovatnoj asocijaciji sa bolestima čoveka (Okazaki *et al.*, 2016; Bowling *et al.*, 2017; Pajusalu *et al.*, 2018). Najčešće korišćeni kit za ovu vrstu sekvenciranja je *Tru Sight One Sequencing* panel (Illumina, San Dijego, Kalifornija). U skladu sa kliničkom slikom pacijenta i kriterijumima koji se koriste u određenoj laboratoriji, formiraju se specifični genski subsetovi za detaljnu analizu (Okazaki *et al.*, 2016; Pajusalu *et al.*, 2018). Odabir gena na osnovu termina humane fenotipske ontologije (engl., *human phenotype ontology*, HPO) se pokazao kao dobar pristup u formiranju takvih subsetova (Maver *et al.*, 2016). HPO je sveobuhvatna baza koja sadrži širok spisak fenotipskih karakteristika, pri čemu je svakoj od njih asocirana odgovarajuća grupa potencijalno uzročnih gena (<https://hpo.jax.org/app/>) (Robinson and Mundlos, 2010). Pošto su HPO anotacije asocirane sa uzročnim genima, one predstavljaju dobar način kreiranja genskih subsetova na osnovu fenotipa. Stoga, detaljan i informativan izveštaj kliničkog genetičara predstavlja temelj uspešne analize “kliničkog egzoma”.

Sekvenciranje “kliničkog egzoma” je posebno uspešan pristup kod pacijenata sa atipičnom prezentacijom bolesti, nepotpunom penetrantnošću ili kompleksnim fenotipom koji nije moguće prezicno klasifikovati u određenu grupu bolesti (Maver *et al.*, 2016). U ovakvim situacijama je vrlo teško odabrati konkretan manji genski panel i obično bi bio urađen veliki broj genetičkih testova pre postavljanja dijagnoze, ukoliko bi se ista uopšte i postavila. Odabir gena za analizu na osnovu fenotipa omogućava fleksibilnost u inkorporaciji i onih gena koji imaju minimalno preklapanje sa kliničkom prezentacijom kod pacijenta (Maver *et al.*, 2016).

Sekvenciranje “kliničkog egzoma” se danas koristi u brojnim laboratorijama i medicinskim centrima, međutim u literaturi ne postoji dovoljno podataka o stopi detekcije

ove metodologije kod određenih grupa pacijenata, odnosno za određene, konkretne bolesti. Do danas su sprovedena tri istraživanja, koja su uključila pacijente sa različitim neurorazvojnim bolestima i širokim spektrom težine intelektualnih poteškoća, koja su pokazala stopu detekcije sekvenciranjem “kliničkog egzoma” od oko 30% (Chérot *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). Kod pacijenata sa epilepsijom sekvenciranjem “kliničkog egzoma” je postignuta stopa detekcije uzročnih varijanti od 36% (Yang *et al.*, 2014). *Tru Sight One Sequencing* panel se pokazao kao uspešan i kod pacijenata sa bolestima taloženja glikogena (Vega *et al.*, 2016), torakalnim aortnim aneurizmama i disekcijama (Poninska *et al.*, 2016), kao i u velikim kohortama neselektovanih pacijenata sa Mendelovskim bolestima (Pajusalu *et al.*, 2018). Stopa detekcije u ovim studijama se kreće od 26,3% kod neselektovanih pacijenata (Pajusalu *et al.*, 2018), do 35,3% kod pacijenata sa torakalnim aortnim aneurizmama i disekcijama (Poninska *et al.*, 2016). Nedavno sprovedeno istraživanje ukazuje da se sekvenciranjem “kliničkog egzoma” kod pacijenata sa neuromišićnim bolestima može postići veoma visoka stopa detekcije od 62,9% (Börklü-Yücel *et al.*, 2020).

Sekvenciranje “kliničkog egzoma” se pokazalo kao dobar dijagnostički pristup, jer osim prihvatljivije cene ima i niz drugih prednosti kao što je manje podataka za analizu i manja verovatnoća detekcije slučajnih nalaza u poređenju sa sekvenciranjem celog egzoma/genoma, kao i veća dijagnostička moć u poređenju sa genskim panelima (Okazaki *et al.*, 2016; Chérot *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018) Ipak, dodatne studije su neophodne kako bi podržale njegovu upotrebu u dijagnostici zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća i drugih bolesti.

1.5.3. Sekvenciranje celog egzoma

Sekvenciranje celog egzoma podrazumeva sekvenciranje skoro svih egzona i kanonskih mesta iskrajanja introna, odnosno ukupno oko 2% genoma čoveka (Clark *et al.*, 2018). Sekvenciranjem celog egzoma kod pacijenata sa neurorazvojnim bolestima opisana je stopa detekcije od 30% do 50% (Wright *et al.*, 2015; Kuperberg *et al.*, 2016; Bowling *et al.*, 2017).

Brojnim studijama sekvenciranja celog egzoma potvrđen je značaj dominantnih *de novo* mutacija kod pacijenata sa teškim intelektualnim poteškoćama. Već su dve rane studije izvedene 2012. godine pokazale da *de novo* genske alteracije, u tom trenutku poznatih gena uzročnika teškog intelektualnog zaostajanja, leže u osnovi bolesti kod 13-35% pacijenata (de Ligt *et al.*, 2012; Rauch *et al.*, 2012) Sličan rezultat od 29%, postignut je u studiji pacijenata sa srednje teškim do teškim intelektualnim zaostajanjem (Hamdan *et al.*, 2014) Velika studija trio sekvenciranja celog egzoma na 1133 dece sa teškim nedijagnostikovanim razvojnim bolestima (od kojih 87% ima zaostajanje u razvoju ili intelektualne poteškoće) pokazala je stopu detekcije od 18% za poznate gene za intelektualne poteškoće (Wright *et al.*, 2015). Neslaganja u stopi detekcije između studija postoje zbog razlika u načinu odabira pacijenata, interpretaciji varijanti i platforme koja je korišćena.

Sekvenciranje celog egzoma se naširoko koristi u kliničkoj praksi, između ostalog i zbog značajno niže cene analize u odnosu na sekvenciranje celog genoma. Istraživanja su pokazala da upotreba sekvenciranja celog egzoma, rano u procesu dijagnostičke evaluacije pacijenta, omogućava značajnu uštedu resursa i poboljšanu stopu detekcije u poređenju sa tradicionalnim genetičkim i negenetičkim testovima (Clark *et al.*, 2018).

1.5.4. Sekvenciranje celog genoma

Sekvenciranje celog genoma podrazumeva sekvenciranje svih egzona, introna i regulatornih sekvenci što čini oko 90% genoma (Clark *et al.*, 2018).

Prva pilot studija genomskog sekvenciranja je pokazala da se ovom metodologijom može postaviti dijagnoza kod 60% pacijenata sa teškim intelektualnim zaostajanjem. Sve identifikovane uzročne varijante su bile *de novo*, i to 39% tačkastih varijanti i 21% strukturnih varijanti (Gilissen *et al.*, 2014). Međutim, nakon ove studije, publikovan je mali broj istraživanja koja ispituju kliničku i dijagnostičku moć ove metode kod dece sa genetičkim bolestima (Clark *et al.*, 2018). Rane studije su pokazale da se kod pacijenata sa negativnim nalazom sekvenciranja celog egzoma, sekvenciranjem celog genoma može postaviti dijagnoza u 42% slučajeva (Gilissen *et al.*, 2014). Studija koju su sproveli

Alfares i saradnici 2018. godine imala je za cilj da utvrdi razliku između stope detekcije sekvenciranja celog egzoma i sekvenciranja celog genoma. Sekvenciranje celog genoma je rađeno kod 108 pacijenata sa negativnim nalazom analiza molekularnog kariotipa i sekvenciranja celog egzoma. Čak 30% pozitivnih nalaza sekvenciranja celog genoma moglo je biti potvrđeno ponovnom analizom sirovih podataka sekvenciranja celog egzoma, iz čega je izveden zaključak da je stopa detekcije uzročnih varijanti veća za dodatnih 7% u korist sekvenciranja celog genoma (Alfares *et al.*, 2018). Meta-analiza Klark i saradnika ukazuje da ne postoji razlika u dijagnostičkoj moći između sekvenciranja celog egzoma i sekvenciranja celog genoma (Clark *et al.*, 2018).

Sekvenciranje celog genoma omogućava detekciju varijanti van domašaja sekvenciranja celog egzoma, kao što su intronske tačkaste mutacije, tačkaste mutacije prisutne u nekodirajućim RNK, male promene u broju kopija i mitohondrijalne mutacije, kao i one egzonske tačkaste mutacije koje nisu detektovane sekvenciranjem celog egzoma. Vremenom, sposobnost interpretacije dubokih intronskih varijanti i drugih nekodirajućih varijanti će rasti, povećavajući stopu detekcije sekvenciranja celog genoma u odnosu na sekvenciranje celog egzoma. Jedna nedavno sprovedena studija je pokazala da detekcija ovih varijanti omogućava porast stope detekcije sekvenciranja celog genoma za čak 36% (Eldomery *et al.*, 2017). Poslednja istraživanja pokazuju i da sekvenciranje celog genoma ima veću analitičku senzitivnost za promene u broju kopija i strukturne varijacije u odnosu na analizu molekularnog kariotipa (naročito strukturne varijacije manje od 10,000 nukleotida) (Noll *et al.*, 2016; Stavropoulos *et al.*, 2016; Lionel *et al.*, 2018), ukazujući na veliki potencijal sekvenciranja celog genoma. Sa druge strane, velika meta-analiza je pokazala da ne postoji značajna razlika u dijagnostičkoj moći između sekvenciranja celog egzoma i sekvenciranja celog genoma (Clark *et al.*, 2018).

1.6. Značaj postavljanja uzročne dijagnoze

Otkrivanje genetičkog uzroka bolesti kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama je od izuzetnog značaja jer omogućava:

- uvid u očekivani klinički tok bolesti i prognozu
- informisanje pacijenta o načinu lečenja, mogućnostima ublažavanja simptoma i prevencije očekivanih komplikacija
- specifičnu terapiju bolesti ukoliko postoji
- optimizaciju dijagnostičkog i terapijskog postupka, poput izbegavanja nepotrebnih dijagnostičkih testova
- lakše prihvatanje bolesti i donošenje boljih odluka u oblasti edukacije, profesionalne orijentacije i socijalnih integracija
- informisanje pacijenta o genetičkim mehanizmima nastanka bolesti, riziku za rekurenciju i genetičkom aspektu planiranja porodice
- pristup istraživačkim protokolima lečenja (Moeschler *et al.*, 2014).

Osim koristi za pacijenta, rano postavljanje dijagnoze je i od velikog javno zdravstvenog značaja jer omogućava uštedu zdravstvenih resursa. Procenjeno je da direktni i indirektni životni troškovi pacijenta sa intelektualnim poteškoćama iznose oko milion američkih dolara (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004).

1.7. Specifična terapija neurorazvojnih bolesti

Specifična terapija intelektualnih poteškoća nije moguća kod većine pacijenata s obzirom da je na biološke procese koji se nalaze u osnovi bolesti veoma teško uticati, kao i zbog činjenice da su promene na nervnim ćelijama u značajnoj meri ireverzibilne. Intervencije se uglavnom odnose na minimizaciju komplikacija i komorbiditeta.

Uspešna specifična terapija postoji samo za one pacijente kod kojih je intelektualno zaostajanje posledica urođene metaboličke bolesti, a koji čine do 6% svih pacijenata sa intelektualnim poteškoćama (Ali *et al.*, 2017).

Najnovija istraživanja ukazuju da postoji potencijal za razvoj novih terapija i za druge pacijente sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, poput pacijenata čiji uzročni geni imaju ulogu u modifikaciji histona. Na primer, u osnovi Kabuki sindroma su *KMT2D* i *KDM6A* geni koji imaju ulogu u regulisanju otvorenog i zatvorenog stanja

hromatina (Ng *et al.*, 2010; Miyake *et al.*, 2013). Na mišjim modelima je pokazano da gubljenje pamćenja može biti sprečeno, ili čak reverzibilno, upotrebom lekova koji utiču na modifikaciju histona favorizujući otvoreno stanje hromatina (Bjornsson *et al.*, 2014). Postoji indicija da se terapija HDAC (engl., *histone deacetylase*) inhibitorima može koristiti i za druge genetičke bolesti čiji geni imaju ulogu u histonskoj modifikaciji (Berdasco and Esteller, 2013).

Fokus novijih istraživanja su centralne komponente signalnih puteva čiji se geni nalaze u osnovi različitih genetičkih bolesti. Na primer, GABAergički sistem, poremećen kod sindroma fragilnog X, Retovog sindroma, MECP2 duplikacionog sindroma i Draveovog sindroma, glavni je kandidat za razvijanje terapije ovih bolesti (Braat and Kooy, 2015). Istraživanja MECP2 duplikacionog sindroma na mišijim modelima su pokazala da hronično izlaganje niskim dozama antagonista GABA_A receptora, ublažava specifični ponašajni fenotip, uključujući motornu koordinaciju, nedostatke u pamćenju i sinaptički plasticitet (Na *et al.*, 2014). GABAergički sistem se ispituje i u okviru kliničkih studija (Braat and Kooy, 2015).

U nedavno sprovedenoj studiji postignuto je značajno poboljšanje ponašanja pacijenata sa sindromom fragilnog X nakon terapije metforminom (Dy *et al.*, 2018). Metformin je antidijabetični lek koji deluje preko AMPK (engl., *adenosine monophosphate-activated protein kinase*)-zavisnih i AMPK-nezavisnih mehanizama, mada još uvek nije poznat precizan mehanizam njegovog delovanja (Gantois *et al.*, 2019). Osim metformina, za terapiju sindroma fragilnog X postoje dodatni kandidatni lekovi (Van Karnebeek *et al.*, 2016) koji su zajedno sa potencijalnim terapijama za druge neurogenetičke razvojne bolesti prikazani u Tabeli 1.

Pre razvijanja novih terapija, ostaje zadatak da se otkriju često ometeni signalni putevi i mreže, s obzirom da su intelektualne poteškoće previše heterogene da bi se razvijala terapija za svaki pojedinačni gen.

Tabela 1. Potencijalne specifične terapije neurogenetičkih razvojnih bolesti

Neurogenetička bolest	Potencijalni lek	Mehanizam delovanja	Referenca
Sindrom fragilnog X	Litijum	Inhibira GSK3B signalizaciju i konverziju fosfatidilinozitola	(Liu and Smith, 2014)
	AFQ056	mGluR5 antagonist, smanjuje mGluR5 regulisanu aktivaciju translacije u dendritima	(Levenga <i>et al.</i> , 2011)
	RO4917523	mGluR5 antagonist, smanjuje mGluR5 regulisanu aktivaciju translacije u dendritima	(Jaeschke <i>et al.</i> , 2015)
	Arbaklofen	GABA-B agonist, smanjuje presinaptičko otpuštanje glutamata	(Berry-Kravis <i>et al.</i> , 2017)
	Minociklin	Redukuje pojačanu aktivnost MMP-9 koja nastaje kao posledica disregulacije zbog odsustva FMRP	(Utari <i>et al.</i> , 2010)
	Ganaksolon	GABA-A agonist, povećava smanjenu GABA signalizaciju	(Ligsay <i>et al.</i> , 2017)
	Akamprosot	GABA-A/B agonist	(Schaefer <i>et al.</i> , 2017)
	NNZ-2566	Inhibira pojačanu aktivnost ERK/Akt	(Deacon <i>et al.</i> , 2015)
Metadoksin	Inhibira pojačanu aktivnost ERK/Akt	(A. W. Lee <i>et al.</i> , 2018)	
Lovastatin	Inhibira ERK signalni put	(Çaku <i>et al.</i> , 2017)	
Daunov sindrom	RG1662	GABA α 5 receptor inverzni agonist, inhibira pojačanu GABA signalizaciju	(Contestabile <i>et al.</i> , 2017)
Retov sindrom	Mekasermin (rhIGF-1)	Aktivira Akt signalni put	(O'Leary <i>et al.</i> , 2018)
	NNZ-2566	Reguliše Akt signalni put	(Deacon <i>et al.</i> , 2015)
	Fingolimod	Povećava BDNF vezivanjem za S1P receptore	(Gogliotti and Niswender, 2019)
	Glatiramer acetat	Povećava BDNF	(Nissenkorn <i>et al.</i> , 2017)
Tuberozna skleroza	Everolimus	Inhibira pojačanu mTOR aktivnost	(Lechuga and Franz, 2019)
Neurofibromatoza	Everolimus	Inhibira pojačanu mTOR aktivnost	(Slopis <i>et al.</i> , 2018)
	Lovastatin	Inhibira ERK signalni put	(Payne <i>et al.</i> , 2016)
Angelmanov sindrom	Minociklin	Povećava LTP	(Ruiz-Antoran <i>et al.</i> , 2018)
Prader-Vilijev sindrom	Oksitocin	Deficitaran je u oksicitonskim neuronima	(Rice <i>et al.</i> , 2018)

1.8. Preklapanje fenotipa neurorazvojnih bolesti

Neurorazvojne bolesti su neurološke bolesti ranog početka, uključujući intelektualne poteškoće, bolesti iz spektra autizma (engl., *autism spectrum disorder*, ASD), poremećaje govora, epilepsiju, i druge (Tărlungeanu and Novarino, 2018).

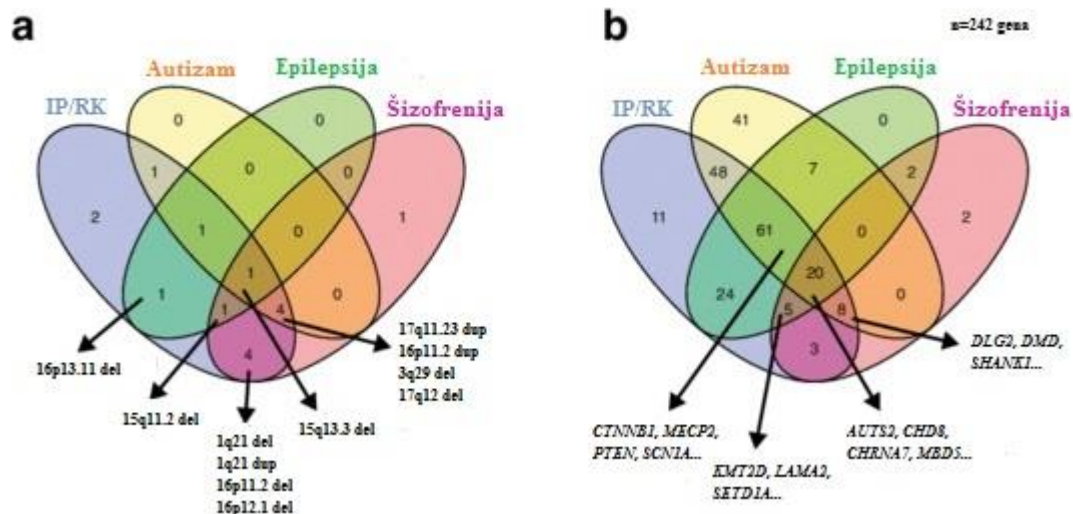
Autizam se karakteriše ranom disfunkcijom socijalnih interakcija, deficita u komunikaciji i prisustvu repetitivnih i ograničenih oblika ponašanja (Elsabbagh *et al.*, 2012). Kao i u slučaju intelektualnih poteškoća, autizam može biti izolovan ili u okviru sindroma (npr. Retov sindrom, sindrom fragilnog X, tuberozna skleroza) (Tărlungeanu and Novarino, 2018). Ulogu u nastanku autizma imaju genetički i sredinski faktori (Kim and Leventhal, 2015). Pacijenti sa autizmom često imaju epilepsiju i motoričke probleme, a intelektualne poteškoće ima čak 70% njih (Fombonne, 2002).

Glavne kliničke manifestacije autizma i intelektualnih poteškoća se često ispoljavaju zajedno sa epilepsijom. Značaj genetike u nastanku epilepsije prepoznat je pre dvadesetak godina, i do danas je otkriveno skoro 1000 gena koji su uzročnici, ili vrlo verovatni uzročnici epilepsije (Wang *et al.*, 2017). Procenjeno je da u preko 50% slučajeva epilepsija ima genetičku etiologiju koja je izrazito heterogena (Pal *et al.*, 2010). Genske alteracije mogu uzrokovati isključivo epilepsiju ili sindrome kod kojih je epilepsija glavna karakteristika, kao što je u slučaju *SCN1A* gena koji je u asocijaciji sa epilepsijom sa febrilnim napadima (Meng *et al.*, 2015). Alteracije gena mogu biti asocirane i sa razvojnim malformacijama mozga i epilepsijom, kao što su alteracije *TSC1* i *TSC2* gena koji su u osnovi tuberozne skleroze (Nellist *et al.*, 2009). Epilepsija se takođe može javiti i u okviru drugih genetičkih bolesti koje pogađaju centralni nervni sistem, kao što je sindrom fragilnog X i mioklonična distonija (Wang *et al.*, 2017). Procenjeno je da je prevalenca epilepsije kod dece za zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama čak 22,2% (Kessi *et al.*, 2018). Deca koja imaju i zaostajanje u razvoju/intelektulane poteškoće i epilepsiju imaju 3,3 puta veću stopu mortaliteta od one dece koja imaju zaostajanje u razvoju/intelektualne poteškoće bez epilepsije (Robertson *et al.*, 2015).

Visoka stopa komorbiditeta između neurorazvojnih bolesti se može objasniti zajedničkom genetičkom etiologijom, odnosno postojanjem zajedničkih molekularnih

puteva (Jensen and Girirajan, 2017). Literaturni podaci ukazuju da nasleđivanje jedne neurorazvojne bolesti u nekoj porodici, povećava rizik za obolevanje njenih članova od drugih neurorazvojnih bolesti. Na primer, osobe čiji srodnik ima šizofreniju, imaju povećan rizik za nastanak bipolarnu bolest, depresije ili autizma u poređenju sa opštom populacijom (Kendler, 2010). Do danas su opisane brojne pojedinačne nukleotidne varijante i promene u broju kopija koje su asocirane sa multiplim fenotipovima. Na primer, strukturne varijante i varijante pojedinačnih nukleotida *NRXN1* gena su asocirane sa Pit-Hopkinsovim sindromom, intelektualnim poteškoćama, autizmom, ADHD (engl., *attention deficit hyperactivity disorder*) poremećajem, bipolarnim poremećajem, šizofrenijom i epilepsijom (Béna *et al.*, 2013). Slično tome, varijante *ADNP*, *CHD8*, *SCN2* i *PTCH1* gena su takođe asocirane sa spektrom neurorazvojnih bolesti (Bernier *et al.*, 2014; Helsmoortel *et al.*, 2014; Kim and State, 2014; Chaudhry *et al.*, 2015). Rekurentne promene u broju kopija, kao što su 1q21.2, 16p11.2, 17q12 i 22q11.2 su do danas opisane kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama, autizmom, šizofrenijom i epilepsijom (Moreno-De-Luca *et al.*, 2010; Cancrini *et al.*, 2014). Zajednička genetička etiologija neurorazvojnih bolesti je prikazana na Slici 2.

Pojedine varijante mogu imati različitu veličinu efekta kada su u pitanju različite neurorazvojne bolesti. Varijante sa većom veličinom efekta će pre biti uzročne, dok će varijante sa manjom veličinom efekta verovatno biti takozvane modifikujuće varijante koje modulišu fenotip u sadejstvu sa drugim varijantama. Ovakve varijante se često pojavljuju sa drugim poznatim patogenim varijantama kod obolelih osoba, a mogu biti prisutne i kod zdravih osoba (Jensen and Girirajan, 2017). Na primer, delecije *LRRC4C* gena su opisane zajedno sa drugim poznatim promenama u broju kopija kod osoba sa autizmom, iako sama varijanta nije uzročna za ovu bolest (Maussion *et al.*, 2017). Kombinovanje varijanti sa malom ili srednjom veličinom efekta, može biti često kod psihijatrijskih bolesti kao što su depresija ili bipolarni poremećaj, dok su varijante sa velikom veličinom efekta često uzročne i asocirane sa težim neurorazvojnim bolestima kao što su intelektualne poteškoće, autizam i šizofrenija (Jensen and Girirajan, 2017).



Slika 2. Zajednička genetička etiologija neurorazvojnih bolesti. **a.** Venov dijagram koji prikazuje asocijacije 16 retkih promena u broju kopija sa intelektualnim poteškoćama/razvojnim kašnjenjem (IP/RK), autizmom, epilepsijom i šizofrenijom. **b.** Venov dijagram koji prikazuje asocijacije 242 gena sa najmanje jednom identifikovanom LOF (engl., *loss of function*) varijantom ili delecijom celog gena u kohorti pacijenata sa neurorazvojnim bolestima. Preuzeto od (Jensen and Girirajan, 2017).

1.9. Preporuke i vodiči za testiranje pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama

Prema preporukama Američke akademije za pedijatriju (Moeschler *et al.*, 2014), dijagnostička evaluacija pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama (bez obzira na stepen zaostajanja) može da obuhvati sledeće korake:

1. Prikupljanje podataka iz lične i porodične anamneze u poslednje tri generacije, fizikalni i dismorfološki pregled, neurološka i razvojna ispitivanja.
2. U slučaju da je postavljena jasna klinička dijagnoza, pravljenje plana medicinskog praćenja i lečenja, omogućavanja podrške porodici, informisanje roditelja o mogućnostima lečenja i prognozi bolesti.
3. Potvrda specifične dijagnoze odgovarajućim genetičkim testom, kao što je sekvenciranje pojedinačnih gena ili analiza molekularnog kariotipa.

4. Ukoliko ne postoji sumnja na specifičnu kliničku dijagnozu, primenjuje se analiza molekularnog kariotipa kao prvi genetički dijagnostički test. Takođe, treba razmotriti metabolička testiranja i testiranje sindroma fragilnog X.
5. Ukoliko dijagnoza nije postavljena, kod pacijenata muškog pola naredni korak je genski panel za X-vezane bolesti ili visoko rezoluciona analiza molekularnog kariotipa X hromozoma, a kod pacijenata ženskog pola analiza *MECP2* gena (uključujući deleciono duplikacionu analizu i sekvenciranje).
6. Ukoliko pacijent ima mikrocefaliju, makrocefaliju ili neku drugu neurološku abnormalnost, radi se magnetna rezonanca mozga.
7. Ukoliko je magnetna rezonanca negativna ili normalna, preispituje se proces dijagnostičke evaluacije zajedno sa porodicom pacijenta.
8. Upućivanje pacijenta lekaru druge specijalnosti.
9. Dijagnostička reevaluacija i informisanje pacijenta i njegove porodice o načinima podrške.

Studije sekvenciranja celog egzoma i genoma sprovedene u poslednjih pet godina su pokazale da se ovom metodologijom mogu uspešno testirati deca sa suspektnim genetičkim bolestima (Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2015; Kuperberg *et al.*, 2016; Thevenon *et al.*, 2016; Vissers *et al.*, 2017). S obzirom da omogućavaju istovremenu analizu svih ili većine gena diferencijalne dijagnoze, ove metode su pokazale veliki potencijal za sveobuhvatniji i brži pristup dijagnostici genetičkih bolesti.

Velika meta-analiza, objavljena 2018. godine (Clark *et al.*, 2018), imala je za cilj da uporedi klinički i dijagnostički značaj sekvenciranja celog egzoma i genoma u odnosu na analizu molekularnog kariotipa kod dece uzrasta do 18 godina sa suspektnom genetičkom bolešću. Studija je obuhvatila 37 publikacija, objavljenih u periodu od januara 2011. do avgusta 2017. godine, koji uključuju 20,068 pacijenata. Rezultati ove meta-analize su pokazali da analiza molekularnog kariotipa ima značajno nižu stopu detekcije uzročnih varijanti u poređenju sa sekvenciranjem celog egzoma ili genoma. Da se sekvenciranjem egzoma postižu značajno veće stope detekcije u poređenju sa analizom molekularnog kariotipa kod pacijenata sa neurorazvojnim bolestima, potvrdila je i meta-analiza

sprovedena 2019. U ovoj studiji dobijena je dijagnostička moć sekvenciranja celog egzoma od 36% (Srivastava *et al.*, 2019).

I pored svega navedenog, konkretne i zvanične, opšteprihvaćene preporuke i smernice za upotrebu metoda sekvenciranja nove generacije još uvek ne postoje.

2. CILJEVI RADA

U ovom istraživanju su postavljeni sledeći ciljevi:

1. Utvrđivanje uzročnih varijanti u naslednom materijalu, njihovog tipa i učestalosti kod dece sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama.
2. Ispitivanje korelacije genotipa i fenotipa kod ispitanika sa identifikovanim uzročnim varijantama u naslednom materijalu.
3. Analiza korelacije kliničkih parametara i uzročnih varijanti identifikovanih analizom molekularnog kariotipa i sekvenciranjem „kliničkog egzoma“.
4. Kreiranje dijagnostičkog algoritma genetičkih analiza za pacijente sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

3.1.1. Odabir pacijenata i saglasnost za učešće u istraživanju

U ovo istraživanje je uključeno 220 pacijenata sa dijagnozom srednje teškog ili teškog zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća. Klinička evaluacija i genetičko testiranje pacijenata je sprovedeno od jula 2013. do januara 2018. godine. Svi pacijenti su pregledani i praćeni od strane kliničkog genetičara Službe za kliničku genetiku, Univerzitetske dečje klinike (UDK). Optimizacija MLPA metode i izvođenje analiza je urađeno na Institutu za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“ (*Tru Sight One Sequencing* panel (*Illumina*, San Dijego, Kalifornija)), je izvedeno u saradnji sa Centrom za mendelovsku genomiku, Kliničkog instituta za medicinsku genetiku iz Ljubljane. Analiza molekularnog kariotipa je urađena u Institutu za humanu genetiku, Medicinskog fakulteta u Beogradu (Human CGH+SNP ISCA Microarray kit 4x180K (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija)); i laboratoriji Qgenomics, Barselona, Španija (qChip Post Agilent based CGH Microarray 60K (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija)). FISH analiza je izvedena u laboratoriji Qgenomics, Barselona, Španija.

Kriterijumi za učešće pacijenata u studiji su:

1. Prisustvo srednje teškog ili teškog zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća sa ili bez propratnih patoloških stanja (kongenitalnih malformacija, neuroloških znakova, autizma i drugog),
2. Normalan nalaz analize kariotipa,
3. Normalan nalaz analize sindroma fragilnog X kod pacijenata muškog pola koji imaju kliničke karakteristike sindroma fragilnog X ili čija porodična anamneza ukazuje na X-vezani obrazac nasleđivanja

4. Normalan nalaz drugih genetičkih testiranja ukoliko su bila sprovedena kod pacijenta (sekvenciranje pojedinačnih gena, MLPA analiza mikrodelecionih sindroma i drugo).

Testiranje je rađeno i kod roditelja pacijenata sa ciljem:

- utvrđivanja statusa nosioca balansirano hromozomskog rearanžmana (recipročne ili insercione translokacije) u slučaju identifikacije patogene delecije/duplikacije kod pacijenta,
- utvrđivanja statusa nosioca i porekla varijante (nasleđena ili *de novo*) u slučaju identifikacije patogene/verovatno patogene genske varijante kod pacijenta,
- utvrđivanja značaja detektovane varijante u smislu određivanja njene uzročnosti u slučaju identifikacije varijante nepoznate značajnosti (delecije/duplikacije ili genske varijante) kod pacijenta.

Roditelji/staratelji svih pacijenata su, nakon detaljnog informisanja o istraživanju, potpisali saglasnost za učešće pacijenata u studiji. Objasnjeno im je da u svakom trenutku mogu povući saglasnost i prekinuti učešće u studiji. Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Univerzitetske dečje klinike (odluka doneta 18.12.2015., org.jed. 017/6, broj 26/357) kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka doneta 13.03.2017., broj 29/III-7).

3.1.2. Biološki materijal

Molekularno-citogenetička i molekularno-genetička testiranja (MLPA, analiza molekularnog kariotipa i sekvenciranje „kliničkog egzoma“) su rađena na genomskoj DNK izolovanoj iz uzorka periferne krvi ispitanika uzete na natrijum citratu (4,5ml krvi). Za pripremu citogenetičkih preparata u cilju izvođenja FISH analize uzimani su uzorci periferne krvi na heparinu (6 ml krvi).

3.2. Metode

3.2.1. Kliničko ispitivanje

Klinička evaluacija svih pacijenata je sprovedena pre i posle genetičkih testiranja. Klinički parametri i demografski podaci koji su beleženi za svakog pacijenta uključili su sledeće:

- datum rođenja
- pol
- uzrast u trenutku započinjanja genetičkog ispitivanja
- prenatalne i perinatalne komplikacije
- intrauterino zaostajanje u rastu (porođajna masa, dužina i obim glave)
- poremećaji postnatalnog rasta (masa, dužina/visina, obim glave)
- kraniofacijalni i drugi manji (engl., *minor*) dismorfizmi (na osnovu pedijatrijskog i dismorfološkog pregleda)
- stepen zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća (miljokazi motornog razvoja, razvoj ekspresivnog i receptivnog govora, socijalna adaptacija, psihološko testiranje)
- prisustvo/odsustvo krupnih (engl., *major*) urođenih anomalija (na osnovu pedijatrijskog pregleda i slikovne dijagnostike)
- neurološki znaci (hipotonija, hipertonija, epilepsija)
- autizam
- porodična anamneza u poslednje tri generacije

Značajnim zaostajanjem u obimu glave, longitudinalnom i ponderalnom rastu je smatrano svako zaostajanje ispod dve standardne devijacije. *Major* manama su smatrane sve strukturne promene koje imaju značajne medicinske, socijalne ili estetske posledice i obično zahtevaju medicinsku intervenciju (npr. rascep usne, srčana mana i drugo). Klasifikacija *minor* mana je vršena na osnovu priručnika za praćenje urođenih defekata

Svetske zdravstvene organizacije (engl., *World health organisation*, WHO) (WHO/CDC/ICBDSR, 2014).

3.2.2. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK je izolovana iz leukocita periferne krvi ispitanika metodom isoljavanja po Milleru (Miller *et al.*, 1988). Metoda se zasniva na osobini proteina da se talože u rastvorima sa visokom koncentracijom soli po čemu je i dobila ime. Za izolaciju DNK su korišćeni uzorci od 5 ml venske krvi na natrijum citratu. U prvom koraku vrši se mešanje uzorka krvi pacijenta sa istom količinom pufera za lizu (0.32 M Saharoza, 10 mM TRIS HCl, 1% triton, 5 mM MgCl₂), nakon čega se ostavlja na +4°C u trajanju od 20 minuta. Zatim se vrši centrifugiranje na 2000 obrtaja u trajanju od 15 minuta, čime se postiže odvajanje leukocita u vidu precipitata. Supernatant se odbacuje a talog resuspenduje u 10 ml fiziološkog pufera (0.075 M NaCl, 0.025 M EDTA pH8). Uzorak se centrifugira na 2000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Postupak centrifugiranja se ponavlja tri puta. Nakon završenog trećeg centrifugiranja, supernatant se odbacuje a talogu se doda 3 ml pufera A (10 mM TRIS HCl, 400 ml NaCl, 2 mM EDTA), 50 µl 10% proteinaze K i 200 µl 10% SDS (Na-dodecilsulfat). Nakon temeljnog resuspendovanja, vrši se inkubacija preko noći na 37°C. Sutradan se dodaje 1 ml 6 M NaCl, i nakon mešanja centrifugira na 3000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Posle prenošenja u čistu epruvetu supernatant se centrifugira na 4000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Veoma pažljivo, supernatant se prenosi u graduisanu epruvetu i doliva se ista količina izopropanola. Nakon mućkanja u uzorku se vizualizuje beličasti končić DNK koji se pokupi staklenim štapićem i potopi 30 sekundi u 70% etanol. DNK se ostavi da se osuši na vazduhu. U poslednjem koraku DNK se rastvara u 300 µl redestilovane vode.

3.2.3. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK

U cilju određivanja količine uzorka rastvorene DNK koja će se koristiti za molekularno-genetičke analize, neophodno je odrediti koncentraciju genomske DNK u

uzorku, kao i njenu čistoću nakon izolacije. Koncentracija i čistoća izolovane genomske DNK određivana je spektrofotometrijskom metodom na aparatu BioPhotometer (proizvođač *Eppendorf*, Nemačka). Spektrofotometrijska metoda se zasniva na specifičnoj apsorpciji svetlosti ispitivane supstance u UV oblasti, odnosno merenju količine svetlosti koju neka supstanca apsorbuje na određenoj talasnoj dužini. Maksimum svetlosti koju nukleinske kiseline apsorbuju je na talasnoj dužini od 260 nm, tako da količina apsorbovane svetlosti na toj talasnoj dužini odgovara koncentraciji DNK u ispitivanom uzorku. Čistoću samog uzorka DNK je moguće odrediti zahvaljujući tome što na različitim talasnim dužinama UV spektra svetlost apsorbuju i druge supstance koje se potencijalno nalaze u uzorku. U prvom koraku spektrofotometrijskog određivanja koncentracije i kvaliteta DNK 5 µl uzorka DNK se razblažuje u redestilovanoj vodi u odnosu 1:10. Nakon podešavanja spektrofotometra za merenje dvolančane DNK, u plastičnu kivetu se nanosi 50 µl redestilovane vode i meri njena apsorbanca. Redestilovana voda je rastvarač i podešena je na aparatu kao „*blank*“. Nakon toga, u plastičnu kivetu se nanosi 50 µl razblaženog uzorka DNK. Na aparatu se prikazuje izmerena apsorbanca uzorka i njegova koncentracija. Nakon merenja apsorbanca, osim izračunate koncentracije DNK, dobija se i podatak o odnosu apsorbanca na 260 nm i 280 nm (apsorpcija od strane fenola i proteina), zatim na 230 nm (apsorpcija od strane fenolnih anjona, tiocijanata i peptida) i 260 nm, kao i apsorbanca na 340 nm (prisustvo soli u uzorku). Ukoliko je uzorak DNK dobrog kvaliteta odnos A_{260}/A_{280} treba da bude između 1,8 i 2,0, dok odnos A_{230}/A_{260} treba da bude manji od 0,5. Apsorbanca izmerena na 340 nm (A_{340}) treba da bude što bliža nuli.

3.2.4. Višestruko umnožavanje proba zavisno od ligacije (MLPA)

Detekcija delecija i duplikacija subtelomernih regiona hromozoma vršena je MLPA metodom koja je osmišljena kao metoda za detekciju kvantitativnih promena u genomu (Schouten *et al.*, 2002). Može se koristiti za determinaciju relativnog broja kopija čak i do 60 različitih DNK sekvenci istovremeno, i to u samo jednoj reakciji lančane polimerizacije, a nakon hibridizacije specifičnih proba.

Jedinstvenost MLPA metode se ogleda u tome što omogućava amplifikaciju velikog broja specifičnih DNK sekvenci koristeći samo jedan par prajmera. Za svaku sekvencu je dizajnirana specifična proba tako da se sastoji od dva odvojena oligonukleotida koji se moraju spojiti u jednu kompletnu probu kako bi došlo do amplifikacije. Pomenuto spajanje delova probe vrši enzim ligaza. Probe koje nisu u celini hibridizovale sa odgovarajućom sekvencom DNK uzorka se neće amplifikovati. Istovremena amplifikacija svih proba omogućena je postojanjem identičnih sekvenci na njihovim 5' i 3' krajevima. Zahvaljujući dodatnim sekvencama koje se umeću prilikom dizajniranja proba (između sekvence za vezivanje prajmera i oligonukletida koji se vezuje za DNK), svaka MLPA proba ima jedinstvenu dužinu (od 130 do 500 bp). Ciljane sekvence DNK za koje hibridizuju probe su duge oko 60 baznih parova.

Nakon PCR reakcije, produkti, odnosno amplifikovane probe se primenom kapilarne elektroforeze razdvajaju po dužini i kao rezultat se dobija elektroferogram. Vizuelizacija fragmenata je omogućena time što je jedan od prajmera za PCR fluorescentno obeležen. Dobijeni podaci se analiziraju Coffalizer.Net softverom. Izračunava se relativni odnos proba u testiranom uzorku prema referentnom uzorku i prikazuje na grafikonu, poređano prema hromozomskoj lokaciji.

Za detekciju duplikacija i delecija subtelomernih regiona svih hromozoma korišćeni su kitovi SALSA MLPA P036 i SALSA MLPA P070 (proizvođač *MRC-Holland*, Holandija). MLPA reakcija je pripremana i izvođena prema uputstvima i preporučenom protokolu od strane proizvođača MRC-Holland. Protokol koji je korišćen je namenjen izvođenju svih reakcija u jednoj tubi (engl., *one-tube-protocol*), dok se sama procedura i program u PCR aparatima izvodi u dva dana. Prvog dana se vrši denaturacija DNK i hibridizacija proba koja traje tokom noći, a drugog dana ligacija proba i njihova PCR amplifikacija.

Denaturacija oko 100 ng DNK sadržane u 5 µl uzorka DNK rastvorenog u redestilovanoj vodi, se vrši na 98°C u trajanju od 5 minuta. Nakon denaturacije uzorci se hlade na 25°C i u svaki se dodaje 3 µl hibridizacione smeše (1,5 µl MLPA pufera (KCl, Tris-HCl, EDTA i PEG-6000. pH 8.5) i 1,5 µl smeše proba (sintetički oligonukleotidi ili oligonukleotidi prečišćeni iz bakterija, Tris-HCl, EDTA. pH 8.0)). Uzorci se inkubiraju na

95°C u trajanju jednog minuta i nakon toga ostavljaju na 60°C u trajanju od 16 do 20 sati (preko noći).

Narednog dana, temperatura uzoraka se spušta na 54°C i dok su uzorci još uvek u aparatu u svaki se dodaje po 32 µl ligacione smeše (25 µl redestilovane vode, 3 µl ligacionog pufera A (NAD bakterijskog porekla, pH 3.5), 3 µl ligacionog pufera B (Tris-HCl, nejonski deterdžent, MgCl₂. pH 8.5), 1 µl smeše Ligase-65 (Glycerol, BRIJ (0.05 %), EDTA, Beta-Mercaptoethanol (0.1%), KCl, Tris-HCl. pH 7.5, Ligase-65 enzim bakterijskog porekla)). Uzorci se inkubiraju na 54°C u trajanju od 15 minuta. Reakcija se prekida temperaturom od 98°C u trajanju od 5 minuta, nakon čega se uzorci hlade na 20 °C.

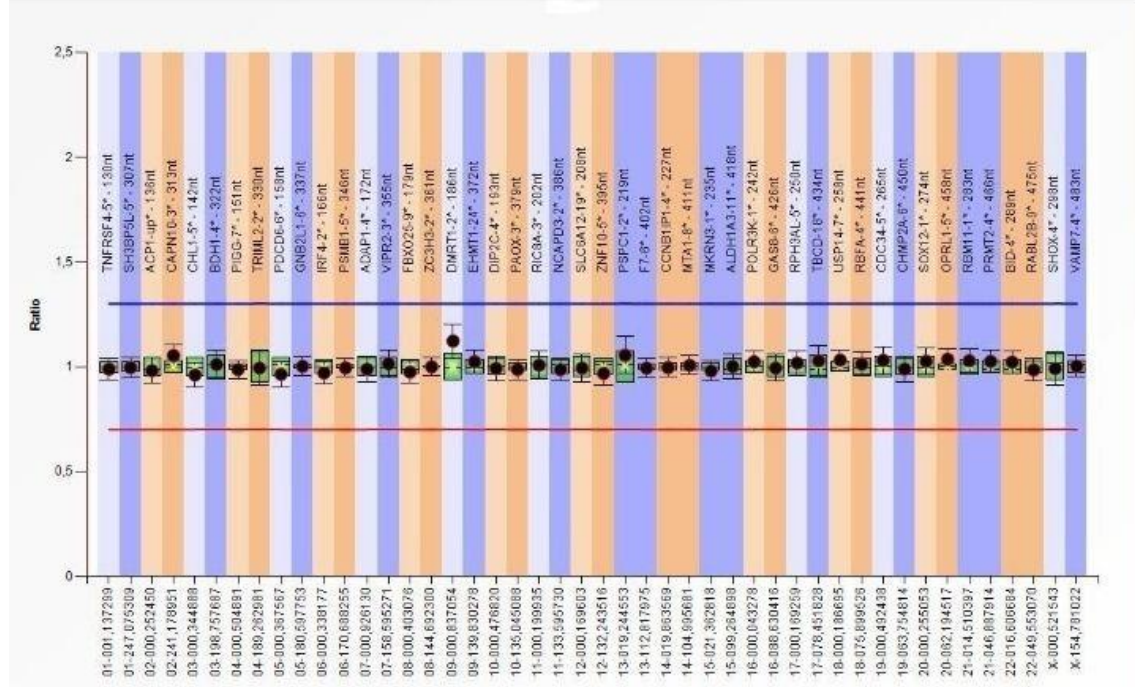
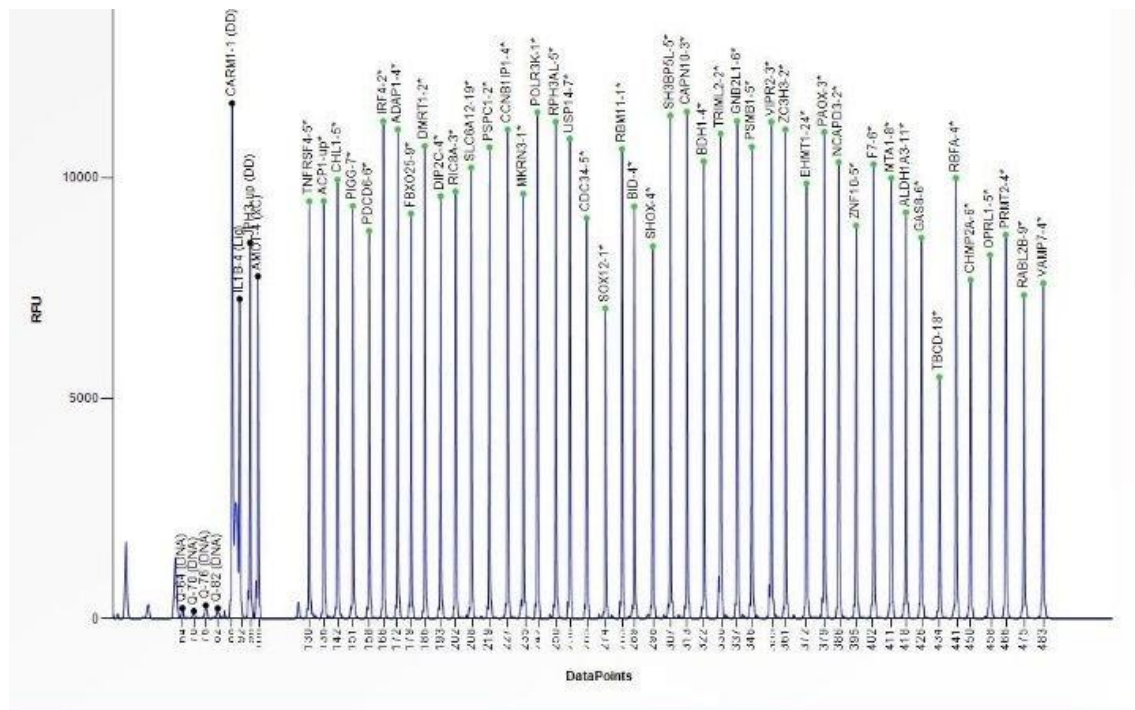
Na sobnoj temperaturi, u svaki uzorak se naliva 10 µl PCR smeše (7,5 µl redestilovane vode, 2 µl SALSA PCR smeše prajmera (sintetički oligonukleotidi od kojih je jedan fluorescentno obeležen FAM, dNTPs, Tris (HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0.04 %), pH 8.0) i 0,5 µl SALSA polimeraze (Glicerol, BRIJ (0.5 %), EDTA, DTT (0.1 %), KCl, Tris-HCl, polimeraza enzim bakterijskog porekla, pH 7.5)). PCR reakcija se izvodi u 35 ciklusa denaturacije na 95°C u trajanju od 30 sekundi, hibridizacije na 60°C u trajanju od 30 sekundi i elongacije na 72°C u trajanju od jednog minuta. Nakon poslednjeg ciklusa, finalna elongacija se vrši na 72°C, u trajanju od 20 minuta i potom se uzorci hlade na 15°C. Nakon završene PCR reakcije uzorci se čuvaju na temperaturi od 4°C, zaštićeni od svetla, maksimalno 7 dana. Reakcija MLPA je vršena u aparatu Veriti (proizvođač *Life Sciences*, SAD).

Nakon završene MLPA reakcije, uzorci se pripremaju za kapilarnu elektroforezu. Dužina fragmenata koji se analiziraju se određuje u odnosu na standard koji se pre izvođenja kapilarne elektroforeze meša sa uzorkom, i to 0,7 µl produkta MLPA reakcije, 0,3 µl standarda za veličinu (GeneScan™ - 500 LIZ, proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD) i 9 µl formamida (*HiDi Formamide*, proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). U prvom koraku ova smeša se denuriše na 80°C u trajanju od 2 minuta, nakon čega se ostavlja da se ohladi na 4 °C. Razdvajanje uzoraka kapilarnom elektroforezom je vršeno na aparatu ABI 3500 Genetic Analyzer (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). Prilikom izvođenja analize, injekciono vreme je bilo 15 sekundi, injekciona voltaža – 1,6 kV, voltaža elektroforeze – 10

kV, trajanje elektroforeze – 3000 sekundi. Kapilara koja je korišćena je bila dužine 50 cm, a polimer POP-7, na temperaturi od 60°C. Za podešavanje uslova elektroforeze, upravljanje i kontrolu procesa, kao i prikupljanje neobrađenih podataka korišćen je softver 3500 Data Collection verzija 1.0 (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD).

Za analizu rezultata kapilarne elektroforeze korišćen je softver Gene Mapper verzija 4.1. (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). Dalja analiza, kao i interpretacija rezultata je vršena primenom softvera Coffalyser.Net verzija 9 (proizvođač *MRC-Holland*, Holandija). Primer normalnog rezultata MLPA analize je prikazan na Slici 3. Primeri patoloških rezultata MLPA analize dati su u poglavlju Rezultati.

Prilikom izvođenja MLPA analize korišćeni su kontrolni uzorci, i to po jedan kontrolni uzorak na sedam uzoraka pacijenata, a najmanje tri kontrolna uzorka. Kao kontrolni uzorci su korišćene DNK zdravih osoba, bez urođenih anomalija i intelektualnih poteškoća. Relativna visina pika (engl., *relative peak heights*, RPH) svake probe u uzorku je poređena sa relativnom visinom pika referentnih uzoraka, pokazujući relativni broj kopija analizirane sekvence u DNK uzorku. RPH za svaku probu se dobija tako što se visina pika te probe normalizuje prema kombinovanim visinama kontrolnih proba u uzorku. U slučaju postojanja delecije, visina pika je smanjena, i tada relativni odnos pikova ima vrednost 0,5 (u rasponu od 0,4 do 0,65). U slučaju duplikacije, visina pika je povećana, i tada relativan odnos pikova ima vrednost 1,5 (u rasponu od 1,3 do 1,65). U slučaju da je prisutna normalna doza analizirane sekvence, ova vrednost je približno 1 (u rasponu od 0,8 do 1,2).



Slika 3. Primer normalnog rezultata MLPA analize. Gore – Elektroferogram dobijen nakon kapilarne gel elektroforeze produkata MLPA reakcije. Dole – Prikaz rezultata nakon obrade u programu Coffalizer.Net. Normalan nalaz podrazumeva da su dobijene vrednosti za svaku probu približno jedan (tolerišu se odstupanja $\pm 0,2$). Modifikovano prema uputstvu proizvođača *MRC-Holland* za primenu MLPA kita (URL: <http://www.mlpa.com>).

3.2.5. Molekularni kariotip

Analiza promena u broju kopija je rađena metodom molekularnog kariotipa koja se zasniva na principima komparativne genomske hibridizacije, molekularno-citogenetičke tehnike koja omogućava analizu celog genoma na prisustvo delecija i duplikacija. Razvijena najpre kao metoda za analizu genetičkih promena prisutnih u solidnim tumorima, ova analiza podrazumeva korišćenje dva genoma, testiranog i kontrolnog, koji se obeležavaju različitim fluorescentnim bojama i kompetitivno hibridizuju sa metafaznim hromozomima. Intenzitet fluorescentnog signala testirane DNK u odnosu na signal referentne DNK se analizira duž hromozoma omogućavajući identifikaciju promena u broju kopija (Kallioniemi *et al.*, 1992). Rezolucija ovakve klasične komparativne genomske hibridizacije je ograničena na 5-10 Mb (Kirchhoff *et al.*, 1998; Lichter *et al.*, 2000).

Metoda molekularnog kariotipa kombinuje principe komparativne genomske hibridizacije sa upotrebom mikročipova (engl., *microarray*) (Skena *et al.*, 1995). Umesto metafaznih hromozoma koriste se staklene pločice na koje su nanosene probe tj. mali segmenti DNK. Rezolucija analize je određena kako veličinom probe tako i genomskom razdaljinom između proba. Za izvođenje analize se koristi genomska DNK testiranog i referentnog uzorka koje se, kao i u slučaju komparativne genomske hibridizacije, boje različitim fluorescentnim bojama, mešaju i aplikuju na mikročip. Pošto su prethodno denaturisane, ove DNK su jednolančane i imaju tendenciju da hibridizuju sa jednolančanim probama na mikročipu. Za detekciju i analizu intenziteta fluorescencije obeleženih DNK proba, koje su hibridizovale za ciljane sekvence, koriste se kompjuterski softveri. Odnos fluorescencije hibridizacionih signala testiranog i referentnog uzorka se određuje duž celog genoma i daje nam informaciju o relativnom broju kopija u testiranom genomu u odnosu na referentni.

Analiza molekularnog kariotipa u našoj studiji je rađena koristeći CGH oligonukleotidni mikročip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sa ~60,000 proba raspoređenih po celom genomu (qChip Post). Probe ovog mikročipa su specifične za pericentromerne, telomerne i euhromatinske delove genoma sa gustinom od 1 probe na 35 Kb, i procenjenom prosečnom rezolucijom od 100-125 Kb. Prosečna pokrivenost izvan

kandidatnih regiona je jedna proba na svakih 125Kb, čime je omogućena detekcija promena u broju kopija većih od 350 Kb.

U prvom koraku analize vrši se digestija testirane i referentne DNK na fragmente dužine između 200 i 500 baznih parova. Digestirane DNK testiranog i kontrolnog uzorka se potom obeležavaju različitim fluorescentnim bojama. Nakon prečišćavanja, smeša uzoraka (testiranog i referentnog) se nanosi na mikročip kako bi fragmenti hibridizovali sa probama na mikročipu. Mikročip se potom skenira i analizira se relativno smanjenje ili povećanje fluorescentnog signala testiranog uzorka u odnosu na referentni Genomic Workbench 7.0 softverom. Dobijeni podaci se interpretiraju koristeći ADM-2 algoritam. Analiza genomskih regiona je vršena u odnosu na humani referentni genom hg18.

Analiza molekularnog kariotipa Human CGH+SNP ISCA Microarray 4x180K (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija) kitom je rađena na isti način s tim što je za analizu podataka korišćen program CytoGenomics 2.9 (Agilent) a analiza genomskih regiona vršena u odnosu na humani referentni genom hg19.

Primeri patoloških rezultata analize molekularnog kariotipa su dati u poglavlju Rezultati.

Važno je istaći da molekularnim kariotipom nije moguće detektovati balansirane hromozomske rearanžmane (recipročne translokacije, Robertsonove translokacije, inverzije i balansirane insercije), male insercije i delecije, tačkaste mutacije, aberacije prisutne u mozaiku ispod 40%, komplementarne mozaične aberacije koje zajedno rezultuju u prividno balansiranom kariotipu (npr. kompleksni kariotip sa dve ćelijske linije: 45,X/47,XXX), ili bilo koje druge varijante koje se nalaze izvan analiziranih regiona hromozoma. Dodatno, standardne oligonukleotidne probe nisu dizajnirane za detekciju uniparentalne dizomije i metilacionih varijacija.

Roditelji pacijenata kod kojih je identifikovana promena u broju kopija su testirani FISH analizom kako bi se odredilo poreklo varijante (nasleđena ili *de novo*) i isključilo prisustvo balansiranih rearanžmana u cilju adekvatne procene rizika za rekurenciju.

3.2.6. Klasifikacija promena u broju kopija u genomu

Primena analize molekularnog kariotipa dovela je do otkrića velikog broja različitih varijanti u broju kopija širom genoma, uključujući polimorfne varijante kod zdravih osoba i patogene varijante, uzročnike bolesti. Sa ciljem da se postigne konzistentnost u evaluaciji, interpretaciji i izveštavanju, Komitet za osiguranje kvaliteta Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku oformio je vodič za interpretaciju i izveštavanje promena u broju kopija koji je primenjiv na postnatalno identifikovane varijante (Kearney *et al.*, 2011). Promena u broju kopija prema definiciji predstavlja segment DNK veličine najmanje 1 Kb, koji se razlikuje u broju doza u odnosu na reprezentativni referentni genom.

Postoje tri osnovne kategorije kliničke značajnosti varijanti u broju kopija u genomu:

- Patogena varijanta. Promena u broju kopija je patogena ukoliko je dokumentovana kao klinički značajna u više publikacija, čak i u slučaju varijabilne penetrantnosti i ekspresivnosti. Ova kategorija uključuje i velike promene u broju kopija, koje možda nisu prethodno publikovane u stručnoj literaturi u istoj veličini koja je prisutna kod pacijenta, ali koje se preklapaju sa manjim varijantama kod kojih je jasno utvrđen klinički značaj. U tom slučaju, iako možda kompletan klinički efekat varijante nije poznat, sasvim je sigurno da je varijanta patogena. Ova kategorija uključuje većinu citogenetički vidljivih alteracija (3-5Mb).
- Varijanta nepoznatog značaja. Široka kategorija varijanti koja uključuje varijante za koje se kasnije može pokazati da su jasno patogene ili jasno benigne, i za koje u trenutku kada su identifikovane ne postoje dokazi koji bi odredili njihovu kliničku značajnost. U okviru ove kategorije postoji podklasifikacija na tri tipa varijanti:
 - Varijanta nepoznatog značaja, verovatno patogena. Npr. ukoliko je promena u broju kopija prethodno identifikovana kod jednog pacijenta ali sa dobro definisanim tačkama prekida i fenotipom, koji odgovaraju po specifičnosti promenama kod pacijenta koji se ispituje, ili, ako se u okviru varijante nalazi

gen čija alteracija je poznati uzročnik kliničke slike koja postoji kod pacijenta.

- Varijanta nepoznatog značaja, verovatno benigna. Npr. ukoliko u okviru varijante nisu identifikovani geni ali je po veličini veća od prethodno publikovanih, ili je varijanta prisutna u bazama varijacije u generalnoj populaciji, ali ne predstavlja čest polimorfizam.
- Varijanta nepoznatog značaja (bez subklasifikacije). Npr. kada varijanta sadrži gene ali je nepoznato da li su ti geni dozna zavisni ili kada je varijanta opisana u brojnim kontradiktornim publikacijama.
- Benigna varijanta. Varijanta koja je objavljena u brojnim radovima i bazama podataka kao benigna, naročito ako je priroda promene u broju kopija varijante dobro okarakterisana i varijanta predstavlja česti polimorfizam.

3.2.7. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“

Analiza genskih varijanti je rađena metodom sekvenciranja panela koji sadrži egzome 4813 gena koji su direktno povezani sa određenim kliničkim fenotipovima. Ovaj panel poznat je kao „klinički egzom“, što jasno govori o njegovom značaju za kliničku praksu.

Prilikom izvođenja analize za svakog pacijenta je prema njegovim fenotipskim karakteristikama pravljen subpanel gena, odnosno za analizu su odabirani oni geni koji su u literaturi povezani sa datim fenotipskim karakteristikama. U tu svrhu korišćeni su HPO termini za fenotipske abnormalnosti povezane sa bolestima ljudi (<https://hpo.jax.org/app/>).

Sekvenciranje „kliničkog egzoma“ je rađeno korišćenjem *Illumina TruSight One Sequencing* panela koji pokriva 12 Mb kodirajućih egzonskih sekvenci 4813 gena koji su asocirani sa Mendelovskim bolestima. Reakcija sekvenciranja rađena je na aparatu Illumina HiSeq 2500 na staklenoj pločici (engl., *flow cell*). Sekvenciranje se vršilo sa oba kraja fragmenata (engl., *paired end sequencing*), odnosno sintetisao se i drugi lanac. Analiza rezultata sekvenciranja podrazumevala je povezivanje niza programa tj. uspostavljanje

algoritma za bioinformatičku obradu podataka pomoću dostupnih platformi za analizu. Ukratko, nakon poravnanja sekvenci prema humanom referentnom genomu hg19, koristeći Burrows-Wheeler Aligner, duplikati sekvenci su uklonjeni koristeći Picard MarkDuplicates, a potom je rađena rekalkibracija osnovnog skora kvaliteta, pozivanje varijanti (engl., *variant calling*), rekalkibracija skora kvaliteta varijanti i filtriranje varijanti koristeći elemente GATK (engl., *genome analysis toolkit*) platforme koja se sastoji od seta alata za obradu podataka (De Pisto *et al.*, 2011).

Prema internim standardima dovoljna pokrivenost gena uključenih u genski panel „klinički egzom“ osigurana je time da je u proseku svaki gen bio pokriven minimum 70x i da je 98% analiziranih regiona bilo pokriveno najmanje 10x i preko 95% regiona pokriveno najmanje 20x. Na taj način preko 95% regiona je detektovano sa senzitivnošću od 99% i za heterozigotne i za homozigotne varijante.

Varijante su deponovane i anotirane koristeći vTools i ANNOVAR softvere (Wang *et al.*, 2010; San Lucas *et al.*, 2012). Za pozicioniranje varijanti u transkriptu korišćeni su Refseq genski modeli, a za obeležavanje susstitucija pojedinačnih nukleotida korišćen je dbSNP v138. Za procenu učestalosti varijanti u populaciji korišćena je interna baza Kliničkog instituta za medicinsku genetiku u Ljubljani, koja je zasnovana na kompilaciji 2000 egzoma etnički bliske populacije (Balkan). Korišćenjem ove baze značajno se olakšava analiza podataka sekvenciranja pacijenata sa ovih prostora jer se učestalosti kako patogenih tako i populacionih varijanti značajno razlikuju u odnosu na one u javno dostupnim bazama svetske populacije. Informacije o učestalosti varijanti u svetskoj populaciji su zasnovane na podacima prisutnim u GnomAD projektu (Karczewski *et al.*, 2019). Za predikciju patogenosti varijanti izmenjenog aminokiselinskog sastava korišćena je SNPeff v² baza podataka (Liu *et al.*, 2013). Za procenu efekta varijanti korišćen je SNPeff prediktor (Cingolani *et al.*, 2012). Određivanje stepena evolutivne očuvanosti regiona gena u kojem se nalazi varijanta zasnovano je na GERP++ RS (engl., *rejected substitution*) skorovima (Davydov *et al.*, 2010). Za dodatnu interpretaciju detektovanih varijanti korišćeni su *in silico* kompjuterski prediktivni programi prikazani u Tabeli 2. Kao izvor podataka poznatih varijanti koje su asociirane sa humanim bolestima, korišćena je ClinVar baza podataka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (Landrum *et al.*, 2013).

Tabela 2. *In silico* prediktivni algoritmi

KATEGORIJA	NAZIV	OFICIJALNI SAJT
Procena štetnog uticaja aminokiselinske zamene na strukturu i funkciju proteina	SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
	Mutation taster	http://www.mutationtaster.org/
	PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Procena uticaja varijante na iskrajanje introna (engl., <i>splicing</i>)	GeneSplicer	https://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/

Varijante su filtrirane prema dominantnim, recesivnim i X-vezanim modelima nasleđivanja. Iz dalje analize izbačene su varijante sa učestalošću preko 0,01% za dominantne bolesti i sa učestalošću preko 0,1% za recesivne i X-vezane bolesti. Sve varijante koje su prošle ove filtere su potom pregledane na nivou poravnanja sekvenci kako bi se izbegle greške u odabiru varijanti nastale zbog pogrešnog poravnanja ili loše pokrivenosti neke sekvence.

U prvom koraku sekvenciranje „kliničkog egzoma“ je rađeno kod probanda. Identifikovane varijante su potvrđivane direktnim sekvenciranjem po Sangeru, u skladu sa važećim preporukama (Strom *et al.*, 2014). Direktno sekvenciranje po Sangeru korišćeno je i za segregacione analize na uzorcima roditelja sa ciljem utvrđivanja porekla detektovane varijante (nasleđena ili *de novo*) i određivanja udružene heterozigotnosti u pojedinim slučajevima.

Sve identifikovane varijante su unesene u ClinVar bazu podataka koja je javno dostupna (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) (Landrum *et al.*, 2013).

3.2.8. Klasifikacija genskih varijanti

Američki koledž za medicinsku genetiku i asocijacija za molekularnu patologiju (ACMG/AMP), definisali su standarde i preporuke za klasifikaciju varijanti identifikovanih sekvenciranjem pojedinačnih gena, genskih panela, egzomskog i genomskog sekvenciranja (Richards *et al.*, 2015).

Ova grupacija je takođe predložila i da se termini “*mutacija*” i “*polimorfizam*” zamene terminom “*varijanta*”. U praktičnj primeni mutacija se definiše kao stalna promena nukleotidne sekvence sa učestalošću u opštoj populaciji manjom od 1%, dok je polimorfizam varijanta prisutna sa učestalošću preko 1%. Ovi termini dovode do konfuzije zbog činjenice da se obično pretpostavlja da je mutacija patogena a polimorfizam benigna varijanta, što nije u skladu sa činjeničnim stanjem. Stoga, preporuke su da se uz termin varijanta uvek koristi pridev koji je bliže objašnjava i to: “patogena”, “verovatno patogena”, “nepoznatog značaja”, “verovatno benigna” i “benigna”.

Ova klasifikacija na pet kategorija varijanti je primenljiva na Mendelovske bolesti na koje se priručnik za klasifikaciju i odnosi. Dalja subklasifikacija varijanti je u skladu sa ovim preporukama i na laboratorijama je da odluče da li žele da je primene.

Treba istaći da se klasifikacija genskih varijanti razlikuje od klasifikacije promena u broju kopija u tome što se verovatno patogene i verovatno benigne genske varijante, zasnivaju na jačim dokazima, i označavaju verovatnoću veću od 90% da je varijanta patogena ili benigna.

Varijante se klasifikuju na osnovu dva seta kriterijuma, jednog za klasifikaciju patogenih i verovatno patogenih varijanti, i jednog za klasifikaciju benignih ili verovatno benignih varijanti. Kriterijumi su podeljeni na veoma jake, jake, srednje i podržavajuće. Na osnovu dokaza prisutnih u literaturi, javnim bazama podataka, podataka dobijenih iz *in silico* predikcionih softvera, i drugih podataka, identifikovanoj varijanti se dodeljuju kriterijumi što omogućava njeno svrstavanje u određenu kategoriju (https://www.medschool.umaryland.edu/Genetic_Variant_Interpretation_Tool1.html/).

3.2.9. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

U slučaju detekcije delecije i/ili duplikacije kod pacijenta, primenom MLPA metode ili metodom molekularnog kariotipa, rađena je FISH analiza kod roditelja sa ciljem utvrđivanja statusa nosioca balansirano hromozomskog rearanžmana (recipročne ili insercione translokacije) i procene značaja identifikovane varijante (nasleđena ili *de novo*), koristeći DNK probe za one regione hromozoma koji su kod pacijenta deletirani i/ili duplicirani (*Cytocell*, Engleska).

FISH je molekularno-citogenetička metoda i zasniva se na hibridizaciji fluorescentno obeležene DNK probe sa specifičnom ciljnom DNK. Za potrebe izvođenja FISH analize mogu se koristiti preparati metafaznih hromozoma ili interfaznih jedara. Vizuelizacija je omogućena upotrebom fluorescentnog mikroskopa.

FISH analiza je izvođena prema standardnom protokolu (Bayani and Squire, 2004). Za svakog pacijenta je analizirano dvadeset metafaza. Priprema citogenetičkih preparata se vrši nakon kultivacije limfocita periferne krvi u trajanju od 72 h na 37°C, izlaganjem hipotoničnom rastvoru i rastvoru fiksativa. Fiksiranje metafaza se vrši prevlačenjem pločica sa uzorkom preko plamena nakon čega se ostavljaju da se osuše. Hibridizaciono polje odgovarajuće čistoće i mitotskog indeksa na citogenetičkim preparatima se određuje dijamantskom iglom. Nakon toga, preparati se uranjaju u rastvor (2xSSC/0,5% NP-40 pH 7.0) u trajanju od 30 minuta na 37°C. Izlaganjem seriji hladnih etanola (2 minuta u 70% etanolu, 2 minuta u 80% etanolu i 2 minuta u 95% etanolu), vrši se dehidratacija preparata, nakon čega se ostavljaju da se suše na sobnoj temperaturi. Za denaturaciju DNK koristi se denaturacioni rastvor (70% formamid/2xSSC pH 7,0-8,0) 5 minuta na 73°C. Potom se postupak dehidratacije ponavlja na sličan način (1 minut u 70% etanolu, 1 minut u 85% etanolu i 1 minut u 95% etanolu) i preparati se ostavljaju da se osuše na sobnoj temperaturi. Za vreme sušenja preparata, pripremaju se fluorescentne probe za hibridizaciju, odnosno u mikrotubu se dodaje 7 µl pufera za hibridizaciju (LSI/WCP), 2 µl ddH₂O i 1 µl smeše proba (proba koja odgovara regionu delecije/duplikacije kod pacijenta i kontrolna proba koja se nalazi na istom hromozomu ali u drugom regionu). Denaturacija proba se vrši u trajanju od 5 minuta na 73°C nakon čega se mikrotuba stavlja odmah na led, kako bi se

sprečila hibridizacija lanaca DNK proba. Nakon denaturacije, probe se nanose na pokrovno staklo, koje se zatim pokriva obeleženim hibridizacionim poljem, dovodeći do istiskanja viška proba. Hibridizacija se odvija preko noći (12-16 sati) u vlažnoj komori na 37°C. Nakon hibridizacije višak probe i nespecifično vezana proba se uklanjaju inkubacijom u trajanju od 2 minuta na 73°C u rastvoru 0.4xSSC/0.3% NP-40 i inkubacijom u trajanju od 30 sekundi na sobnoj temperaturi u rastvoru 2xSSC/0.1% NP-40. Preparati se ostavljaju da se suše na sobnoj temperaturi u mraku. Posle sušenja, hromozomi se boje fluorescentnom bojom, a vizuelizacija vrši fluorescentnim mikroskopom.

3.2.10. Baze podataka

Za analizu detektovanih varijanti kao i analizu genotipsko-fenotipske korelacije korišćene su javno dostupne baze podataka prikazane u Tabeli 3.

3.3. Statistička analiza podataka

U ovom istraživanju su korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (n,%). Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su neparametarski testovi, Pirsonov hi-kvadrat test i Fišerov test tačne verovatnoće. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Svi podaci obrađeni su u SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) softverskom paketu i R 3.4.2 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Vrednosti $p < 0.05$ su smatrane statistički značajnim.

Tabela 3. Javno dostupne baze podataka

<p>ExAC Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/</p>	<p>Baza varijanti koje su detektovane prilikom sekvenciranja egzoma 61,486 osoba koje nisu u srodstvu. Sekvenciranje je rađeno u okviru populacionih studija i studija različitih bolesti. U bazu nisu uključena deca i srodnici onih koji su već uključeni u studiju.</p>
<p>GnomAD Genome Aggregation Database https://gnomad.broadinstitute.org/</p>	<p>Baza sadrži podatke 125,748 egzomskih sekvenci i 15,708 sekvenci celog genoma osoba koje nisu u srodstvu. Sekvenciranje je rađeno u okviru populacionih studija i studija različitih bolesti.</p>
<p>dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp</p>	<p>Baza kratkih genetičkih varijacija (tipično $\leq 50\text{bp}$) oformljena iz mnogo različitih izvora.</p>
<p>dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar</p>	<p>Baza strukturnih varijacija (tipično $>50\text{bp}$) oformljena iz mnogo različitih izvora.</p>
<p>DGV Database of Genomic Variants http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home</p>	<p>Baza strukturnih varijacija humanog genoma.</p>
<p>ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</p>	<p>Baza kliničkog značaja i fenotipske korelacije humane varijacije.</p>
<p>OMIM Online Mendelian Inheritance in Man http://www.omim.org</p>	<p>Baza humanih gena i genetičkih bolesti koja sadrži i reprezentativan uzorak genetičkih varijanti koje su asocirane sa bolestima.</p>
<p>HGMD Human Gene Mutation Database. http://www.hgmd.org</p>	<p>Baza anotacija varijanti publikovanih u literaturi.</p>
<p>DECIPHER http://decipher.sanger.ac.uk</p>	<p>Molekularno-citogenetička baza korelacija hromozomskih aberacija sa fenotipom.</p>
<p>ISCA The International Standards for Cytogenomic Arrays http://www.iscaconsortium.org/</p>	<p>Baza podataka promena u broju kopija dobijena analizom molekularnog kariotipa kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama, autizmom i zaostajanjem u razvoju u više različitih laboratorija.</p>

4. REZULTATI

4.1. Demografska i klinička evaluacija ispitanika

U istraživanje je uključeno 220 pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, kod kojih je prethodno urađena analiza kariotipa, kao i druga genetička testiranja u slučaju da su bila urađena, pokazala normalan nalaz. Oba pola su bila skoro podjednako zastupljena, sa 113 (56,5%, 113/220) pacijenata muškog i 107 (53,5%, 107/220) pacijenata ženskog pola. Starost pacijenata je bila od 15 dana do 18 godina. Pored zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća sledeći klinički parametri su identifikovani kod značajnog broja pacijenata:

- *Minor* mane 66% (146/220)
- Jedna *major* mana 31,8% (70/220)
- Multiple *major* mane 32,7% (72/220)
- Mikrocefalija 32,7% (72/220)
- Strukturne mane mozga 31,8% (70/220)
- Neurološki znaci (epilepsija, hipotonija, hipertonija) 59,1% (130/220).

Pozitivnu porodičnu anamnezu je imalo 10,4% (23/220) pacijenata, i ona se u većini slučajeva odnosila na brata/sestu koji su oboleli od iste bolesti. Postavljenu kliničku dijagnozu pre testiranja je imalo 25 (11,4%, 25/220) pacijenata, dok je dijagnozu autizma imalo 10 (4,5%, 10/220) pacijenata.

4.2. Rezultati MLPA analize

4.2.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije

Analiza subtelomernih regiona hromozoma je rađena koristeći SALSA MLPA P036 kit dok je za potvrdu prisustva delecija i duplikacija korišćen SALSA MLPA P070 kit.

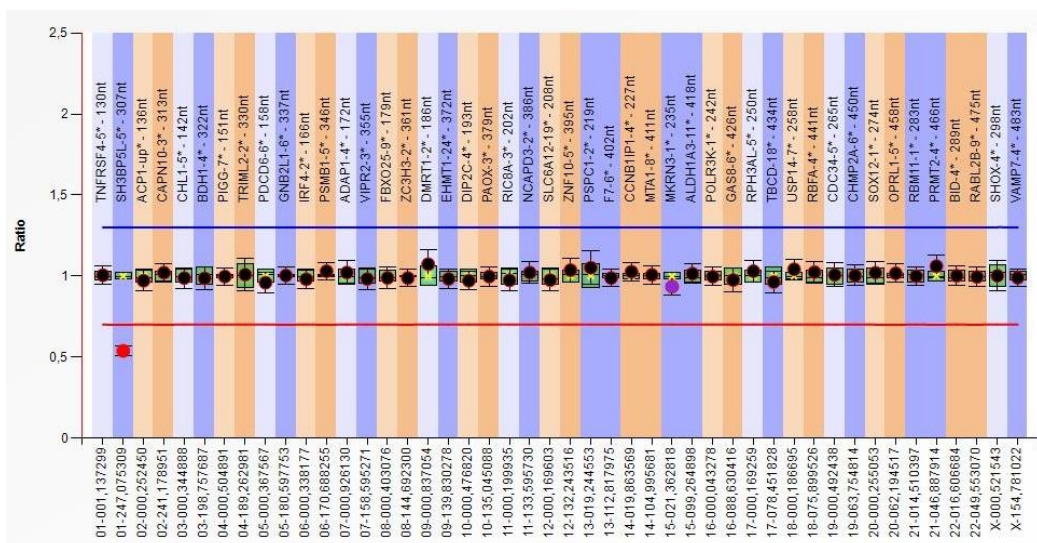
Roditelji pacijenata kod kojih je identifikovana delecija i/ili duplikacija su testirani MLPA i FISH analizom kako bi se procenio značaj i poreklo identifikovane varijante.

MLPA analizom je ukupno testirano 110 pacijenata. Promena u broju kopija je identifikovana kod njih 13: delecija je identifikovana kod osam pacijenata (pacijenti br. 13, 17, 29 (Slika 4.), 33, 44, 62, 80 i 88), duplikacija kod dvoje (pacijenti br. 2 i 48) dok je istovremeno prisustvo delecije i duplikacije detektovano kod tri pacijenta (pacijenti br. 11, 12 i 77 (Slika 5.)). Jedina rekurentna aberacija, delecija 1p36.33 regiona, identifikovana je kod tri pacijenta (pacijenti br. 17, 80 i 88). Kod pet pacijenata oba roditelja su testirana FISH analizom. Rezultati MLPA i FISH analize su predstavljeni u Tabeli 4.

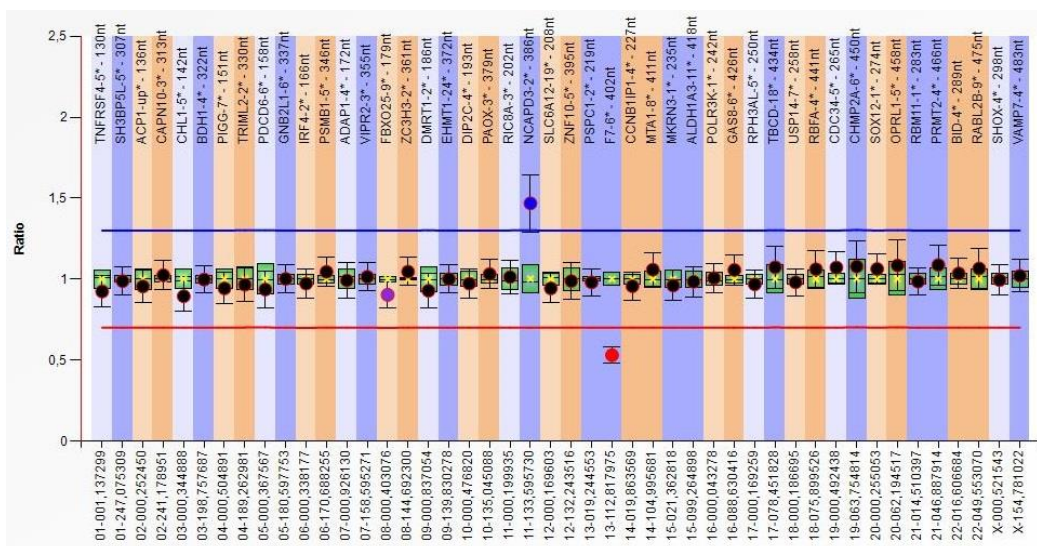
Tabela 4. Rezultati MLPA i FISH analize

Pacijent	Pol	MLPA analiza pacijenta	MLPA analiza roditelja	FISH analiza roditelja
2	M	Duplikacija 19p13.3	Negativna	Nije rađena
11	Ž	Delecija 7q36.3 Duplikacija 18q23	Negativna	Majka je nosilac translokacije 46,XX,t(7;18)(q36.3;q23)
12	Ž	Duplikacija 3p26.3 Delecija 13q34	Negativna	Otac je nosilac translokacije 46,XY,t(3;13)(p25.1;q32.3)
13	M	Delecija 4p16.3	Majka pozitivna Otac negativan	Nije rađena
17	Ž	Delecija 1p36.33	Negativna	Nije rađena
29	Ž	Delecija 1q44	Negativna	Nije rađena
33	Ž	Delecija 9p24.3	Negativna	Negativna
44	Ž	Delecija 9q34.3	Negativna	Nije rađena
48	Ž	Duplikacija 17p13.3	Negativna	Nije rađena
62	M	Delecija 15q11.2	Negativna	Nije rađena
77	Ž	Duplikacija 11q25 Delecija 13q34	Negativna	Negativna
80	Ž	Delecija 1p36.33.	Negativna	Negativna
88	Ž	Delecija 1p36.33.	Negativna	Nije rađena

Identifikovane varijante su detaljnije okarakterisane i dodatno potvrđene metodom molekularnog kariotipa kod 11 pacijenata sa pozitivnim MLPA nalazom (svi osim pacijenata br. 17 i 62). Kod devet pacijenata promene u broju kopija su okarakterisane kao patogene (pacijenti br. 2, 11, 12, 29, 44, 48, 77, 80 i 88), dok su kod dva pacijenta okarakterisane kao varijante nepoznatog značaja (pacijenti br. 13 i 33 koji su detaljnije opisani u odeljcima 4.2.2. i 4.2.3.) (Tabela 5).



Slika 4. Primer patološkog MLPA nalaza. Delecija regiona 1q44 kod pacijenta br. 29.



Slika 5. Primer patološkog MLPA nalaza. Duplikacija regiona 11q25 i delecija regiona 13q34 regiona kod pacijenta br. 77.

4.2.2. Prikaz pacijenta br. 13

Pacijent br. 13 je dečak sa teškom senzorneuralnom nagluvošću i teškim globalnim razvojnim zaostajanjem. MLPA analizom subtelomernih regiona SALSA MLPA P036 kitom detektovana je delecija regiona 4p16.3, a zatim i potvrđena SALSA MLPA P070 kitom. Prema standardnom protokolu, MLPA analiza je potom urađena kod njegovih roditelja i prisustvo iste delecije je identifikovano kod zdrave majke. Sa ciljem da se dodatno potvrdi postojanje delecije, urađena je FISH analiza za pomenuti region kod pacijenta, međutim, nalaz je bio negativan. Potom je urađena analiza molekularnog kariotipa kod pacijenta i njegovih roditelja, i u regionu 4p16.3 je identifikovana delecija veličine 95 Kb maternalnog porekla, kao i intersticijalna delecija regiona 18q12.3 paternalnog porekla. Obe aberacije su okarakterisane kao varijante nepoznate značajnosti. Činjenica da su nasleđene od zdravih roditelja ukazuje na to da identifikovane varijante vrlo verovatno nisu patogene. Pregledom literature ustanovljeno je da se u 4p16.3 regionu nalazi *PIGG* gen koji se povezuje sa autozomno-recesivnom formom mentalne retardacije (OMIM 616918). S obzirom da je istovetna delecija prisutna kod majke, urađeno je sekvenciranje *PIGG* gena kod oca u potrazi za genskim varijantama koje bi kroz udruženu heterozigotnost sa pomenutom delecijom, mogle da dovedu do bolesti. Ipak, nalaz sekvenciranja nije identifikovao prisustvo patogene varijante. U toku je sekvenciranje celog genoma kod pacijenta, zbog mogućnosti da se genska varijanta u *PIGG* genu javila *de novo*, kao posledica germinativnog mozaicizma, da se nalazi u nekodirajućoj sekvenci ili mogućnosti da je uzrok bolesti posledica alteracije nekog drugog gena.

4.2.3. Prikaz pacijenta br. 33

Pacijent br 33. je devojčica sa teškim globalnim zaostajanjem u razvoju i izraženim zaostajanjem u rastu koje je primećeno još prenatalno, uključujući i zaostajanje u rastu glave. Devojčica je imala težak spasticitet, multicističnu displaziju bubrega, dermoidnu cistu oka, skoliozu sa anomalijama pršljenova, teške malatične i atrofične promene mozga i deformitete ekstremiteta. Zbog perinatalnih komplikacija je bila reanimirana po rođenju,

nakon čega je boravila na intenzivnoj nezi više od dva meseca. Preminula je u uzrastu od dve godine. MLPA analizom je identifikovana delecija regiona 9p24.3. MLPA i FISH analiza roditelja su pokazale normalan nalaz. Metodom molekularnog kariotipa potvrđeno je prisustvo terminalne delecije regiona 9p24.3 veličine 1,8 Mb. Delecija je okarakterisana kao varijanta nepoznate značajnosti s obzirom na to da je ista promena prethodno opisana u literaturi kod pacijenata sa blažim fenotipom ali i kod zdravih osoba. Dodatno, delecija ne obuhvata kandidatni region 9p delecionog sindroma koji se najverovatnije nalazi u traci 9p22.3 (Swinkels *et al.*, 2008). Pored ove delecije, identifikovana je i duplikacija regiona 14q32.2, veličine 189 Kb, koja je takođe opisana kao varijanta nepoznate značajnosti. U potrazi sa genskim uzročnim varijantama, urađeno je egzomsko sekvenciranje kojim su identifikovane dve heterozigotne varijante u genima *COL4A3BP* i *FLNB*. Pretragom literature ustanovljeno je da se fenotipske prezentacije ovih varijanti samo parcijalno preklapaju sa kliničkom slikom pacijenta, te su i one okarakterisane kao varijante nepoznate značajnosti. Testiranjem roditelja, pokazano je da je otac nosilac obe varijante, što značajno smanjuje verovatnoću njihove patogenosti. I nakon ovih, opsežnih genetičkih testiranja, uzrok bolesti kod pacijenta br. 33 nije do kraja razjašnjen.

4.2.4. Stopa detekcije MLPA analize

MLPA analiza je identifikovala promene u broju kopija kod 13 (11,8%, 13/110) pacijenata. S obzirom na to da su dalja testiranja pokazala da se kod dva pacijenta radi o varijantama nepoznatog značaja (pacijenti br. 13 i 33), oni su isključeni prilikom izračunavanja dijagnostičke moći metode.

Dakle, stopa detekcije patogenih varijanti primenom MLPA analize subtelomernih regiona u našoj studiji iznosi 10% (11/110).

4.3. Rezultati analize molekularnog kariotipa

4.3.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije

Analiza molekularnog kariotipa je urađena kod 110 pacijenata. Patogena promena u broju kopija je identifikovana kod njih 29, čime je postignuta stopa detekcije od 26,4% (29/110). Prisustvo delecije je detektovano kod 17 pacijenata (58,6%, 17/29), prisustvo duplikacije kod sedam pacijenata (24,1%, 7/29), dok je kod pet pacijenata identifikovano prisustvo delecije i duplikacije (17,3%, 5/29). Najmanja identifikovana varijanta je bila veličine 487 Kb a najveća 22,1 Mb. Sve identifikovane patogene i verovatno patogene delecije i duplikacije su nastale *de novo*, osim u slučaju pacijenta br.111 koji je deleciju 15q13.3 regiona nasledio od oca.

Varijante nepoznate značajnosti su identifikovane kod 14 pacijenata (12,7%, 14/110).

FISH analiza je urađena kod roditelja 12 pacijenata, i svi nalazi su bili negativni, osim u slučaju roditelja pacijenata br. 11 i 12 kod kojih je jedan od roditelja nosilac recipročne translokacije. Analiza molekularnog kariotipa je kod pacijenata br. 11 i 12 rađena u cilju potvrde aberacije identifikovane MLPA analizom na subtelomerne defekte i ovi pacijenti su prethodno prikazani i u Tabeli 4. gde su predstavljeni rezultati MLPA i FISH analize.

Kod 19 pacijenata je postavljena dijagnoza dobro definisanog mikrodelecionog ili mikroduplikacionog sindroma, dok su kod preostalih identifikovane retke delecije/duplikacije ili prisustvo dve patogene promene u broju kopija.

Pregled patogenih i verovatno patogenih varijanti identifikovanih metodom molekularnog kariotipa, kao i najznačajnijih kliničkih podataka pacijenata, predstavljen je u Tabeli 5.

Tabela 5. Patogene i verovatno patogene varijante identifikovane metodom molekularnog kariotipa

PAC	POL	FENOTIP	VARIJANTA	TIP VARIJANTE	VELIČINA VARIJANTE	FISH ANALIZA ILI ANALIZA KARIOTIPA RODITELJA	OMIM BAZA
186	M	IP, poligirija, nisko postavljene uši	arr[hg19] chr2p25.3 (30341-2908831)x1	Terminalna delecija	2,8 Mb	Nije rađena	/
187 ^a	Ž	RK, IP, intrauterino zaostajanje, hipotonija, nerazvijen govor, rascep nepca, facijalna dismorfija, hirzutizam, gojaznost	arr[GRCh37] 1q32.1q32.3 (chr1:204682513-212815646)x1	Intersticijalna delecija	8,1 Mb	Negativna	/
166	Ž	Lizencefalija, abnormalan oblik lica, epileptički spazmi	arr[GRCh37] 17p13.3 (1361431-2573023)x1	Terminalna delecija	1,2 Mb	Negativna	Lizencefalija tip 1 (OMIM:607432)
207	Ž	Lizencefalija, RK, odsustvo govora, mikrocefalija, epilepsija, hipotonija, strabizam, nistagmus	arr[GRCh37] 17p13.3 (2339561-2826078)x1	Intersticijalna delecija	487 Kb	Negativna	Lizencefalija tip 1 (OMIM:607432)
188	M	IP, abnormalan oblik lica, anemija, motorno zaostajanje	arr[hg19] Xq28 (153138672-153665655)x2	Intersticijalna duplikacija	550 Kb	Nije rađena	MECP2 duplikacioni sindrom (OMIM:300260)
139	M	RK, epilepsija, odsustvo govora	arr[hg19] Xq28 (153129811-153630671)x2	Intersticijalna duplikacija	500 Kb	Nije rađena	MECP2 duplikacioni sindrom (OMIM:300260)
2	M	RK, epilepsija i usporen rast	arr[hg19] 19p13.3-p13.2 (327273-7303709)x3	Terminalna duplikacija	6,98 Mb	Nije rađena	19p13.13 duplikacioni sindrom (OMIM:613638)
9	Ž	RK, motorno zaostajanje, široki palčevi, hiperehogeni bubrezi, facijalna dismorfija	arr[hg18] 6q14.1q15 (78012749-90303903)x1	Intersticijalna delecija	12,3 Mb	Nije rađena	/
11	Ž	Teško RK, mikrocefalija, rascep usne i nepca, holoprocencefalija, generalizovana hipotonija, odsustvo govora	arr[hg19] 7q36.2q36.3 (152785062-159128556)x1	Terminalna delecija	6,3 Mb	Majka je nosilac translokacije 46,XX,t(7;18)(q36.3;q23)	/
12	Ž	RK, hipotonija, mikrocefalija, facijalna dismorfija, kalcifikacije u mozgu	18q22.3q23 (72266100-78012829)x3	Terminalna duplikacija	5,7 Mb	Otac je nosilac translokacije 46,XY,t(3;13)(p25.1;q32.3)	/
12	Ž	RK, hipotonija, mikrocefalija, facijalna dismorfija, kalcifikacije u mozgu	arr[hg18] 3p26.3p25 (48914-12667054)x3	Terminalna duplikacija	12,6 Mb	Otac je nosilac translokacije 46,XY,t(3;13)(p25.1;q32.3)	/
12	Ž	RK, hipotonija, mikrocefalija, facijalna dismorfija, kalcifikacije u mozgu	13q32.3q34 (99550735-114123908)x1	Terminalna delecija	14,6 Mb		
25	Ž	RK, makrocefalija	arr[hg18] 1p21p13.3 (103839772-110901622)x1	Intersticijalna delecija	7 Mb	Nije rađena	/

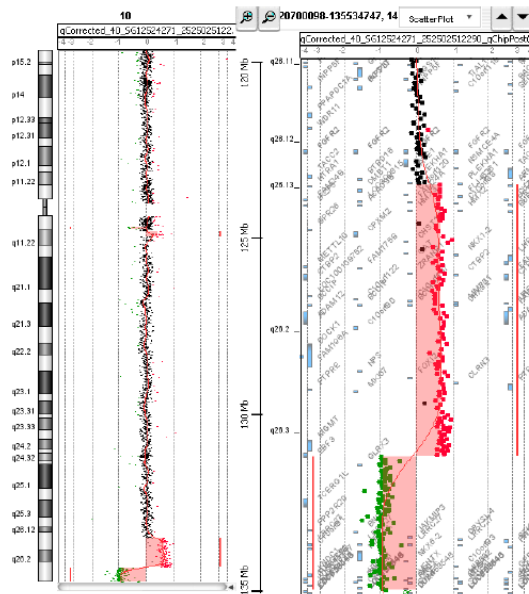
29	Ž	Mikrocefalija, teško RK, agenezija žuljevitog tela, epilepsija	arr[hg19] 1q43q44 (237461414-249212668)x1	Terminalna delecija	11,7 Mb	Nije rađena	1q43-q44 delecioni sindrom (OMIM: 612337)
31	Ž	Kongenitalna hipotonija, RK, facijalna dismorfija, epilepsija	arr[hg18] 16p11.2 (29500284-31400875)x1	Intersticijalna delecija	1,9 Mb	Nije rađena	16p11.2 delecioni sindrom (OMIM: 611913)
44	Ž	RK, kašnjenje u razvoju govora, motorno kašnjenje	arr[hg19] 9q34.3 (140049579-141018984)x1	Terminalna delecija	1 Mb	Nije rađena	9q34.3 delecioni sindrom – Klefstra sindrom (OMIM: 610253)
48	Ž	Teško RK, IP, hipotrofija, mikrocefalija sa udruženom facijalnom dismorfijom, kašnjenje u rastu, kontrakture	arr[hg19] 17p13.3p11.1 (87009-22205821)x3	Terminalna duplikacija	22,1 Mb	Otac je nosilac translokacije 46,XY,t(15;17)(p11.2;p11.2)	/
50	Ž	RK, brahidaktilija, abnormalan oblik glave, strabizam, miopija, slabo razvijen govor, stenozna pulmonarne arterije, problemi u ponašanju	arr[GRCh37] 17p11.2 (16936603_18184130)x1	Intersticijalna delecija	1,25 Mb	Negativna	Smith-Magenisov sindrom (OMIM: 182290)
80	Ž	Prenatalno zaostajanje, ventrikulomegalija, facijalna dismorfija	arr[hg18] 1p36.33p36.32 (784458-3247220)x1	Terminalna delecija	3 Mb	Negativna	1p36 mikrodelecioni sindrom (OMIM: 607872)
88	Ž	Hipotonija, dilatativna kardiomiopatija	arr[GRCh37] 1p36.33p36.31 (834101-6076140)x1	Terminalna delecija	5,2 Mb	Nije rađena	1p36 mikrodelecioni sindrom (OMIM: 607872)
91	M	Nistagmus, RK, usporena mijelinizacija i generalizovana hipotonija	arr[hg18] Xq22.1q22.3 (100345443-104335404)x2	Intersticijalna duplikacija	3,9 Mb	Nije rađena	Pelizeus-Mercbaherov sindrom (OMIM: 312080)
103	Ž	Epilepsija, ventrikularni septalni defekt, rascjep nepca, vezikouretralni refluks, IP, cerebelarna hipoplazija	arr[GRCh37] 16p13.3 (82412-7308768)x3	Terminalna duplikacija	7,2 Mb	Nije rađena	/
106	M	Intrauterino zaostajanje, mikrocefalija, facijalna dismorfija, RK	21q22.3 (46535449-48090317)x1	Terminalna delecija	1,5 Mb	Nije rađena	19p13.13 duplikacioni sindrom (OMIM: 613638)
111	M	Usporen psihomotorni razvoj, epilepsija	arr[GRCh37] 19p13.3 (226925-4845980)x3	Terminalna duplikacija	4,8 Mb	Nije rađena	15q13.3 mikrodelecioni sindrom (OMIM: 612001)
77	Ž	Mikrocefalija, nos "greek helmet warrior" izgleda, devijacija nosa, hipertrofija klitorisa, prenatalno zaostajanje u rastu	arr[hg19] 11q24.3q25 (129966779-134868407)x3	Terminalna duplikacija	4,9 Mb	Negativna	/
			13q33.1q34 (102591934-115059020)x1	Terminalna delecija	12,5 Mb		

105	Ž	Kraniofacijalni dismorfizam, rascep nepca, RK i ventrikulomegalija	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1 (22149-16770583)x1	Terminalna delecija	16 Mb	Negativna	Sindrom mačjeg plača (OMIM: 123450)
115	M	RK, prenatalno zaostajanje, mikrocefalija, glaukom, facijalni dismorfizam, nespušteni testis	arr[GRCh37] 16p11.2 (29620689_30190568)x3	Intersticijalna duplikacija	569 Kb	Nije rađena	16p11.2 delecioni sindrom (OMIM: 611913)
126	M	Prenatalno zaostajanje, hipotonija, VUR IV-V, strabizam, retencija testisa, RK, facijalni dismorfizam	arr[GRCh37] 10q26.13q26.3 (125127007-135403668)x1	Intersticijalna delecija	10,3 Mb	Negativna	10q26 delecioni sindrom (OMIM: 609625)
129	Ž	Facijalni dismorfizam, RK, nerazvijen govor	arr[GRCh37] 10q26.13q26.3 (124216328-131693058)x3	Intersticijalna duplikacija	7,5 Mb	Negativna	/
			10q26.3 (131730905-135403668)x1	Terminalna delecija	3,7 Mb		
131	M	Teško RK, hipotonija, konvergentni strabizam, afebrilne krize svesti, atrofija mozga, usporena mijelinizacija	arr[GRCh37] 14q12 (28459512_30035526)x1	Intersticijalna delecija	1,5 Mb	Negativna	Kongenitalni Retov sindrom (OMIM: 613454)
93	Ž	Strabizam, IP, epilepsija, usporeno progovaranje, razvojno i motorno zaostajanje	arr[hg18] 4p16.3 (81,744-1,933,597)x1	Terminalna delecija	2 Mb	Nije rađena	Volf-Hiršhornov sindrom (OMIM: 194190)

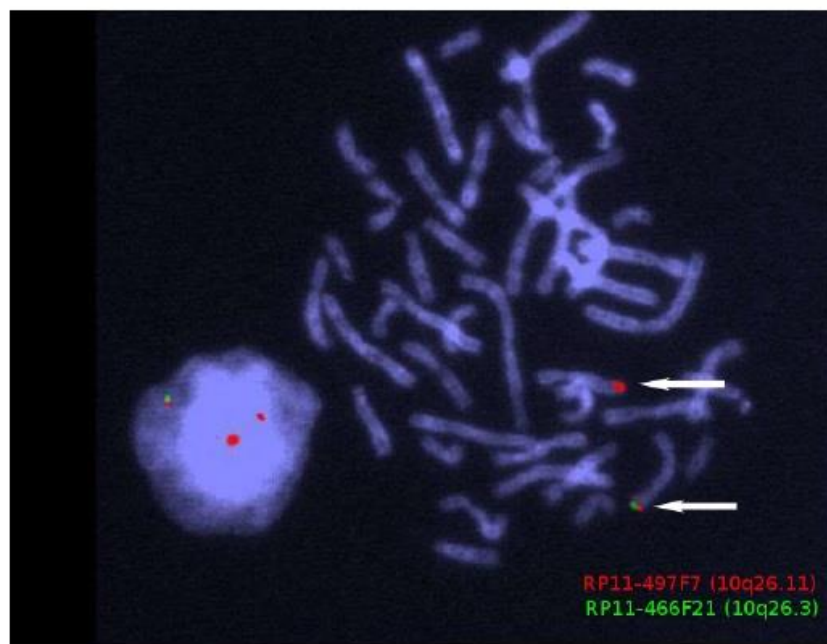
Skraćenice: IP, intelektualne poteškoće; M, muški pol; PAC, pacijent; RK, razvojno kašnjenje; VUR, vezikouretralni refluks; Ž, ženski pol.
Akronim: OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.

4.3.2. Prikaz pacijenta br. 129

Pacijent br. 129 je devojčica sa facijalnim dismorfizmima, zaostajanjem u razvoju, lateralnom devijacijom palčeva i zaostajanjem u razvoju govora. Analizom molekularnog kariotipa identifikovana je patogena duplikacija od 7,47 Mb u regionu 10q26.11→q26.3 i patogena terminalna delecija od 3,67 Mb u regionu 10q26.3 (Slika 6). Ove promene su kompatibilne sa postojanjem hromozomske reorganizacije po tipu inverzije-duplikacije-delecije (inv dup del) u 10q regionu. Kako bi se utvrdilo da li je varijanta *de novo* ili nasleđena, kao i da li je neko od roditelja nosilac hromozomskog rearanžmana, koji bi mogao da poveća rizik za rekurenciju u narednim trudnoćama, urađena je FISH analiza kod pacijenta (Slika 7) i roditelja (Slike 8 i 9). FISH analiza je pokazala prisustvo dva signala, za deletirani i duplicirani region, kod oba roditelja. Ovi rezultati ukazuju da je rearanžman kod pacijenta nastao *de novo* ili, na eventualno postojanje gonadalnog mozaicizma kod jednog od roditelja. Dodatno, analiza roditelja je omogućila da se isključi i postojanje insercione translokacije koja značajno može da utiče na rizik za rekurenciju (Nowakowska *et al.*, 2012). Za analizu su korišćeni FISH klonovi RP11-479F7 (10q26.11) za region koji je dupliciran kod pacijenta i RP11-466F21 (10q26.3) za region koji je deletiran kod pacijenta, obeleženi crvenom i zelenom bojom respektivno.



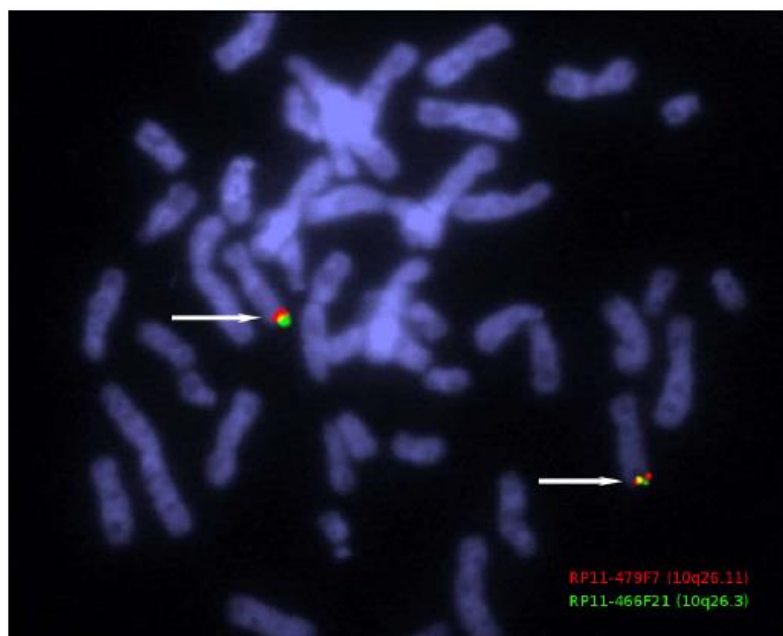
Slika 6. Prisustvo udružene delecije i duplikacije na dugom kraku hromozoma 10 kod pacijenta br.129.



Slika 7. Na slici se uočavaju tri inetrfazna signala crvene boje koja odgovaraju klonu RP11-479F7, i jedan hibridizacioni signal zelene boje koji odgovara klonu RP11-466F21 što potvrđuje prisustvo delecije i duplikacije kod pacijenta br. 129.



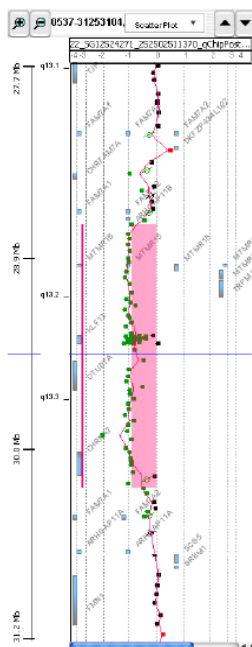
Slika 8. Kod oca pacijenta br. 129 prisutna su po dva signala za oba klona, što odgovara normalnom obrascu hibridizacije.



Slika 9. Kod majke pacijenta br. 129 prisutna su po dva signala za oba klona, što odgovara normalnom obrascu hibridizacije.

4.3.3. Prikaz pacijenta br. 111

Indikacija za analizu molekularnog kariotipa kod pacijenta br. 111 je bilo zaostajanje u psihomotornom razvoju i epilepsija, kao i atrofične promene i poremećaj mijelinizacije identifikovane magnetnom rezonancom mozga. Identifikovano je prisustvo delecije od 1,58 Mb u regionu 15q13.3 (Slika 10). Sve patogene i verovatno patogene promene u broju kopija identifikovane u našoj studiji su nastale *de novo*, osim ove kod pacijenta br. 111, koji je deleciju nasledio od oca koji ima epilepsiju. Slične delecije su prethodno opisane u literaturi u okviru 15q13.3 mikrodelecionog sindroma (OMIM: 612001), koji ima veoma varijabilan fenotip, a može uključiti intelektualno zaostajanje, probleme sa govorom, epilepsiju. Ipak, odlikuje ga nepotpuna penetrantnost (od oko 80%) i većina pacijenata je ovu mikrodeleciju nasledila od roditelja koji su u 72% slučajeva zdravi (Gillentine and Schaaf, 2015; Lowther *et al.*, 2015). Kod pacijenta je takođe identifikovana i verovatno benigna duplikacija od 3 Mb u regionu Yq11.223→q11.23, koja se ne podudara sasvim sa promenama u broju kopija koje su prethodno opisane u opštoj populaciji.



Slika 10. Rekurentna intersticijalna delecija u regionu 15q13.2q13.3. identifikovana kod pacijenta br. 111 i njegovog oca.

4.3.4. Analiza korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa

Analiza korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa je rađena sa ciljem formiranja dijagnostičkog algoritma kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama. Identifikovanje parametara koji su u korelaciji sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa, omogućilo bi bolju selekciju pacijenata za ovu analizu i time brže postavljanje genetičke dijagnoze.

Za analizu korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa korišćeni su Pirsonov hi-kvadrat test i Fišerov test tačne verovatnoće. Analiziran je fenotip dve grupe pacijenata:

1. Pacijenti sa negativnim nalazom molekularnog kariotipa ili identifikovanom benignom varijantom i,
2. Pacijenti sa identifikovanom patogenom ili verovatno patogenom varijantom.

Ispitivani klinički parametri i rezultati statističke analize su prikazani u Tabeli 6. i na Slici 11. Utvrđeno je da postoji korelacija između prisustva multiplih *major* mana i mikrocefalije i patološkog nalaza molekularnog kariotipa. Prisustvo jedne *major* mane je češće kod pacijenata sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa, ipak nije dobijena statistička značajnost.

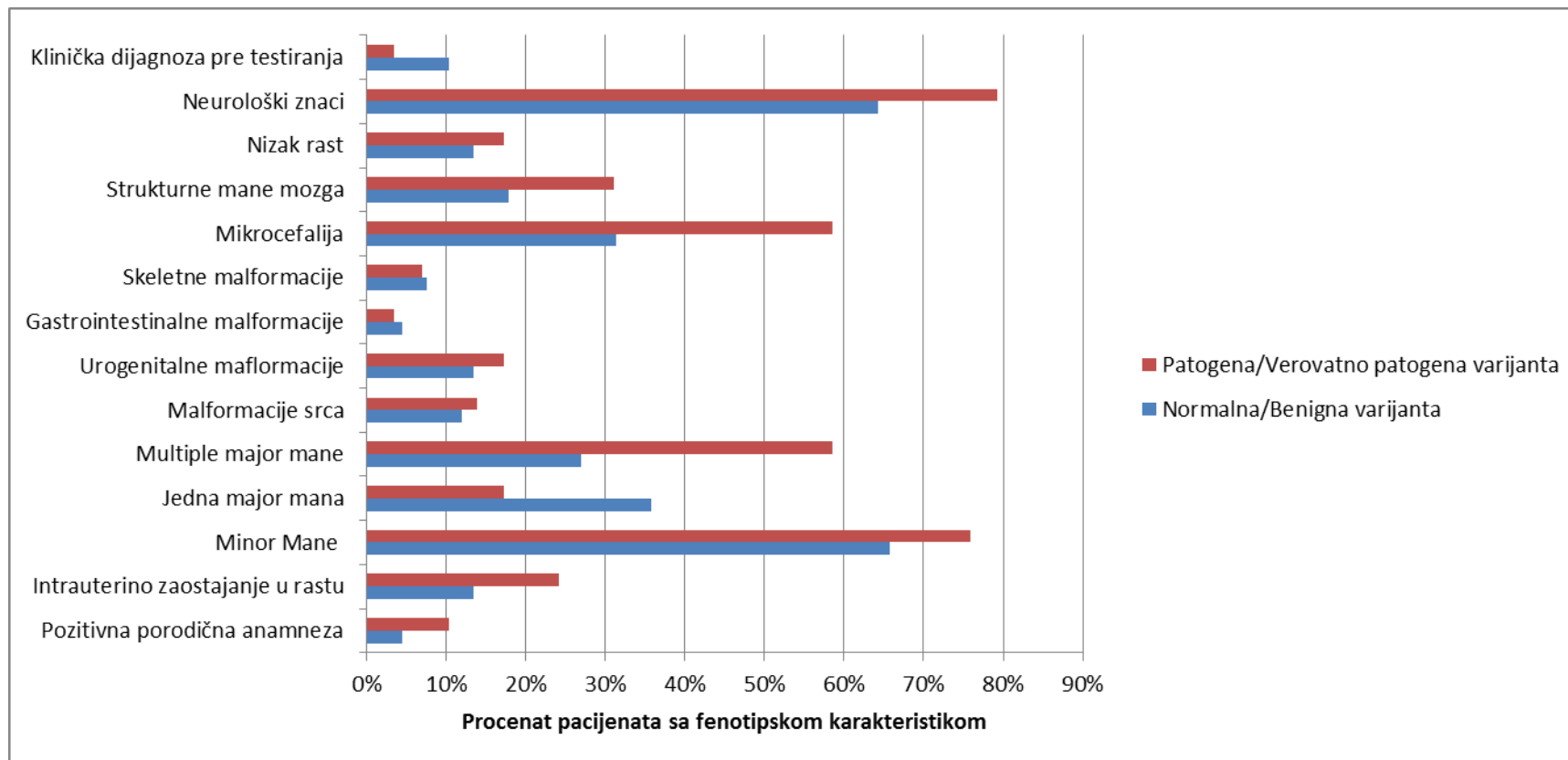
Analizirana je i korelacija različitih kombinacija kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa. Ispitivane kombinacije kliničkih parametara i rezultati statističke analize su prikazani u Tabeli 7. i na Slici 12. Dobijeni rezultati su skladu sa onim za pojedinačne fenotipske karakteristike. Statistički značajna korelacija postoji između prisustva multiplih *major* mana i normalnog longitudinalnog rasta i patološkog nalaza molekularnog kariotipa, dok je odsustvo intrauterinog zaostajanja u rastu i multiplih *major* mana u korelaciji sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa. Prisustvo jedne *major* mane i normalnog longitudinalnog rasta je češće kod pacijenata sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa, ipak, nije dobijena statistička značajnost.

Tabela 6. Korelacija između kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa

KLINIČKI PARAMETRI	REZULTAT MOLEKULARNOG KARIOTIPA (BROJ PACIJENATA)		p vrednost
	NORMALNA/BENIGNA VARIJANTA (67)	PATOGENA/VEROVATNO PATOGENA VARIJANTA (29)	
Pozitivna porodična anamneza	3 (4,5%)	3 (10,30%)	0,362 ^a
Intrauterino zaostajanje u rastu	9 (13,4%)	7 (24,1%)	0,237 ^a
Autizam	6 (9%)	0 (0%)	0,173 ^a
Rascep usne i/ili nepca	4 (6%)	4 (13,8%)	0,238 ^a
<i>Minor</i> mana	44 (65,7%)	22 (75,9%)	0,323 ^b
Jedna <i>major</i> mana	24 (35,8%)	5 (17,2%)	0,069 ^b
Multiple <i>major</i> mane	18 (26,9%)	17 (58,6%)	0,003^b
Mikrocefalija	21 (31,3%)	17 (58,6%)	0,028^b
Strukturne mane mozga	12 (17,9%)	9 (31%)	0,153 ^b
Gastrointestinalne malformacije	3 (4,5%)	1 (3,4%)	1,000 ^a
Malformacije srca	8 (11,9%)	4 (13,8%)	0,750 ^a
Urogenitalna malformacije	9 (13,4%)	5 (17,2%)	0,754 ^a
Skeletne malformacije	5 (7,5%)	2 (6,9%)	1,000 ^a
Neurološki znaci	43 (64,2%)	23 (79,3%)	0,142 ^b
Nizak rast	5 (9,8%)	6 (12,5%)	0,754 ^a
Klinička dijagnoza pre testiranja	9 (13,4%)	5 (17,2%)	0,428 ^b

^aFišerov test tačne verovatnoće

^bPirsonov hi-kvadrat test

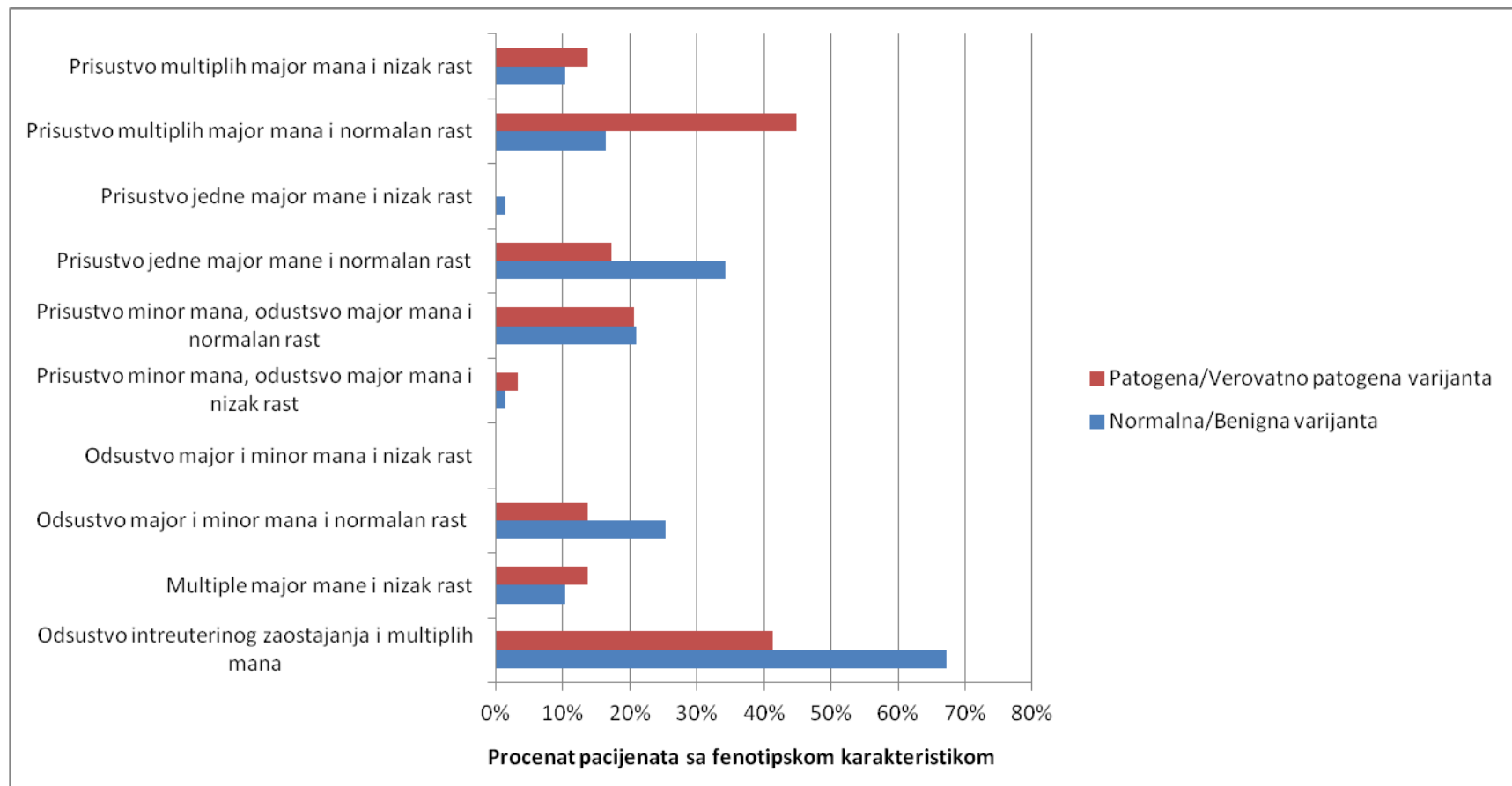


Slika 11. Korelacija između kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa. Statistički značajna korelacija postoji između patološkog nalaza molekularnog kariotipa i multiplih *major* mana i mikrocefalije. Prisustvo jedne *major* mane je češće kod pacijenata sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa, ipak, nije dobijena statistička značajnost.

Tabela 7. Korelacija kombinacija kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa

KLINIČKI PARAMETRI	REZULTAT MOLEKULARNOG KARIOTIPA (BROJ PACIJENATA)		p vrednost
	NORMALNA/BENIGNA VARIJANTA (67)	PATOGENA/VEROVATNO PATOGENA VARIJANTA (29)	
Odsustvo intrauterinog zaostajanja i multiplih <i>major</i> mana	45 (67,2%)	12 (41,4%)	0,018^b
Multiple <i>major</i> mane i nizak rast	7 (10,4%)	4 (13,8%)	0,730 ^a
Odsustvo <i>major</i> i <i>minor</i> mana i normalan longitudinalni rast	17 (25,4%)	4 (13,8%)	0,208 ^b
Odsustvo <i>major</i> i <i>minor</i> mana i nizak rast	0 (0%)	0 (0%)	/
Prisustvo <i>minor</i> mana, odsustvo <i>major</i> mana i nizak rast	1 (1,5%)	1 (3,4%)	0,515 ^a
Prisustvo <i>minor</i> mana, odsustvo <i>major</i> mana i normalan longitudinalni rast	14 (20,9%)	6 (20,7%)	0,982 ^b
Prisustvo jedne <i>major</i> mane i normalan longitudinalni rast	23(34,3%)	5 (17,2%)	0,091 ^b
Prisustvo jedne <i>major</i> mane i nizak rast	1 (1,5%)	0 (0%)	1,000 ^a
Prisustvo multiplih <i>major</i> mana i normalan longitudinalni rast	11 (16,4%)	13 (44,8%)	0,003^b
Prisustvo multiplih <i>major</i> mana i nizak rast	7 (10,4%)	4 (13,8%)	0,730 ^b

^aFišerov test tačne verovatnoće^bPirsonov hi-kvadrat test



Slika 12. Korelacija između kombinacija kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa. Statistički značajna korelacija postoji između prisustva multiplih *major* mana i normalnog longitudinalnog rasta i patološkog nalaza molekularnog kariotipa, dok je odsustvo intrauterinog zaostajanja u rastu i multiplih *major* mana u korelaciji sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa. Prisustvo jedne *major* mane i normalnog longitudinalnog rasta je češće kod pacijenata sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa, ipak, nije dobijena statistička značajnost.

4.4. Rezultati sekvenciranja „kliničkog egzoma“

4.4.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije

Sekvenciranje “kliničkog egzoma” je urađeno kod 110 pacijenata. Patogena ili verovatno patogena varijanta (klasa V i IV) je identifikovana kod 48 pacijenata, čime je postignuta stopa detekcije od 43,6% (48/110). Autozomno-dominantan obrazac nasleđivanja je bio prisutan kod 60,4% (29/48) pacijenata, autozomno-recesivan kod 33,3% (16/48) pacijenata, dok je X-vezano recesivno i X-vezano dominantno nasleđivanje opisano kod dva (4,2%, 2/48) i jednog (2,1%, 1/48) pacijenata respektivno. Roditelji pacijenata su testirani u 75% (36/48) slučajeva, dok su preostali bili nedostupni za testiranje.

Ukupno je detektovano 55 varijanti kod 48 pacijenata, od toga 37 novih varijanti koje prethodno nisu opisane u literaturi. Od identifikovanih varijanti najzastupljenje su bile *missense* varijante (23/55, 41,8%) i *nonsense* varijante (23,6%, 13/55). *Frameshift*, *splice-site* varijante i *in-frame* delecije su identifikovane deset (18,2%, 10/55), šest (10,1%, 6/55) i tri (5,4%, 3/55) puta respektivno. Samo su kod pacijenta br. 204 identifikovane varijante u dva gena, kod svih ostalih pacijenata detektovane su varijante u jednom genu. Jedina varijanta koja je identifikovana kod više od jednog pacijenta je NM_207346.2:c.919G>T p.Ala307Ser u *TSEN54* genu, prisutna kod pacijenata br. 143, 149 i 180. Sve identifikovane varijante su asocirane sa dobro okarakterisanim bolestima iz OMIM baze (engl., *Online Mendelian Inheritance in Man*) (Hamosh *et al.*, 2005).

Među dobijenim rezultatima posebno se izdvajaju oni za pacijente br. 202 i 148. Kod pacijenta br. 202 je identifikovana nova homozigotna varijanta u *NRXNI* genu, koja je asocirana sa sindromom nalik Pit-Hopkinsovom sindromu tip 2 (OMIM:614325). Prisustvo iste varijante je potvrđeno kod majke ali ne i kod oca. Analizom homozigotnosti utvrđeno je da se ona rasprostire duž čitavog hromozoma br. 2, na kom se *NRXNI* gen i nalazi, ukazujući na prisustvo maternalne uniparentalne dizomije (skr. UPD). Kod pacijenta br. 148 sa Rubinštajn-Tajbijevevim sindromom (OMIM:180849), utvrđeno je prisustvo uzročne varijante u mozaiku od 18,5%.

Varijante nepoznate značajnosti su identifikovane kod 11 pacijenata (11/110, 10%).

Pre testiranja metodom kliničkog egzomskog sekvenciranja, 19 pacijenata je imalo specifičnu kliničku dijagnozu (17,3%, 19/110). Kod sedam (36,8%, 7/19) od njih je dijagnoza potvrđena (Retov sindrom kod pacijenta br. 200, Draveov sindrom kod pacijenta br. 160, Kornelija de Lange sindrom kod pacijenta br. 212, Rubinštaj-Tajbijevev sindrom kod pacijenta br. 148, Kofin-Lovrijevev sindrom kod pacijenta br. 150, Žuberov sindrom kod pacijenta br. 170 i Opic-Kavegia sindrom kod pacijenta br. 176), kod četiri (21%, 4/19) je postavljena nova dijagnoza, a osam (41,2%, 8/19) je imalo negativan nalaz sekvenciranja “kliničkog egzoma”.

Pregled patogenih i verovatno patogenih varijanti, kao i najznačajnijih kliničkih podataka pacijenata, predstavljen je u Tabeli 8.

Tabela 8. Patogene i verovatno patogene genske varijante identifikovane sekvenciranjem „kliničkog egzoma“.

PAC	POL	FENOTIP	DIJAGNOZA PRE TESTIRANJA	GEN	VARIJANTA (klasifikacija i ACMG kriterijum)	NOVA ILI POZNATA VARIJANTA	TIP NASLEĐIVANJA I ZIGOTNOST	TIP VARIJANTE	OMIM BAZA
1	M	IP, abnormalan oblik glave, ptoza, pes equinovarus, kamptodaktilija, dijafragmalna kila	/	AUTS2	NM_015570.3: c.742+1G>A p.? (Patogena, PVS1 PS2, PM2, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	Konczynska donorska splice site alteracija	Autozomno dominantna mentalna retardacija (OMIM:615834)
178 ^a	Ž	RK, imperforatni anus, odsustvo govora, mikrocefalija, teratomi	Kurarino sindrom	CTNNB1	NM_001098209.1: c.1876G>T p.Glu626X (Patogena, PVS1, PS2, PM2)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	Prerana insercija stop kodona	CTNNB1 – uzrokovana mentalna retardacija, autozomno dominantna 19 (OMIM:615075)
192	Ž	RK, kongenitalna cerebelarna hipoplazija, mikrocefalija, hipertoničnost, nistagmus	/	CASK	NM_003688.3: c.2221+1delinsAT p.? (Patogena, PVS1, PM2, PP3)	Nova	AD	Donorska splice site alteracija	X-vezana mentalna retardacija i mikrocefalija sa hipoplazijom ponsa i cerebeluma (OMIM:300749)
200 ^b	Ž	RK, razvojna regresija, stereoptipni pokreti, tremor, ataksija	Retov sindrom	MECP2	NM_001110792.1: c.433C>T p.Arg145Cys (Verovatno patogena, PS1, PM1, PM2, PP3)	Broj 11809 u ClinVar bazi	AD <i>De novo</i> Heterozigot	Missense	MECP2-asocirana bolest sa mentalnom retardacijom, zaostajanjem u razvoju i razvojnom regresijom (OMIM:300005)
135	Ž	Teško RK, generalizovani mioklonični napadi, progresivno neurološko propadanje, odsustvo hoda, otežano stajanje	/	ADSL	NM_000026.2: c.421C>T p.Arg141Trp (Verovatno patogena, PS1, PM2, PP2, PP3) NM_000026.2: c.340T>C p.Tyr114His (Verovatno patogena, PS1, PM2, PP2, PP3)	Broj CM990118 u HGMD bazi Broj CM001050 u HGMD bazi	AR Biparentalna transmisija Udruženi heterozigot	Missense Missense	Deficijencija adenilosukcinat liaze (OMIM:103050)
217	M	IP, epileptički napadi, abnormalan oblik glave, nisko postavljene uši	/	SLC6A8	NM_005629.3: c.1208C>T p.Ala403Val (Verovatno patogena, PM2, PM5, PP3, PP4)	Nova	XLR Hemizigot	Missense	Deficijencija cerebralnog kreatina sindrom 1 (OMIM:300352)
214	M	Razvojna regresija, hiperrefleksija, klonus, neonatalna hipotonija, abnormalna morfologija mozga	/	IFIH1	NM_022168.3: c.2336G>A p.Arg779His (Patogena, PS1, PS3, PM2, PP3)	Broj 137622 u ClinVar bazi	AD Heterozigot	Missense	Ajkardi-Gutijeresov sindrom 7 (OMIM:615846)

198	M	IP, Kašnjenje u razvoju govora, zaostajanje u rastu, komealno zamućenje, atrofija mozga, periventrikularna leukomalacija, zakasnela mijelinizacija	/	MCOLN1	NM_020533.2: c.777+1G>C p.? (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova		Konczynska donorska splice site alteracija	Mukopolidioza IV (OMIM:252650)
					NM_020533.2: c.378C>G p.Tyr126X (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AR Biparentalna transmisija Udruženi heterozigot	Prerana insercija stop kodona	
203	Ž	IP, leukodistrofija, hipotonija, megareret, hidronefroza, razvojna regresija	/	HERC2	NM_004667.5: c.6976delC p.Leu2326X (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AR Biparentalna transmisija Homozigot	Delecija nukleotida sa uvođenjem stop kodona	Autozomno recesivna mentalna retardacija 38 (OMIM:615516)
174	M	Teške IP, lizencefalija, Epilepsija	/	PAFAH1B1	NM_000430.3: c.56T>G p.Leu19Arg (Verovatno patogena, PS1, PM1, PM2, PP3)	Broj 159529 u ClinVar bazi	AD Heterozigot	Missense	Lizencefalija tip 1 (OMIM:607432)
149	Ž	RK, teška ambliopija, hipertenzija, deceleracija obima glave	/	TSEN54	NM_207346.2: c.919G>T p.Ala307Ser (Patogena, PS1, PS3, PP3)	Broj 2120 u ClinVar bazi	AR Homozigot	Missense	Pontocerebelarna hipoplazija tip 4 (OMIM:225753)
143	M	Teške IP, epilepsija, mikrocefalija	/	TSEN54	NM_207346.2: c.919G>T p.Ala307Ser (Patogena, PS1, PS3, PP3)	Broj 2120 u ClinVar bazi	AR Biparentalna transmisija Homozigot	Missense	Pontocerebelarna hipoplazija tip 4 (OMIM:225753)
180	M	Teško RK, teško zaostajanje u rastu, hipoplazija moždanog stabla	/	TSEN54	NM_207346.2: c.919G>T p.Ala307Ser (Patogena, PS1, PS3, PP3)	Broj 2120 u ClinVar bazi	AR Biparentalna transmisija Homozigot	Missense	Pontocerebelarna hipoplazija tip 4 (OMIM:225753)
189	Ž	RK, epileptička encefalopatija, teška hipotonija	/	WVOX	NM_016373.3: c.918delG p.Glu306fs (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova		Frameshift	
					NM_016373.3: c.183C>A p.Tyr61Ter (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AR Biparentalna transmisija Udruženi heterozigot	Prerana insercija stop kodona	Epileptička encefalopatija, rana infantilna, 28 (OMIM:616211)

158	Ž	RK, epileptička encefalopatija, generalizovana hipotonija	/	CDKL5	NM_001037343.1: c.1471_1472dupGC p.Leu492fs (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	XLD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Frameshift</i>	X-vezana dominantna rana infantilna epileptička encefalopatija 2 (OMIM:300672)
155	Ž	Teško RK, mikrocefalija, epilepsija	/	STXBP1	NM_003165.3: c.733C>G p.His245Asp (Verovatno patogena, PS2, PM2, PM5, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Epileptička encefalopatija, rana infantilna 4 (OMIM:612164)
136 ^a	M	IP, motorno zaostajanje, neonatalne konvulzije, nespušteni testisi sagitalna kraniostenozna, kratke ruke sa suženim prstima	Šinzel-Gedionov sindrom	KCNQ2	NM_172107.2: c.1067T>G p.Leu356Arg (Verovatno patogena, PS2, PM2, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Epileptička encefalopatija, rana infantilna 7 (OMIM:613720)
190	Ž	Teško RK, generalizovana hipotonija, epilepsija	/	KCNQ2	NM_172107.2: c.869G>T p.Gly290Val (Verovatno patogena, PS2, PM2, PM5, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Epileptička encefalopatija, rana infantilna 7 (OMIM:613720)
161	Ž	RK, regresija govora, farmakorezistentna epilepsija	/	SCN1A	NM_001165963.1: c.602+3_602+6delAA GT p.? (Verovatno patogena, PS2, PM2)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	Efekat na isecanje egzona	Draveov sindrom i drugi fenotipovi sa epilepsijom (OMIM:182389)
160 ^b	Ž	IP, hiperpigmentacija kože, hiperkeratoza, makrocefalija, epilepsija	Draveov sindrom	SCN1A	NM_001165963.1: c.974_976delATT p.Tyr325del (Verovatno patogena, PS2, PM1, PM2, PP4)	Wu et al, ⁴⁶ 2015	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Inframe</i>	Draveov sindrom (OMIM:607208)
157	M	IP, autizam, ponašajne abnormalnosti, epilepsija	/	GRIN2B	NM_000834.3: c.2225G>T p.Arg742Ile (Verovatno patogena, PS2, PM2, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Epileptička encefalopatija, rana infantilna 27 (OMIM:616139), Autozomno dominantna mentalna retardacija tip 6 (OMIM:613970)
151	M	RK, IP, mikrocefalija, infantilni spazmi, facijalna dismorfija, nemogućnost sedenja i hodanja, suženi prsti	/	GRIN2B	NM_000834.3: c.2395G>A p.Gly799Ser (Verovatno patogena, PS2, PM2, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Epileptička encefalopatija, rana infantilna 27 (OMIM:616139), Autozomno dominantna mentalna retardacija tip 6 (OMIM:613970)

162	Ž	Teške IP, prenatalno zaostajanje, mikrocefalija, kraniosinostoza, abnormalnosti u ponašanju, napadi, skolioza	/	GRIN2B	NM_000834.3: c.2216T>G p.Met739Arg (Verovatno patogena, PS2, PM2, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i>	<i>Missense</i>	Epileptička encefalopatija, rana infantilna 27 (OMIM:616139), Autozomno dominantna mentalna retardacija tip 6 (OMIM:613970)
142	M	RK, teška infantilna refraktorna epilepsija	/	ALDH7A1	NM_001182.4: c.328C>T p.Arg110Ter (Verovatno patogena, PVS1, PS1, PM2)	Broj RCV 00001961.1 u ClinVar bazi		Prerana insercija stop kodona	
					NM_001182.4: c.1566-1G>T p.? (Verovatno patogena, PVS1, PS1, PM2)	Plecko et al, ⁴⁷ 2007	AR Biparentalna transmisija Udruženi heterozigot	Konczynska akceptorska <i>splice site</i> alteracija	Piridoksin-zavisna epilepsija (OMIM:107323)
138	M	IP, minor dismorfizmi, napadi, ventrikulomegalija	/	ATP1A3	NM_001256214.1: c.449C>T p.Ser150Phe (Patogena, PS1, PS2, PM2, PP3)	Novy et al, ⁴⁸ 2014 Heinzen et al, ⁴⁹ 2012	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Naizmjenična hemiplegija (OMIM:614820)
159	Ž	RK, napadi, zaostajanje u rastu, prenatalno zaostajanje	/	PNPO	NM_018129.3: c.674G>A p.Arg225His (Patogena, PS1, PM2, PP3)	Plecko et al, ⁵⁰ 2014	AR Homozigot	<i>Missense</i>	Deficijencija piridoksamin-5-prim-fosfat oksidaze (OMIM:107323)
191	M	RK, generalizovana hipotonija, infantilni spazmi	/	ARX	NM_139058.2: c.1579_1582delAGAC p.Arg527fs (Patogena, PVS1, PM2, PP3.)	Nova	XLR <i>De novo</i> Hemizigot	<i>Frameshift</i>	Rana infantilna epileptička encefalopatija 1 (OMIM:308350)
144	M	IP, RK, motorno zaostajanje, napadi, nespušteni testisi	/	BRAF	NM_004333.4: c.755G>C p.Arg252Pro (Verovatno patogena, PS2, PM2, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Nunanov sindrom 7 (OMIM:613706)
212 ^b	Ž	RK, hirzutizam, mikrocefalija, hipertenzija, progresivna naglupost, abnormalnosti srčanih ventila	Kornelija de Lange sindrom	SMC1A	NM_006306.3: c.802_804delAAG p.Lys268del (Patogena, PS1, PM2, PM4, PP3, PP4)	Broj 180197 u ClinVar bazi	AD Heterozigot	<i>Inframe</i> delecija	Kornelija de Lange sindrom, tip 2 (OMIM:300590)

148 ^b	M	RK, abnormalan oblik lica, zaostajanje u govoru, skolioza	Rubinštajn-Tajbijevev sindrom	CREBBP	NM_004380.2: c.6244C>T p.Gln2082X (Patogena, PVS1, PS2, PM2)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot Mozaik 18,5%	Prerana insercija stop kodona	Rubinštajn-Tajbijevev sindrom (OMIM:180849)
210 ^a	Ž	IP, sinofris, abnormalnosti centralnog nervnog sistema, abnormalnosti palčeva, spasticitet, spinalni disrafizam	Kornelija de Lange sindrom	CREBBP	NM_004380.2: c.6185_6195delTCTC ACCCAGC p.Ile2062fs (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AD Heterozigot	<i>Frameshift</i>	Rubinštajn-Tajbijevev sindrom (OMIM:180849)
164	M	RK, IP, poremećaj pažnje, zaostajanje u rastu, epilepsija	/	UBE3A	NM_000462.3: c.2513_2525dup p.Cys843fs (Patogena, PVS1, PS2, PM2)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Frameshift</i>	Angelmanov sindrom (OMIM:105830)
172	Ž	RK, abnormalan oblik lica, polimikrogirija, otežan hod, motorno zaostajanje	/	EHMT1	NM_024757.4: c.2712+1G>A p.? (Patogena, PVS1, PS1, PS2, PM2)	Rump et al, ⁵¹ 2013	AD <i>De novo</i> Heterozigot	Konczynska donorska <i>splice site</i> alteracija	Kleefstra sindrom (OMIM:610253)
154	M	RK, epilepsija, mikrocefalija, mikrognacija, problemi u govoru, abnormalnosti lica	/	SATB2	NM_001172509.1: c.1990C>T p.Gln664X (Patogena, PVS1, PS2, PM2)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	Prerana insercija stop kodona	Glasov sindrom (OMIM:612313)
150 ^b	M	RK, hipotonija, motorno zaostajanje, usporen razvoj govora, makrocefalija	Kofin-Lovrijevev sindrom	RPS6KA3	NM_004586.2: c.1522C>T p.Gln508X (Patogena, PVS1, PM2, PP4)	Nova	XLR <i>De novo</i> Hemizigot	Prerana insercija stop kodona	Kofin-Lovrijevev sindrom (OMIM:303600)
215 ^a	Ž	IP, epilepsija, gojaznost, brahidaktilija	Olbrajtovev hereditarna osteodistrofija	PRMT7	NM_001290018.1: c.322G>T p.Glu108X (Patogena, PVS1, PM2, PP4)	Nova		Prerana insercija stop kodona	
					NM_001290018.1: c.1713C>A p.Cys571X (Pathogenic, PVS1, PM2, PP4)	Nova	AR Udruženi heterozigot	Prerana insercija stop kodona	SBIDDS (engl., <i>Short Stature, Brachydactyly, Intellectual Developmental Disability, and Seizures</i>) sindrom (OMIM:617157)

170^b	Ž	Globalno RK, slepilo	Žuberov sindrom	CEP290	NM_025114.3: c.1512_1515delAGAG p.Arg504fs (Patogena, PVS1, PM2, PP4)	Nova		<i>Frameshift</i>	
					NM_025114.3: c.4882C>T p.Gln1628X (Patogena, PVS1, PM2, PP4)	Broj 46 u CEP290 bazi varijanti (https://cep290base.cmgg.be/index.php#browser)	AR Biparentalna transmisija Udsruženi heterozigot	Prerana insercija stop kodona	Žuberov sindrom 5 (OMIM:610188)
147	M	IP, abnormalan oblik lica, hipertelorizam, kratak nos, suženi prsti, nespušteni testisi, <i>talipes equinovarus</i>	/	KAT6B	NM_012330.3: c.5213C>T p.Thr1738Ile (Verovatno patogena, PM2, PM6, PP3, PP4)	Nova	AD Heterozigot	<i>Missense</i>	Genitopatelni sindrom (OMIM:606170), SBBYS (engl., <i>Blepharophimosis-intellectual disability</i>) sindrom (OMIM:603736)
181	Ž	IP, slabo razvijen govor, abnormalnosti lica, hipoplazija bubrega, epikantus, hipoplazija maksile	/	KAT6B	NM_012330.3: c.3399_3402delGGGT p.Arg1133fs (Patogena, PVS1, PM2, PM6)	Nova	AD Heterozigot	<i>Frameshift</i>	Genitopatelni sindrom (OMIM:606170), SBBYS (engl., <i>Blepharophimosis-intellectual disability</i>) sindrom (OMIM:603736)
204	Ž	IP, progresivna neurodegenerativna bolest	/	COL18A1	NM_030582.3: c.4054_4055delCT p.Leu1352X (Patogena, PVS1, PM2, PP4)	Nova		Prerana insercija stop kodona	
		Vardenburg sindrom		MITF	NM_030582.3: c.3559G>A p.Gly1187Ser (Verovatno patogena, PM1, PM2, PP3, PP4)	Nova	AR Biparentalna transmisija Udruženi heterozigot	<i>Missense</i>	Knoblohov sindrom tip 1 (OMIM:267750)
					NM_198159.2: c.794A>G p.Tyr265Cys (Verovatno patogena, PS2, PM2, PP3, PP4)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Vardenburgov sindrom tip 2A (OMIM:193510)
169	M	RK, rotatorni nistagmus, polidaktilija, hronična bubrežna bolest	/	MKS1	NM_017777.3: c.1115_1117delCCT p.Ser372del (Verovatno patogena, PS1, PM2, PM4, PP4)	Broj 217677 u ClinVar bazi 217677	AR Homozigot	<i>Inframe</i> delecija	Mekelov sindrom (OMIM:249000)

176 ^b	M	RK, IP, imperforatni anus, agenezija žuljevitog tela, abnormalan oblik lica	Opic-Kavegia sindrom	MED12	NM_005120.2: c.2881C>T p.Arg961Trp (Patogena, PS1, PS2, PM2, PP3)	Broj 11520 u ClinVar bazi 11520	XLR Maternalnog porekla Hemizigot	<i>Missense</i>	Opic-Kavegia sindrom (OMIM:305450)
202	Ž	Teško neurološko propadanje sa razvojnou regresijom i leukodistrofijom	/	NRXN1	NM_001135659.1 c.868_869del p.Glu290LysfsX18 (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AR Maternalna uniparentalna dizomija Homozigot	<i>Frameshift</i> delecija sa uvođenjem stop kodona	Pit-Hopkins-nalik sindrom 2 (OMIM:614325)
83	M	Abnormalan oblik lica, hipertelorizam, IP, motorno zaostajanje, ventrikularni septalni defekt, telangiektazije	/	ANKRD11	NM_001256182.1 c.5865delG p.Glu1955fs (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AD Heterozigot	<i>Frameshift</i>	KBG sindrom (OMIM:148050)
101	Ž	Teško RK, abnormalan oblik lica, nistagmus, hidrocefalus, malformacije srca, epilepsija, slabovidost	/	PUS3	NM_031307.3 c.366_367delTG p.Ser122fs (Verovatno patogena, PVS1, PM2)	Nova	AR Biparentalna transmisija Udruženi heterozigot	<i>Frameshift</i> <i>Missense</i>	Autozomno recesivna mentalna retardacija (OMIM:617051)
107	M	Kongenitalni nistagmus, ventrikulomegalija, IP, pontocerebelarna hipoplazija, oštećenja bazalnih ganglija	/	TUBB3	NM_006086.3 c.863A>C p.Glu88Ala (Verovatno patogena, PM2, PM5, PM6, PP3)	Nova	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Kompleksna kortikalna displazija sa drugim malformacijama mozga (OMIM:614039)
123	Ž	Teško RK, deceleracija obima glave, kongenitalna slabovidost	/	GRIN1	NM_001185090.1 c.1973C>T p.Ala658Val (Verovatno patogena, PM1, PM2, PM6, PP3, PP5)	Broj 452518 u ClinVar bazi	AD <i>De novo</i> Heterozigot	<i>Missense</i>	Autozomno dominantna i autozomno recesivna bolest sa ili bez hiperkinetičkih pokreta i epilepsijom (OMIM:614254)
124	Ž	Mikrocefalija, abnormalnosti metabolizma/homeosta ze, cerebralna kalcifikacija	/	MRPS22	NM_020191.2 c.1032_1035dupACA p.Leu346fs (Patogena, PVS1, PM2, PS1)	Baertling at al	AR Homozigot	<i>Frameshift</i>	Kombinovana deficiencija oksidativne fosforilacije 5 (OMIM:611719)

Skraćenice: AD, autozomno dominantno; AR, autozomno recesivno; IP, intelektualne poteškoće; M, muški pol; MLPA, engl., *multiplex ligation probe dependent amplification*; PAC, pacijent; RK, razvojno kašnjenje; Ž, ženski pol; XLD, X-vezano dominantno (engl., *X-linked dominant*); XLR, X-vezano recesivno (engl., *X-linked recessive*).

Akronimi: ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; ExAC, Exome Aggregation Consortium; GnomAD, Genome Aggregation Database; HGMD, The Human Gene Mutation Database; OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.

^aPromenjena inicijalna dijagnoza

^bPotvrđena inicijalna dijagnoza

4.4.2. Analiza korelacije kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“

Analiza korelacije kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“ je rađena sa ciljem formiranja dijagnostičkog algoritma kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama. Identifikovanje parametara koji su u korelaciji sa patološkim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“, omogućilo bi bolju selekciju pacijenata za ovu analizu i time brže postavljanje genetičke dijagnoze.

Za analizu korelacije kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“ korišćeni su Pearsonov hi-kvadrat test i Fisherov test tačne verovatnoće. Analiziran je fenotip dve grupe pacijenata:

1. Pacijenti sa negativnim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ ili identifikovanom benignom varijantom i,
2. Pacijenti sa identifikovanom patogenom ili verovatno patogenom varijantom.

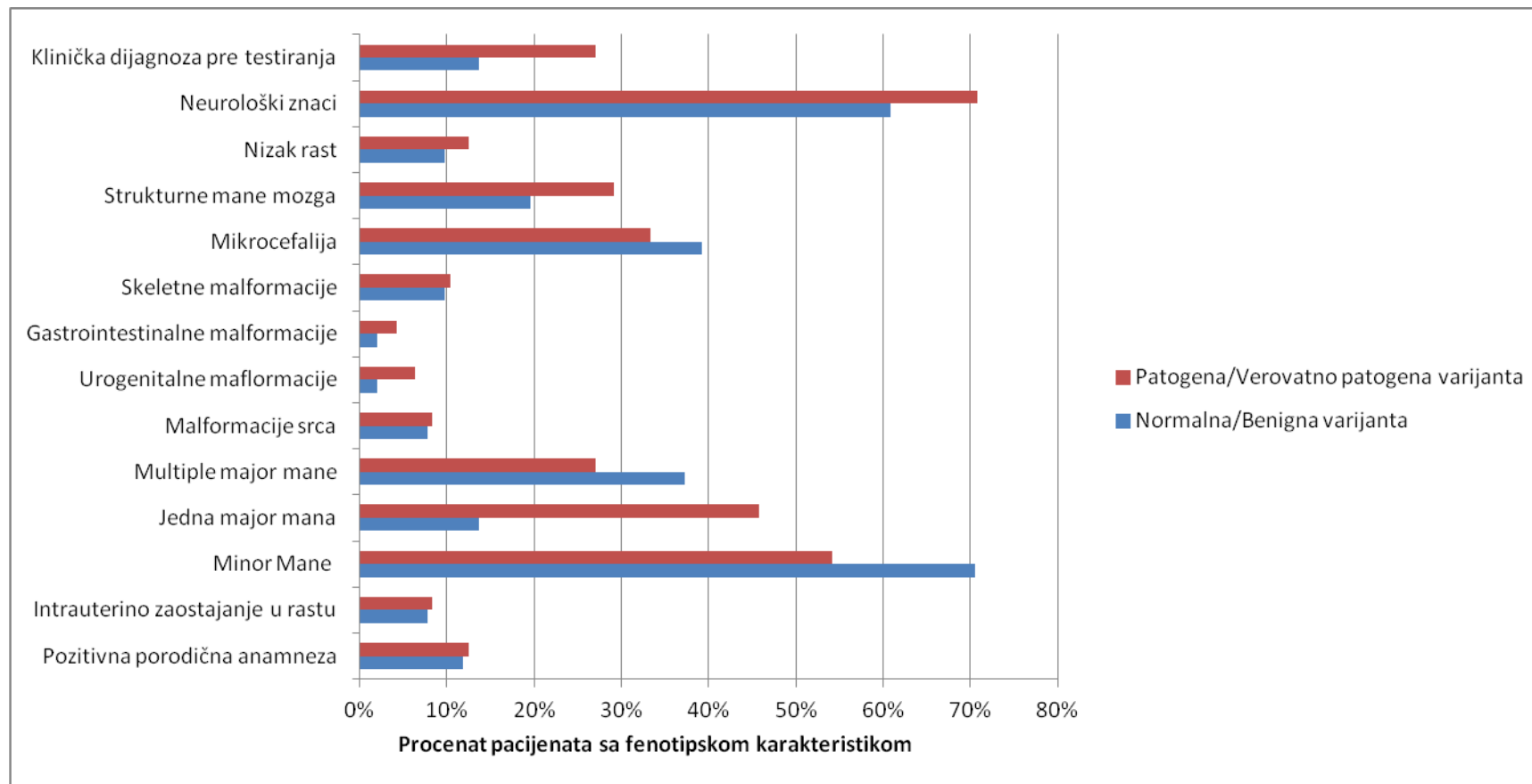
Ispitivani klinički parametri i rezultati statističke analize su prikazani u Tabeli 9. i na Slici 13. Utvrđeno je da postoji korelacija između prisustva jedne *major* mane i patološkog nalaza sekvenciranja „kliničkog egzoma“. Specifična klinička dijagnoza pre testiranja i odsustvo *minor* mana je češće kod pacijenata sa patološkim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“, ipak, nije dobijena statistička značajnost.

Analizirana je i korelacija različitih kombinacija kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“. Ispitivane kombinacije kliničkih parametara i rezultati statističke analize su prikazani u Tabeli 10. i na Slici 14. Dobijeni rezultati su skladu sa onim za pojedinačne fenotipske karakteristike. Statistički značajna korelacija postoji između prisustva jedne *major* mane i normalnog longitudinalnog rasta i patološkog nalaza sekvenciranja „kliničkog egzoma“, dok je prisustvo *minor* mana i normalnog longitudinalnog rasta, bez *major* mana, u korelaciji sa normalnim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“.

Tabela 9. Korelacija između kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“

KLINIČKI PARAMETRI	REZULTAT SEKVENCIRANJA „KLINIČKOG EGZOMA“ (BROJ PACIJENATA)		p vrednost
	NORMALNA/BENIGNA VARIJANTA (51)	PATOGENA/VEROVATNO PATOGENA VARIJANTA (48)	
Pozitivna porodična anamneza	6 (11,8%)	6 (12,5%)	0,911 ^a
Intrauterino zaostajanje u rastu	4 (7,8%)	4 (8,3%)	1,000 ^a
Autizam	5 (9,8%)	1 (2,1%)	0,206 ^a
Rascep usne i/ili nepca	3 (5,9%)	0 (0%)	0,243 ^a
Minor mana	36 (70,6%)	26 (54,2%)	0,091 ^b
Jedna major mana	7 (13,7%)	22 (45,8%)	<0,001^b
Multiple major mane	19 (37,3%)	13 (27,1%)	0,280 ^b
Mikrocefalija	20 (39,2%)	16 (33,3%)	0,543 ^b
Strukturne mane mozga	10 (19,6%)	14 (29,2%)	0,267 ^b
Gastrointestinalne malformacije	1 (2%)	2 (4,2%)	0,610 ^a
Malformacije srca	4 (7,8%)	4 (8,3%)	1,000 ^a
Urogenitalna malformacije	1 (2%)	3 (6,3%)	0,352 ^a
Skeletne malformacije	5 (9,8%)	5 (10,4%)	1,000 ^a
Neurološki znaci	31 (60,8%)	34 (70,8%)	0,293 ^b
Nizak rast	5 (9,8%)	6 (12,5%)	0,670 ^a
Klinička dijagnoza pre testiranja	7 (13,7%)	13 (27%)	0,098 ^b

^aFišerov test tačne verovatnoće^bPirsonov hi-kvadrat test



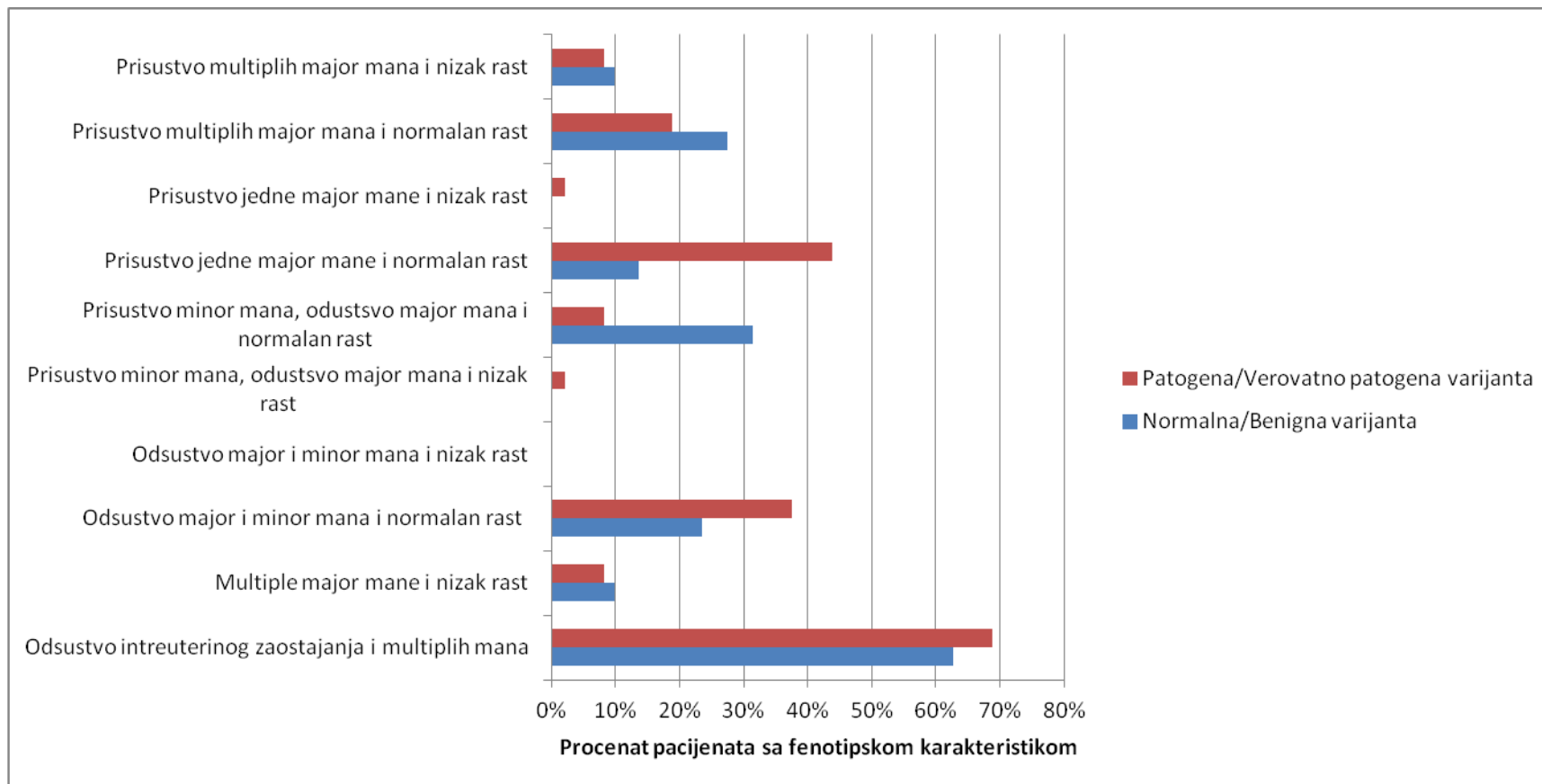
Slika 13. Korelacija između kliničkih parametara i sekvenciranja „kliničkog egzoma“. Statistički značajna korelacija postoji između prisustva jedne *major* mane i patološkog nalaza sekvenciranja „kliničkog egzoma“. Specifična klinička dijagnoza pre testiranja i odsustvo *minor* mana je češće kod pacijenata sa patološkim nalazom „kliničkog egzoma“, ipak, nije dobijena statistička značajnost.

Tabela 10. Korelacija kombinacija kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“

KLINIČKI PARAMETRI	REZULTAT SEKVENCIRANJA „KLINIČKOG EGZOMA“ (BROJ PACIJENATA)		p vrednost
	NORMALNA/BENIGNA VARIJANTA (51)	PATOGENA/VEROVATNO PATOGENA VARIJANTA (48)	
Odsustvo intrauterinog zaostajanja i multiplih <i>major</i> mana	32 (63%)	33 (68,8%)	0,529 ^b
Multiple <i>major</i> mane i nizak rast	5 (9,8%)	4 (8,30%)	1,000 ^a
Odsustvo <i>major</i> i <i>minor</i> mana i normalan longitudinalni rast	12 (23,5%)	18 (37,50%)	0,131 ^b
Odsustvo <i>major</i> i <i>minor</i> mana i nizak rast	0 (0%)	0 (0%)	/
Prisustvo <i>minor</i> mana, odsustvo <i>major</i> mana i nizak rast	0 (0%)	1 (2,10%)	0,485 ^a
Prisustvo <i>minor</i> mana, odsustvo major mana i normalan longitudinalni rast	16 (31,4%)	4 (8,30%)	0,004^b
Prisustvo jedne major mane i normalan longitudinalni rast	7 (14%)	21 (43,80%)	0,001^b
Prisustvo jedne major mane i nizak rast	0 (0%)	1 (2,10%)	0,485 ^a
Prisustvo multiplih major mana i normalan longitudinalni rast	14 (27,5%)	9 (18,80%)	0,306 ^b
Prisustvo multiplih major mana i nizak rast	5 (9,8%)	4 (8,30%)	1,000 ^b

^aFišerov test tačne verovatnoće

^bPirsonov hi-kvadrat test



Slika 14. Korelacija između kombinacija kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“. Statistički značajna korelacija postoji između prisustva jedne *major* mane i normalnog longitudinalnog rasta i patološkog nalaza sekvenciranja „kliničkog egzoma“, dok je prisustvo *minor* mana i normalnog longitudinalnog rasta, bez *major* mana, u korelaciji sa normalnim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“.

5. DISKUSIJA

Subtelomerni regioni su veoma bogati genima, heterogeni i jedinstveni za svaki hromozom. U njima se nalazi veliki broj pseudogena i ponavljajućih sekvenci koje ih čine podložnim nealelskoj homolognoj rekombinaciji koja može dovesti do promena u broju kopija DNK sekvenci (Behjati and Tarpey, 2013). Kriptični rearanžmani subtelomera su u osnovi bolesti kod 5-20% pacijenata sa idiopatskim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama (Flint *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1999; Xu and Chen, 2003; Rooms *et al.*, 2004). MLPA metoda se pokazala kao tačna i pouzdana u identifikaciji delecija, duplikacija i amplifikacija koje se nalaze u osnovi mnogih bolesti, uključujući i one koje su uzrokovane subtelomernim rearanžmanima (Palomares *et al.*, 2006). Bez obzira na nižu stopu detekcije u odnosu na analizu molekularnog kariotipa, zahvaljujući dostupnosti, ceni, i brzini izvođenja analize, MLPA metoda se danas koristi u mnogim laboratorijama za testiranje pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama.

U našoj studiji, subtelomerni rearanžmani su identifikovani kod 13 od 110 pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama. Sa ciljem detaljnije karakterizacije varijanti urađena je analiza molekularnog kariotipa koja je pokazala da su kod dva pacijenta u pitanju varijante nepoznate značajnosti (pacijenti br. 13 i 33). Analiza molekularnog kariotipa nije urađena kod pacijenta br. 17, međutim, klinička slika ovog pacijenta je vrlo jasno upućivala na deleciju 1p36.6, što je MLPA analizom i potvrđeno. Analiza molekularnog kariotipa nije rađena ni kod pacijenta br. 62 kod koga je identifikovana delecija 15q11.2 regiona. Ova delecija odgovara Prader-Vilijevom sindromu, te je za potvrdu navedene varijante upotrebljen MLPA kit za mikrodelecione sindrome (SALSA MLPA P245). Dakle, MLPA analiza subtelomernih regiona je u našoj studiji omogućila postavljanje dijagnoze kod 11 (10%, 11/110) pacijenata.

Većina dosadašnjih studija je pokazala da se stopa detekcije primenom MLPA analize subtelomernih regiona kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama kreće oko 5% (Wu *et al.*, 2010; Behjati and Tarpey, 2013; Mundhofir *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2014; Damjanovic *et al.*, 2015). U pojedinim studijama, postignute su

i stope detekcije od 7,3% (Pohovski *et al.*, 2013), 8,9% (Santa María *et al.*, 2016) i 10% (Palomares *et al.*, 2006). Najveći uticaj na stopu detekcije svakako imaju kriterijumi za odбир pacijenata za analizu. Jedan od njih se ogleda u težini bolesti pacijenata koji su uključeni u istraživanje. Pokazano je da su subtelomerni rearanžmani značajno češći kod pacijenata sa srednje teškim i teškim intelektualnim zaostajanjem u odnosu na one sa blažom formom bolesti (Knight *et al.*, 1999; Vissers *et al.*, 2016). Činjenica da su u našu studiju uključeni pacijenti sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama najverovatnije doprinosi iznadprosečnoj stopi detekcije.

Sa druge strane, bitan kriterijum za odбир pacijenata predstavlja rezolucija citogenetičke analize kariotipa, koja je u svim pomenutim istraživanjima, kao i u našem, izvedena pre MLPA analize subtelomernih regiona. U većini publikacija se navodi da je analiza kariotipa urađena na rezoluciji od 550 traka. U našem istraživanju, ova rezolucija je bila niža. Naime, kada se pogledaju rezultati molekularnog kariotipa za pacijente br. 2, 11, 12, 29, 44, 48, 77, 80 i 88 u Tabeli 5, uočava se da su za čak četiri pacijenta (pacijenti br. 12, 29, 48 i 77) identifikovane promene veće od 10Mb, koja predstavlja gornju granicu vidljivosti hromozomskih rearanžamana na svetlosnom mikroskopu. Ukoliko bi se broj dijagnostikovanih pacijenata umanjio za navedena četiri, stopa detekcije u našoj studiji bi iznosila 6,4% (7/110).

Analiza subtelomernih regiona je pre našeg istraživanja urađena u Srbiji kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama, sa ili bez urođenih anomalija, i dobijena je stopa detekcije od 5% (Damjanovic *et al.*, 2015). Za razliku od našeg istraživanja, uključeni su bili i pacijenti sa blagim intelektualnim poteškoćama.

Iako je MLPA analiza vrlo uspešna u detekciji subtelomernih rearanžmana kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, klinički značaj svake identifikovane varijante treba pažljivo interpretirati, naročito u onim situacijama gde klinička slika pacijenta ne odgovara prethodno opisanim slučajevima u literaturi. Primer za to je pacijent br. 13 kod koga je identifikovana delecija regiona 4p16.3 SALSA MLPA P036 kitom, a zatim i potvrđena kitom SALSA MLPA P070. Osim kliničke slike koja nije odgovarala Volf-Hirshornovom sindromu, dodatnu sumnju u patogenost identifikovane varijante je podstakla i potvrda prisustva delecije kod majke pacijenta.

Analizom molekularnog kariotipa je zatim pokazano da je u pitanju varijanta nepoznate značajnosti u oviru koje se nalazi *PIGG* gen. Ovaj gen je asociran sa autozomno-recesivnom formom mentalne retardacije (OMIM 616918) u čiji klinički spektar bi se mogao uklopiti fenotip pacijenta, te je u toku sekvenciranje celog genoma u potrazi za drugom *PIGG* varijantom koja bi kroz udruženu heterozigotnost mogla dovesti do bolesti.

Za većinu subtelomernih rearanžmana specifični fenotip još nije detaljno definisan, što otežava postavljanje dijagnoze i odabir pacijenata za testiranje (Wu *et al.*, 2010). Mikorduplikacije ovih hromozomskih regiona je naročito teško klinički prepoznati jer često imaju suptilne fenotipove (Stankiewicz *et al.*, 2010). Međutim, neke kliničke karakteristike se češće viđaju kod pacijenata sa subtelomernim abnormalnostima. Listu od pet takvih karakteristika napravio je de Vries sa saradnicima i ona se može koristiti za preselekciju pacijenata za testiranje na rearanžmane subtelomernih regiona. Te karakteristike uključuju: pozitivnu porodičnu istoriju, prenatalno zaostajanje u rastu, postnatalne abnormalnosti rasta, najmanje dve facijalne dismorfičke karakteristike i najmanje jednu nefacijalnu dismorfičku karakteristiku i/ili urođenu anomaliju (De Vries *et al.*, 2001). Od 11 pacijenata sa identifikovanom patogenom delecijom i/ili duplikacijom u našoj studiji, nijedan nije imao pozitivnu porodičnu istoriju, tri (27,3%, 3/11) pacijenta su imala prenatalno zaostajanje u rastu, šest (54,4%, 6/11) pacijenata je imalo postnatalno zaostajanje u rastu, deset pacijenata (91%, 10/11) je imalo facijalnu dismorfiju i devet (82%, 9/11) pacijenata je imalo najmanje jednu nefacijalnu dismorfičku karakteristiku i/ili urođenu anomaliju.

MLPA analizom subtelomernih regiona u našoj studiji je identifikovana patogena promena kod 11 od ukupno 110 testiranih pacijenata (10%). Kod šest (54,5%, 6/11) pacijenata je ustanovljeno prisustvo delecije, kod dva (18,2%, 2/11) pacijenta prisustvo duplikacije, dok je kod tri (27,3%, 3/11) pacijenta identifikovano prisustvo delecije i duplikacije. Delecije su identifikovane u šest subtelomernih regiona 1p, 1q, 7q, 9q, 13q, 15q, dok su duplikacije identifikovane u pet subtelomernih regiona 3p, 11q, 17p, 18q, 19p. Literaturni podaci ukazuju da su najčešće subtelomerne delecije 1p, 4p i 9p (De Vries *et al.*, 2003). Iako su u našoj studiji identifikovane delecije u sva tri navedena regiona, analizom molekularnog kariotipa je pokazano da su delecije u regionima 4p i 9p nepoznate značajnosti (pacijenti br. 13 i 33), i da se na osnovu njih ne može objasniti klinička slika

pacijenta. Duplikacije subtelomernih regiona se ne viđaju često kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama i urođenim anomalijama kako je pokazala studija Ruitera i saradnika, u kojoj je njihova učestalost bila 0,5% (Ruiter *et al.*, 2007). Učestalost subtelomernih duplikacija u našoj studiji je 1,8% (2/110). Smatramo da ovakav rezultat može biti posledica malog broja ispitanika, koji je šest puta manji u odnosu na pomenutu studiju.

Delecija 1p36.33 regiona je identifikovana kod tri pacijenta (pacijenti br. 17, 80 i 88). Delecija 1p36.33 predstavlja najčešću terminalnu hromozomsku deleciju kod ljudi, sa učestalošću od 1 na 5000 novorođenčadi (Shaffer and Lupski, 2000; Heilstedt *et al.*, 2003). Zahvaljujući velikom broju opisanih slučajeva u literaturi, klinička slika pacijenata sa 1p36 mikrodelecionim sindromom (OMIM:607872) je dobro definisana a uključuje: zaostajanje u razvoju, intelektualne poteškoće, konvulzivne i epileptičke napade, probleme sa vidom, gubitak sluha, nizak rast, mikrocefaliju, anomalije mozga, rascep nepca, urođene srčane mane, kardiomiopatiju, renalne anomalije i karakterističnu facijalnu dismorfiju: zaravnjen facijes, duboko usađene oči sa ravnim obrvama, udubljen središnji deo lica, širok, kratak i ravan nos, dugačak filtrum, epikantuse, špicastu bradu, nadole orjentisane uglove usana, nisko postavljene i loše oblikovane ušne školjke (Battaglia *et al.*, 2008). Iako je definisanje fenotipskog obrasca učinilo ovaj sindrom klinički prepoznatljivim, postoji izražena fenotipska varijabilnost između pacijenata koja je posledica razlika u lokaciji i veličini hromozomske delecije (Jordan *et al.*, 2015). Kod pacijenta br. 17 na sindrom mikrodelecije 1p36 je posumnjano na osnovu intrauterinog zaostajanja u rastu, srčane mane, a naročito zaravnjenog facijesa, kratkog nosa i nadole orjentisanih uglova usana. Na evaluaciji u uzrastu od dve godine, konstatovano je i karakteristično teško motoričko i intelektualno zaostajanje, kao i epilepsija, koja je čest pratilac ovog sindroma. U slučaju pacijenta br. 88, na prvoj evaluaciji kod kliničkog genetičara u uzrastu od četiri meseca, posumnjano je na neki od mikrodelecionih sindroma, na osnovu hipotonije, neobičnih spontanih pokreta, odsustva reakcije na zvuk i odsustva praćenja pogledom. Na osnovu rezultata MLPA analize subtelomernih regiona postavljena je dijagnoza 1p36 mikrodelecionog sindroma, kojim se objašnjavaju i kašnjenje u razvoju, epilepsija i kardiomiopatija koji su se kasnije manifestovali. Hipotonija, epilepsija, srčana mana, prenatalno zaostajanje u rastu kao i

facijalna dismorfija prisutni kod pacijenta br. 80 ukazali su na postojanje sindroma delecije 1p36 još u uzrastu od tri meseca, što je kasnije i potvrđeno MLPA analizom.

S obzirom na to da delecije i duplikacije identifikovane MLPA metodom mogu nastati kao posledica prisustva balansiranih hromozomskih rerarnžmana kod roditelja pacijenata, uvek se preporučuje FISH analiza kod pacijenta i/ili roditelja kako bi se pacijentima i njihovim porodicama obezbedilo adekvatno genetičko informisanje. U našoj studiji urađena je FISH analiza kod roditelja pet pacijenata (Tabela 3). FISH analiza je pokazala da su majka pacijenta br. 11 i otac pacijenta br. 12 nosioci balansiranih translokacija, što rezultuje povišenim rizikom za dobijanje aberantnog potomstva. Ovaj rizik nije isti za sve nosioce balansiranih rearanžmana, a zavisi pre svega od tačaka prekida na hromozomima kao i od toga koji konkretno hromozomi učestvuju u translokaciji. Pacijentima je objašnjena mogućnost prenatalne i preimplantacione dijagnostike, kojima se pravovremeno može odrediti postojanje hromozomskih abnormalnosti, i na taj način omogućiti rađanje zdravog deteta.

Velika studija, sprovedena 2010. godine, pokazala je da bi prvi korak u genetičkom testiranju pacijenata sa globalnim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, bolestima iz spektra autizma i kongenitalnim anomalijama trebalo da bude molekularni kariotip (Miller *et al.*, 2010). To je bila velika meta-analiza, koja je obuhvatila rezultate 33 istraživanja sprovedena do tada. Rezultati ove analize su pokazali da je dijagnostička moć molekularnog kariotipa od 15-20% značajno veća od dijagnostičke moći analize kariotipa koja iznosi oko 3% kada se isključi Daunov sindrom i druge fenotipski prepoznatljive hromozomopatije. Ovi rezultati su potvrđeni brojnim studijama koje su usledile, uključujući i neke nedavno sprovedene (Cheng *et al.*, 2019; Jang *et al.*, 2019). Tri godine nakon velike meta-analize Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku izdao je standarde i vodiče za konstitucionalnu analizu molekularnog kariotipa (prenatalnu i postnatalnu) (South *et al.*, 2013). Danas se molekularni kariotip radi u brojnim laboratorijama širom sveta. Iako su rađene studije na raznovrsnim populacijama pacijenata, stopa detekcije molekularnog kariotipa u određenim podgrupama pacijenata još uvek nije dobro definisana. Dodatne analize dijagnostičke moći ove metodologije kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, u odnosu na različite stepene težine

bolesti, kao i odsustvo ili prisustvo dodatnih fenotipskih manifestacija, omogućile bi definisanje kliničkih parametara kao indikatora prisustva patoloških promena u broju kopija.

U našoj studiji, kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, primenom analize molekularnog kariotipa je dobijena stopa detekcije od 26,4% (29/110). To je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da dijagnostička moć ove metode kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama varira od 13,2% (Shoukier *et al.*, 2013) do 30% (Cappuccio *et al.*, 2016). Razlike u stopi detekcije posledica su heterogenog fenotipa analiziranih kohorti pacijenata, uključujući tu i stepen intelektualnih poteškoća, prisustvo dodatnih patoloških stanja kao što su epilepsija, dismorfizmi, autizam i drugo, kao i upotrebu tehnika molekularnog kariotipa različitih rezolucija. Pojedine studije su ispitivale korelaciju dijagnostičke moći molekularnog kariotipa i stepena zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća. Studija Fan i saradnika je pokazala da stopa detekcije kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama pozitivno korelira sa težinom bolesti, i iznosi 19% za blago, 22% za srednje teško i 33% za teško zaostajanje u razvoju/intelektualne poteškoće, dok je ukupna stopa detekcije u njihovoj studiji je iznosila 28% (Fan *et al.*, 2018). U drugoj studiji je pokazano da je kod pacijenata sa blagim, srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama stopa detekcije 16% (D'Arrigo *et al.*, 2016). U ovoj studiji analiziran je i udeo patoloških rezultata u odnosu na varijante nepoznatog značaja i normalne nalaze, u podgrupama pacijenata formiranim na osnovu stepena intelektualnih poteškoća (blago, srednje, i teško zaostajanje). Pokazano je da su patološki nalazi skoro podjednako učestali u sve tri grupe: 30,77% kod pacijenata sa blagim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, 32,69% kod pacijenata sa srednje teškim, i 36,54% kod pacijenata sa teškom formom bolesti. Autori su zaključili da težina bolesti ne korelira sa verovatnoćom detekcije patološkog nalaza (D'Arrigo *et al.*, 2016). Isti zaključak su doneli i Šukier i saradnici, ističući značaj testiranja pacijenata sa blagim formama bolesti metodom molekularnog kariotipa (Shoukier *et al.*, 2013).

Primenom metode molekularnog kariotipa kod 19 od 29 pozitivnih pacijenata je postavljena dijagnoza dobro okarakterisanog mikrodelecionog ili mikroduplicacionog

sindroma, od čega su entiteti lizencefalija tip 1 (OMIM:607432), MECP2 duplikacioni sindrom (OMIM:300260), 19p13.13 duplikacioni sindrom (OMIM:613638), 16p11.2 delecioni sindrom (OMIM:611913) i 1p36 mikrodelecioni sindrom (OMIM:607872) dijagnostikovani kod dva pacijenta svaki. Neki češći mikrodelecioni sindromi kao što su sindrom mačjeg plača (OMIM: 123450), Volf-Hiršhornov sindrom (OMIM: 194190) i Smit-Magenisov sindrom (OMIM: 182290) su u našoj studiji identifikovani kod po jednog pacijenata (Tabela 5). Rekurentni sindromi u našem istraživanju se razlikuju od rekurentnih sindroma detektovanih u drugim studijama (Chong *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018). Pa tako, u studiji Chong i saradnika aberacije 22q11.2 regiona su identifikovane kod pet pacijenata (Chong *et al.*, 2014), dok u našoj studiji nije identifikovana nijedna. Sigurno je da je način odabira pacijenata na to uticao, s obzirom na to da je velika većina pacijenata uključenih u našu studiju bila upućena od strane neurologa, kao i činjenice da se na Univerzitetској dečјој klinici najveći broj pacijenata sa srčanim manama u prvom koraku testira na prisustvo delecije 22q11.2, ali i prisustvo delecija i/ili duplikacija drugih regiona asociranih sa kompleksnim srčanim manama, primenom MLPA analize koristeći kitove SALSA MLPA P250 i SALSA MLPA P311.

Kod pacijenta br. 48 sa teškim globalnim razvojnim zaostajanjem, hipotrofijom, mikrocefalijom, facijalnom dismorfijom, kašnjenjem u rastu, kontrakturama i epilepsijom je inicijalno rađena MLPA analiza subtelomernih regiona koja je pokazala prisustvo duplikacije regiona 17p13.3. Potom urađena analiza molekularnog kariotipa je pokazala da je u pitanju velika duplikacija od 22,1 Mb koja sadrži oko 500 gena, od čega 57 u OMIM bazi. S obzirom na veličinu identifikovane varijante, urađena je i analiza kariotipa kojom je utvrđeno da je otac nosilac recipročne translokacije između hromozoma 15 i 17. Porodici je pruženo genetičko informisanje, uključujući i mogućnosti prenatalne i preimplantacione dijagnostike. Manje duplikacije regiona 17p13.3 su ranije opisivane u literaturi u asocijaciji sa Potocki-Lupski sindromom (duplikacija 17p11.2) (OMIM:610883) i Šarko-Mari-Tutovim sindromom tip 1A (duplikacija *CMT1A*) (OMIM:118220). Kontraktуре, hipotrofija mišića nogu i deformiteti stopala koji se progresivno pogoršavaju i pored ortopedskih intervencija,

prisutni u okviru ove izrazito teške kliničke slike pacijenta, verovatno predstavljaju posledicu hereditarne motoričke i senzorne neuropatije Šarko-Mari-Tut tip 1.

Istovremeno prisustvo delecije i duplikacije je detektovano kod pet (17,3%, 5/29) pacijenata. Ukupna veličina aberacije (u apsolutnom zbiru) je kod pacijenata br. 11,12, 77 i 129 preko deset Mb, a kod pacijenta br. 103 8,7 Mb (Tabela 5). Kod pacijenata br. 12 i 77 identifikovane delecije i/ili duplikacije su veće od 10 Mb, dakle iznad gornje granice vidljivosti hromozomskih rearanžmana na svetlosnom mikroskopu. Svakom identifikovanom aberacijom je obuhvaćen veliki broj gena. U literaturi su opisani pacijenti sa sličnim varijantama koji su između ostalih simptoma imali i intelektualne poteškoće (Digilio *et al.*, 2009; Roberson *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011; Mattina *et al.*, 2012; Valetto *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Natera-de Benito *et al.*, 2014; Aguilera *et al.*, 2015). Delecija i duplikacija su identifikovane na različitim hromozomima kod svih pacijenata, osim kod pacijenta br. 129 kod koga su obe promene na q kraku hromozoma 10, što odgovara hromozomskoj reorganizaciji po tipu inverzije-duplikacije-delecije (inv dup del) (Rowe *et al.*, 2009; Zuffardi *et al.*, 2009). FISH analiza roditelja pacijenta je pokazala normalan nalaz. Kod pacijenta je urađeno i sekvenciranje „kliničkog egzoma“ kojim nisu detektovane druge potencijalno uzročne varijante. U literaturi su opisana tri pacijenta sa inv dup del 10q rearanžmanom, sa varijabilnom kliničkom slikom koja uključuje blefarofimozu, skeletne anomalije, hipotoniju, zaostajanje u razvoju, nizak rast, hipertelorizam, epikantuse, nisko postavljene i loše oblikovane uši, strabizam i kratak vrat (Sarri *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012; Al-Sarraj *et al.*, 2014). U DECIPHER bazi su opisana dva pacijenta sa kompleksnim rearanžmanom 10q regiona, sa strabizmom, zaostajanjem u rastu i bilateralnom atrezijom hoane (pacijent 326746) i sa niskim rastom, mikrocefalijom i intelektualnim poteškoćama (pacijent 255682). S obzirom na to da su aberacije slične onoj kod pacijenta br. 129 prethodno opisane u literaturi kod pacijenata sa varijabilnim fenotipskim karakteristikama, uključujući kraniofacijalni dismorfizam i razvojno zaostajanje, najverovatnije se fenotip pacijenta može pripisati identifikovanoj varijaciji u broju kopija.

U našoj studiji je identifikovano oko dva i po puta više patogenih delecija u odnosu na patogene duplikacije (17:7) što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (Battaglia

et al., 2013; Fan *et al.*, 2018; J. S. Lee *et al.*, 2018). Na veći udeo patogenih delecija u odnosu na duplikacije verovatno utiče interpretacija varijanti, s obzirom da su dokazi koji idu u prilog patogenosti delecija mnogo dostupniji u literaturi u odnosu na podatke o duplikacijama (Fan *et al.*, 2018). Biološki gledano, duplikacije uglavnom uzrokuju blaži fenotip zbog čega će takvi pacijenti ređe biti upućivani na testiranje (Battaglia *et al.*, 2013).

Identifikovali smo i neke veoma retke promene u broju kopija.

Kod pacijenta br. 25 sa razvojnim kašnjenjem i makrocefalijom je identifikovana intersticijalna delecija od 7 Mb u regionu 1p21.1→p13.3 koja obuhvata nekoliko OMIM patoloških gena asociranih sa recesivnim ili dominantnim bolestima uzrokovanim *missense* mutacijama. Ova delecija je takođe obuhvatila i *KCNA2* gen čiji je monoalelski gubitak funkcije asociran sa ranom infantilnom epileptičkom encefalopatijom 32 (OMIM:616366). U literaturi je opisano samo nekoliko pacijenata sa preklapajućim delecijama (Mircher *et al.*, 2003; Bisgaard *et al.*, 2007; van Kuilenburg *et al.*, 2009). Fenotip ovih pacijenata je veoma varijabilan, tako da jasna fenotipsko-genotipska korelacija ne postoji, mada su psihomotorno zaostajanje i epilepsija opisane kod većine. U DECIPHER bazi je opisana preklapajuća delecija od 10 Mb kod dečaka sa intelektualnim poteškoćama, hipotonijom, humeroradijalnom sinostozom i abnormalnostima čela (pacijent 256753), kao i dve manje preklapajuće delecije od 5 Mb, između ostalog asocirane i sa intelektualnim poteškoćama i dismorfijom (pacijenti 248303 i 251326). U ISCA i ECARUCA bazama nisu pronađeni pacijenti sa sličnim delecijama.

Kod pacijenta br. 9 sa zaostajanjem u motornom i kognitivnom razvoju, širokim palčevima, hiperehogenim bubrezima i facijalnom dismorfijom je identifikovana intersticijalna delecija od 12,3 Mb u regionu 6q14.1→q15. Dve manje preklapajuće delecije su opisane u literaturi, jedna kod pacijenta sa zaostajanjem u razvoju, poremećajima ponašanja, gojaznošću, hernijom, facijalnim dismorfizmima, sindaktilijom, oftalmološkim, ušnim i renalnim abnormalnostima (Wentzel *et al.*, 2010), a druga kod pacijenta sa razvojnim zaostajanjem i marfanoidnim habitusom (Lowry *et al.*, 2013). Opisan je još jedan pacijent sa preklapajućom delecijom od 5 Mb u regionu 6q14, međutim, pored ove delecije kod njega je identifikovana i duplikacija u regionu Xp22.3 nasleđena od majke sa kliničkim značajem koji nije do kraja definisan. Ovaj pacijent ima težak oblik autizma,

odsustvo govora i dismorfizme (Quintela *et al.*, 2015). Pretragom DECIPHER, ISCA, ClinVar i ECARUCA baza nisu identifikovani drugi pacijenti sa sličnim delecijama.

Kod pacijenta br. 186 sa intelektualnim poteškoćama, poligirijom i duboko usađenim očima je inicijalno posumnjano na bolest neuronalne migracije. Identifikovana je telomerna delecija 2p25.3 regiona koji obuhvata devet protein kodirajućih gena. Delecije ovog regiona predstavljaju veoma redak uzrok intelektualnih poteškoća, problema u ponašanju, gojaznosti i hiperfagije. Fenotip se najverovatnije može pripisati heterozigotnoj deleciji *SNTG2* i *MYTIL* gena (Doco-Fenzy *et al.*, 2014)

Na osnovu kliničke slike pacijenta br. 187 sa intelektualnim poteškoćama, zaostajanjem u razvoju, intrauterinim zaostajanjem u rastu, nerazvijenim govorom, hipotonijom, rascepom nepca, luksacijom patele, facijalnim dismorfizmom, hirzutizmom i trunkalnom gojaznošću, postavljena je sumnja na Kofin-Sirisov sindrom, međutim, detektovano je prisustvo delecije od 8,13 Mb u regionu 1q32.1→q32.3 koji sadrži 73 protein kodirajuća gena. Mikrodelecije ovog regiona su u literaturi asocirane sa raznovrsnim fenotipovima, uključujući globalno zaostajanje u razvoju i zaostajanje u rastu. Jedina fenotipska karakteristika koja je prisutna kod svih opisanih pacijenata je rascep nepca, verovatno kao posledica haploinsuficijencije *IRF6* gena (Salahshourifar *et al.*, 2011).

Identifikacija promena u broju kopija koje su retko opisane u literaturi i javno dostupnim bazama je vrlo značajna jer se na taj način dodatno potvrđuje njihova patogenost ali i stiče jasniji uvid u fenotipsko-genotipsku korelaciju. Kada se u literaturi publikuje dovoljan broj ovakvih preklapajućih varijanti sa detaljima kliničke slike, procesom takozvane obrnute fenotipizacije (engl., *reverse phenotypics*) se može doći do definisanja novih sindroma. Dakle, u tom slučaju, identifikacija sličnih genomskih aberacija prethodi definisanju tipične kliničke prezentacije (Vissers *et al.*, 2010).

Primena sekvenciranja “kliničkog egzoma” u našoj studiji je omogućila postavljanje dijagnoze kod 48 (43,6%, 48/110) pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama. Uspešnost identifikacije genskih varijanti kod pacijenata sa genetičkim bolestima metodologijom sekvenciranja nove generacije

demonstrirana je u brojnim studijama u poslednjih nekoliko godina (Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2015; Thevenon *et al.*, 2016; Vissers *et al.*, 2017).

Velika meta-analiza sprovedena 2018. godine na kohorti pacijenata sa heterogenim genetičkim bolestima je pokazala je da dijagnostička korisnost sekvenciranja celog egzoma od 36% i genoma od 41% značajno veća od dijagnostičke moći analize molekularnog kariotipa od 10% (Clark *et al.*, 2018). Ova meta-analiza je obuhvatila oko dvadeset hiljada ispitanika iz 37 prethodno publikovanih studija. Rezultati su pokazali i da je dijagnostička moć veća kod trio sekvenciranja u poređenju sa pojedinačnim sekvenciranjem, kao i u slučaju interpretacije podataka u bolnicama gde su dostupni svi detaljni medicinski podaci pacijenta i gde je omogućena bliska saradnja kliničara i interpretatora. Ipak, autori ističu da ovo istraživanje ima i nekoliko nedostataka. Pre svega, navedene rezultate treba pažljivo interpretirati s obzirom da su u meta-analizu bile uključene heterogene studije u pogledu odabira pacijenata za analizu. Takođe, autori nisu razmatrali relativnu isplativost sekvenciranja celog egzoma/genoma i molekularnog kariotipa, kako u smislu dijagnostičke odiseje tako i dugoročne korisnosti za zdravstveni sistem. U studiju nisu bili uključeni ni genski paneli koji se vrlo često koriste u praksi za specifične kliničke prezentacije.

Druga velika meta-analiza je urađena 2019. godine i obuhvatila je 30 studija sekvenciranja celog egzoma kod pacijenata sa neurorazvojnim bolestima. Dobijena je dijagnostička moć sekvenciranja celog egzoma od 36% koja je značajno veća od dijagnostičke moći metode molekularnog kariotipa koja iznosi 15-20% kod pacijenata sa neurorazvojnim bolestima (Srivastava *et al.*, 2019). Međutim, i ova meta-analiza ima svoja ograničenja. Kako autori navode istraživanje je u najvećoj meri bilo fokusirano na pacijente sa intelektualnim poteškoćama i/ili autizmom, pa su studije sa pacijentima koji imaju razvojno zaostajanje u najvećoj meri ostale propuštene. Takođe, kohorte u ispitivanim studijama su bile veoma heterogene. S obzirom na to da su u meta-analizu uključene i studije iz 2014. godine, ACMG klasifikacija varijanti nije rađena u svim studijama. Takođe, neke studije su bile zasnovane na trio a neke na pojedinačnom sekvenciranju. Kao i u istraživanju Clark i saradnika, ispitivana je isključivo dijagnostička moć bez osvrtnja na isplativost analize.

Bez obzira na pomenuta ograničenja, autori obe meta-analize smatraju da metodologija sekvenciranja nove generacije treba da bude prvi test izbora kod pacijenata sa genetičkim bolestima, uključujući tu i neurorazvojne bolesti (Clark *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2019). Ipak, zbog visoke cene, sekvenciranje celog egzoma/genoma je još uvek nedostupno za male genetičke centre sa ograničenim resursima, pa se kao alternativni pristup koristi metoda sekvenciranja "kliničkog egzoma". Osim prihvatljivije cene, ova metoda ima i niz drugih prednosti kao što je manje podataka za analizu i manja verovatnoća detekcije slučajnih nalaza u poređenju sa sekvenciranjem celog egzoma/genoma, kao i veća dijagnostička moć u poređenju sa genskim panelima. U literaturi je do sada publikovan mali broj studija sekvenciranja "kliničkog egzoma" kod pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama (Okazaki *et al.*, 2016; Chérot *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). Neophodna su dodatna istraživanja koja bi evaluirala korisnost sekvenciranja „kliničkog egzoma“ u specifičnim podgrupama pacijenata. U našoj studiji je po prvi put analizirana dijagnostička moć sekvenciranja „kliničkog egzoma“ kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama.

Dijagnostička moć sekvenciranja "kliničkog egzoma" od 43,6% (48/110) postignuta u našoj studiji je u okviru raspona iz prethodno publikovanih studija koji se kreće od 24,6% do 50% za metode sekvenciranja "kliničkog egzoma" i sekvenciranja celog egzoma (Yang *et al.*, 2014; Fitzgerald *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015; Kuperberg *et al.*, 2016; Okazaki *et al.*, 2016; Bowling *et al.*, 2017; Chérot *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). U istraživanju koje je uključilo 216 pacijenata sa neurorazvojnim bolestima postignuta je dijagnostička moć sekvenciranja "kliničkog egzoma" od 25,9% (Chérot *et al.*, 2018). Jang i saradnici su ispitivali stopu detekcije metode sekvenciranja "kliničkog egzoma" u grupi pacijenata sa zaostajanjem u razvoju, intelektualnim poteškoćama, kašnjenjem u progovaranju i autizmu, i pokazali da ona iznosi 24,6% (Yang *et al.*, 2014). Kohorta najbližnja ispitivanoj u našoj studiji uključila je pacijente sa blagim, srednje teškim i teškim intelektualnim poteškoćama. U istraživanju je učestvovalo ukupno 106 pacijenata a postignuta je dijagnostička moć sekvenciranja "kliničkog egzoma" od 34% (Gieldon *et al.*, 2018). DDD studija, veliki kolaborativni projekat na polju genetike razvojnih bolesti, pokazala je da je stopa detekcije sekvenciranja celog egzoma kod 1133

pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama 27% (Wright *et al.*, 2015). U grupi pacijenata sa heterogenim neurološkim bolestima je dobijena stopa detekcije od 40% (Córdoba *et al.*, 2018), dok je u studiji koja je uključila 57 pedijatrijskih pacijenata sa blagim do teškim razvojnim zaostajanjem i intelektualnim poteškoćama pokazano da dijagnostička moć sekvenciranja celog egzoma može ići i do 50% (Kuperberg *et al.*, 2016). Kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama i mikrocefalijom stopa detekcije je procenjena na 29% (Rump *et al.*, 2016). Isti procenat je postignut i u studiji pacijenata koji su na izmaku dijagnostičke odiseje, kod kojih je sekvenciranje celog egzoma urađeno nakon drugih genetičkih testova (Sawyer *et al.*, 2016). U studiji tri hiljade uzastopnih pacijenata sa heterogenim dijagnozama postignuta je stopa detekcije sekvenciranja celog egzoma od 28,8% (Retterer *et al.*, 2016). Približne stope detekcije od 33% su dobijene i kod pacijenata sa epilepsijom (Demos *et al.*, 2019). Na osnovu literaturnih podataka, možemo zaključiti da stopa detekcije dobijena u našem istraživanju ukazuje na to da se sekvenciranje “kliničkog egzoma” može uspešno koristiti kod pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, i da dijagnostička moć sekvenciranja “kliničkog egzoma” parira onoj kod sekvenciranja celog egzoma.

Dualna dijagnoza Knoblohovog sindroma tip 1 (OMIM:267750) i Vardenburgovog sindroma tip 2A (OMIM:193510) je u našoj studiji postavljena kod pacijenta br 204. Sa učestalošću od 2% (1/48) u skladu je sa prethodno publikovanim podacima (Trujillano *et al.*, 2017). U našoj studiji i studiji Trujilano i saradnika, uzimane su u obzir samo patogene i verovatno patogene varijante za postavljanje dualnih dijagnoza. U drugim studijama sa širim kriterijumima odabira varijanti, stope dualnih dijagnoza su iznosile i do 7% (Farwell *et al.*, 2015; Posey *et al.*, 2016).

U našoj studiji je demonstrirana i mogućnost detekcije mozaičnih mutacija metodom sekvenciranja “kliničkog egzoma”. *CREBBP* patogena varijanta je identifikovana u procentu od oko 18.5% kod pacijenta br. 148 sa Rubinštajn-Tajbijevevim sindromom (OMIM:180849). Zbog velike varijabilnosti u pokrivenosti egzoma, teško je proceniti ukupnu senzitivnost metode za detekciju mozaičnih varijanti. Ipak, važno je istaći da se sekvenciranje “kliničkog egzoma” zbog varijabilne pokrivenosti ne može

koristiti za isključenje prisustva mozaika, i da se u slabo pokrivenim regionima moraju koristiti metode direktnog sekvenciranja.

Do danas je publikovano preko sedamsto gena čije se alteracije nalaze u osnovi zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća (Vissers *et al.*, 2016). U ovom istraživanju, patogene i verovatno patogene varijante su identifikovane u 41 genu kod 48 ispitanika. Iako je većina gena identifikovana kod pojedinačnih pacijenata, uzročne varijante u *TSEN54* i *GRIN2B* genima su detektovane kod tri pacijenta, dok su uzročne varijante u *KCNQ1*, *SCNA1*, *CREBBP* i *KAT6B* genima identifikovane kod dva pacijenta. Postoji neznatno preklapanje između gena identifikovanih u ovoj studiji sa rekurentnim uzročnim genima koji su prethodno publikovani u literaturi kao uzročnici zaostajanja u ravoju (Fitzgerald *et al.*, 2015) i teškog intelektualnog zaostajanja (Rauch *et al.*, 2006), što dodatno potvrđuje veliku lokusnu heterogenost zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća.

Pre testiranja metodom sekvenciranja “kliničkog egzoma”, 19 (22,7%, 19/110) pacijenata je imalo postavljenu specifičnu kliničku dijagnozu. Kod preostalih pacijenata postavljena je sumnja na postojanje genetičke bolesti ili na određenu grupu genetičkih bolesti. Kod sedam (36,8%) od 19 pacijenata je postavljena specifična dijagnoza potvrđena (Retov sindrom (OMIM:300005) kod pacijenta br. 200, Draveov sindrom (OMIM:182389) kod pacijenta br. 160, Kornelija de Lange sindrom (OMIM:300590) kod pacijenta br. 212, Rubinštajn-Tajbijevev sindrom (OMIM:180849) kod pacijenta br. 148, Kofin-Lovrijevev sindrom (OMIM:303600) kod pacijenta br. 150, Žuberov sindrom 5 (OMIM:610188) kod pacijenta br. 170 i Opic-Kavegia (OMIM:305450) sindrom kod pacijenta br. 176.

Na osnovu rezultata sekvenciranja “kliničkog egzoma”, kod četiri (21%, 4/19) pacijenta je došlo do izmene dijagnoze. Kod pacijenta br. 136 sa suspektnim Šincel-Gedionovim sindromom, dijagnoza je promenjena u ranu infantilnu epileptičku encefalopatiju 7 (OMIM:613720) nakon identifikovanja uzročne varijante u *KCNQ2* genu. Kod pacijenta br. 2 sa suspektnim Kurarino sindromom je dijagnostikovana CTNNB1 – vezana mentalna retardacija, autozomno dominantna (OMIM:615075). Kod pacijenta br. 210 sa intelektualnim poteškoćama, sinofrisom, morfološkim abnormalnostima centralnog nervnog sistema, abnormalnim palčevima, spasticitetom i spinalnim disrafizmom je bilo posumnjano na blažu formu Kornelija de Lange sindroma. Nakon detekcije verovatno

patogene varijante sekvenciranjem “kliničkog egzoma” u *CREBBP* genu, dijagnoza je promjenjena u Rubinštajn-Tajbijeve sindrom (OMIM:180849). Na evaluaciji kod kliničkog genetičara nakon testiranja, na osnovu tipičnog izgleda lica tokom smejanja i prisustva nekoliko karakterističnih *minor* anomalija, ustanovljeno je da fenotip pacijenta zaista odgovara dijagnozi Rubinštajn-Tajbijeovog sindroma. Kod pacijenta br. 215 sa suspektnom Olbrajtovom hereditarnom osteodistrofijom, veoma redak SBIDDS (engl., *short stature, brachydactyly, intellectual developmental disability and seizures*) sindrom je dijagnostikovao zahvaljujući otkrivenoj varijanti u *PRMT7* genu.

Osam pacijenata (41,2%, 8/17) sa specifičnom kliničkom dijagnozom pre testiranja je imalo negativan nalaz sekvenciranja “kliničkog egzoma”. Većina pacijenata u našoj studiji (82,7%, 91/110) je imala ili nesindromsko zaostajanje u razvoju/intelektualne poteškoće, ili sindromsko zaostajanje u razvoju/intelektualne poteškoće sa fenotipom kome je bilo teško pridružiti specifičnu bolest pre sekvenciranja “kliničkog egzoma” zbog atipične kliničke prezentacije, prisustva preklapajućeg fenotipa, ili jednostavno zbog postojanja izrazito retkih sindroma kod nekih pacijenata. Jedan od njih je pacijent br. 144 sa neprepoznatim Nunanovim sindromom 7 (OMIM:613706) čija klinička prezentacija bolesti nije sasvim kompatibilna sa tipičnim fenotipom patogenih *BRAF* varijanti. Kod dva pacijenta postavljena je dijagnoza genitopatelnog sindroma (OMIM:606170) koji je uzrokovan alteracijama u *KAT6B* genu. Varijanta klase IV, identifikovana kod pacijenta br. 147 sa intelektualnim poteškoćama, slabo razvijenim govorom, blefarofimozom, abnormalnim oblikom lica, bulboznim nosom, vezikouretralnim refluksom, renalnom hipoplazijom, epikantusima i hipoplazijom maksile, nije prethodno publikovana kod pacijenata sa sličnim fenotipom. Drugi pacijent sa *KAT6B* varijantom, pacijent br. 181, je imao koštane abnormalnosti ali je bilo nemoguće postaviti preciznu dijagnozu s obzirom na to da su klinički znaci upućivali na nekoliko različitih dijagnoza. Jedini ispitanik kod koga je postavljena dualna dijagnoza je pacijent br. 204. Kod ove pacijentkinje su identifikovane uzročne varijante u *COL18A1* genu koji je asociiran sa Knoblohovim sindromom tip 1 (OMIM:267750) i *MITF* genu, koji je u asocijaciji sa Vardenburgovim sindromom tip 2A (OMIM:193510). Sa abnormalnostima centralnog nervnog sistema, klinička prezentacija se parcijalno preklapa sa Knoblohovim sindromom, ali klasični znaci kao što su miopija,

ablacija retine i okcipitalna encefalocela ipak nedostaju. Klinički znaci Vardenburgovog sindroma nisu bili prisutni kod pacijenta, međutim, njena rođena sestra je imala tipičnu kliničku sliku ovog sindroma sa potvrđenim prisustvom iste varijante u *MITF* genu, iz čega se može zaključiti da navedena varijanta ima redukovanu penetrantnost. Kod pacijentkinje br. 203 sa teškim intelektualnim zaostajanjem, leukodistrofijom, hipotonijom, hidronefrozom megauretera i neurodegenerativnom bolešću, identifikovana je nova varijanta u *HERC2* genu, koja dovodi do prekida u sintezi proteina (engl. *truncating*). Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na udruženost bialelnih patogenih varijanti u *HERC2* genu i mentalne retardacije, autozomno recesivne 38 (OIMM:615516) koju karakteriše globalno zaostajanje u razvoju sa zaostajanjem u motornom razvoju, hipotonija i intelektualne poteškoće. Sve do danas publikovane varijante u *HERC2* genu su bile *missense*, tako da je moguće da identifikovana varijanta u našoj studiji, koja dovodi do prekida sinteze proteina, ima za posledicu težu fenotipsku prezentaciju. U slučaju ovog pacijenta roditelji su potvrdili prisustvo konsagviniteta.

Navedeni primeri ukazuju da su u nedostatku jasnih kliničkih znakova koji bi uputili na konkretnu dijagnozu, za njeno postavljanje potrebne analize velikih delova genoma, kao što je analiza sekvenciranja “kliničkog egzoma”.

Dijagnostičko genetičko testiranje može imati veliki značaj za pacijenta, uključujući promene u terapiji i prevenciju komplikacija. Ako se izuzme uticaj koji postavljanje dijagnoze ima na reproduktivne planove, klinička korisnost sekvenciranja celog egzoma se kreće od 5% do 44% kod dece sa različitim genetičkim bolestima, uključujući tu i neurorazvojne bolesti (Clark *et al.*, 2018). U našoj studiji postavljanje molekularne dijagnoze je imalo direktan uticaj na izmene u lečenju kod osam pacijenata (16,7%, 8/48). Specifična antiepileptička terapija je sugerisana kod pacijenata br. 138 i 161. Za pacijenta br. 138 su takođe savetovani i redovni kardiološki pregledi zbog asocijacije identifikovane varijante u *ATPIA3* genu sa asistolijom. Plan prevencije komplikacija baziran na rezultatu testiranja sačinjen je i kod pacijenata br. 148 i 210 sa varijantama u *CREBBP* genu, koje se sa sobom nose povišen rizik od oftalmoloških komplikacija, apnee i gojaznosti, kao i kod pacijenta br. 169 sa detektovanom varijantom u *MKSI* genu koje mogu dovesti do promena na jetri. Za pacijenta br. 178 su indikovani godišnji abdominalni ultrazvučni pregledi i

endoskopija, s obzirom da su alteracije *CTTNB1* gena poznat uzrok kolorektalnog kancera, pilomatriksoma, kancera jajnika i meduloblastoma. Pacijentu br. 217, kome je dijagnostikovano sindrom deficijencije cerebralnog kreatina 1 (OMIM:300352), prepisana je terapija kreatin monohidrat argininom i glicinom, dok je pacijentu br. 198 prepisana specifična terapija za hipergastrinemiju koja se često javlja u sklopu mukolipidoze tip IV (OMIM:252650).

Kod ostalih pacijenata dati su saveti za praćenje, prevenciju i lečenje nezvezano od molekularno-genetičkog nalaza.

Dodatno, rezultati dobijeni sekvenciranjem “kliničkog egzoma” u ovoj studiji, omogućili su pet prenatalnih testiranja (pacijenti br. 143, 180, 189, 142 i 176).

Jedan od glavnih nedostataka panela “klinički egzom” bi bila nedovoljna pokrivenost određenih gena i egzona, ali i otežan pristup nekim tipovima genskih varijacija, kao što su ponavljajuće sekvence koje nije moguće detektovati metodama sekvenciranja nove generacije (Bowdin *et al.*, 2016). Ovo je ilustrovano na primeru našeg pacijenta br. 154 sa dijagnostikovanim X-vezanim Vestovim sindromom (OMIM:308350), neurološkom bolešću koja je kod muške dece često uzrokovana genskim alteracijama u *ARX* genu na X hromozomu (Strømme *et al.*, 2002). Sekvenciranje “kliničkog egzoma” je kod ovog pacijenta pokazalo normalan nalaz. Međutim, sekvenciranje po Sangeru, koje je urađeno potom, je pokazalo prisustvo jasno patogene c.429_452dup varijante u *ARX* genu, prethodno opisane u literaturi kod mnogih pacijenata sa intelektualnim poteškoćama i epilepsijom, uključujući Vestov sindrom (Kato, 2006). Iako je prosečna pokrivenost *ARX* gena u panelu “klinički egzom” odlična, egzon dva, u kome se nalazi indentifikovana varijanta, nije uopšte pokriven, i čak i značajno povećanje srednje pokrivenosti ne bi bilo dovoljno da se detektuje ova alteracija. Važno je naglasiti da ovaj propust nije ograničen samo na navedenog pacijenta, niti je posledica specifičnog kita koji je korišćen. Stoga, kliničari moraju imati na umu da za dobro definisane kliničke entitete, kod kojih je to dostupno, treba razmotriti bolje validirane testove kao što su manji, ciljani genski paneli.

U poređenju sa sekvenciranjem celog egzoma nedostatak sekvenciranja “kliničkog egzoma” se ogleda u činjenici da je “kliničkim egzomom” pokriven set onih gena koji su u asocijaciji sa humanim genetičkim bolestima u određenom trenutku vremena. Pa tako,

varijanta panela “klinički egzom” koja je korišćena u ovoj studiji, kreirana je 2013. godine, i obuhvata 4813 gena koji su asocirani ili verovatno asocirani sa monogenским bolestima. Danas je u ovaj panel uključeno nekoliko stotina novih gena koji su definisani kao uzročni za humana oboljenja sekvenciranjem celog egzoma i genoma. Iako je očekivano da alteracije u ovim novim genima predstavljaju uzrok bolesti kod malog broja pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, to ipak predstavlja ograničenje metode koje se mora uzeti obzir kod pacijenata sa negativnim nalazom sekvenciranja “kliničkog egzoma” u našoj studiji.

Prema trenutno važećim preporukama, prvi dijagnostički test kod pacijenata sa intelektualnim zaostajanjem, urođenim anomalijama, i bolestima iz spektra autizma je analiza molekularnog kariotipa (Miller *et al.*, 2010; South *et al.*, 2013). Međutim, rezultati nedavno sprovedenih istraživanja ukazuju da bi kod pacijenata sa genetičkim bolestima, uključujući tu i neurorazvojne bolesti, u prvom koraku trebalo uraditi sekvenciranje celog egzoma/genoma (Clark *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2019). Konkretni, opšteprihvaćeni, vodiči još uvek ne postoje. Određivanje kliničkih parametara kao prediktora određenih tipova uzročnih varijanti je od ključnog značaja za kliničku praksu jer bi omogućilo definisanje dijagnostičkog algoritma kojim bi se postigla optimalna primena tehnologija, smanjenje troškova i ubrzanje dijagnostičke procedure.

Rezultati naše studije pokazuju da je u grupi pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, prisustvo multiplih *major* mana i mikrocefalije u korelaciji sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa (patogena ili verovatno patogena varijanta). Iako je prisustvo jedne *major* mane češće kod pacijenata sa normalnim nalazom molekularnog kariotipa (normalan nalaz ili identifikovana benigna varijanta), nije dobijena statistička značajnost.

Prethodnih godina je bilo nekoliko pokušaja da se identifikuju kliničke karakteristike koje su u korelaciji sa patološkim (patogenim i verovatno patogenim) promenama u broju kopija kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama i/ili kongenitalnim anomalijama (Shoukier *et al.*, 2013; Caramaschi *et al.*, 2014; Preiksaitiene *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2014; Cappuccio *et al.*, 2016; D’Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Maini *et al.*, 2018). Korelacija multiplih malformacija sa patološkim

nalazom molekularnog kariotipa je pokazana u nekoliko studija (Shoukier *et al.*, 2013; Caramaschi *et al.*, 2014; Caballero Pérez *et al.*, 2017). U većini preostalih publikovanih studija, dizajn istraživanja je uglavnom podrazumevao analizu korelacije pojedinačnih malformacija sa patološkim rezultatima analize, te podatak o korelaciji multiplih malformacija nije mogao biti dobijen. Korelacija malformacija srca sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa je više puta potvrđena, i to ventrikularnog septalnog defekta (Roselló *et al.*, 2014; Maini *et al.*, 2018), atrijalnog septalnog defekta (Cappuccio *et al.*, 2016) i generalno kongenitalnih srčanih mana (Shoukier *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018). Druge fenotipske karakteristike koje su publikovane u više različitih studija su dismorfizmi (generalno, lica i šaka, ili samo lica) (Caramaschi *et al.*, 2014; Preiksaitiene *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2014; D'Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018), pozitivna porodična istorija (Cappuccio *et al.*, 2016; D'Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017), hipotonija (Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018), cerebelarne malformacije (Preiksaitiene *et al.*, 2014; Maini *et al.*, 2018) i mikrocefalija (Shoukier *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018). Uopšteno uzevši, rezultati do sada sprovedenih istraživanja su raznoliki, i korelacija nekih fenotipskih karakteristika sa patološkim nalazima molekularnog kariotipa je pokazana u pojedinačnim studijama, kao na primer za hidrocefalus (Preiksaitiene *et al.*, 2014), pojavu simptoma pre prve godine (Caramaschi *et al.*, 2014), genitalne anomalije (Roselló *et al.*, 2014), prematuritet (Maini *et al.*, 2018) i nizak rast (Shoukier *et al.*, 2013). U neke od pomenutih studija su pored pacijenata sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama bili uključeni i pacijenti koji imaju samo malformacije, mada su u svakoj od njih činili manji deo analizirane kohorte (Shoukier *et al.*, 2013; Caramaschi *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2014; Cappuccio *et al.*, 2016; Maini *et al.*, 2018). Različiti kriterijumi za odabir pacijenata kao i primena drugačijih tehnika molekularnog kariotipa verovatno doprinosi nekonzistentnosti rezultata navedenih istraživanja. Broj pacijenata koji su bili uključeni u ove studije varira od 80 (Caballero Pérez *et al.*, 2017) do 339 (Maini *et al.*, 2018), sa izuzetkom studije Fan i saradnika, koja je uključila 710 pacijenata (Fan *et al.*, 2018). Podaci u literaturi o korelaciji stepena zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa su oprečni (Cappuccio *et al.*, 2016;

D'Arrigo *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2018). Dok je studija Fan i saradnika pokazala da sa težinom kliničke slike raste dijagnostička moć metode (Fan *et al.*, 2018), druge studije su pokazale da teži oblici zaostajanja u razvoju/intelektualnih poteškoća nisu u statistički značajnoj korelaciji sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa (Cappuccio *et al.*, 2016; D'Arrigo *et al.*, 2016). Smatramo da bi studija sa velikim brojem ispitanika sa zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, ili velika meta-analiza već sprovedenih istraživanja, dala bolji uvid u korelaciju fenotipskih karakteristika sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa.

Rezultati naše studije pokazuju da je u grupi pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama prisustvo jedne *major* mane u korelaciji sa patološkim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ (patogena ili verovatno patogena varijanta). Odsustvo *minor* mana i specifična klinička dijagnoza pre testiranja su češći kod pacijenata sa patološkim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“, ipak, nije dobijena statistička značajnost.

Za razliku od brojnih podataka u literaturi o korelaciji kliničkih karakteristika sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa, podaci o korelaciji sa patološkim rezultatima metoda sekvenciranja nove generacije su veoma oskudni. Većina publikovanih radova je imala za cilj određivanje stope detekcije za specifične grupe pacijenata, kao što su oni sa epilepsijom, intelektualnim poteškoćama ili autizmom. Podgrupe na osnovu kliničkih karakteristika su vrlo retko formirane i analizirane. Gieldon i saradnici su poredili stope detekcije metode sekvenciranja “kliničkog egzoma” kod pacijenata sa blagim intelektualnim poteškoćama i onih sa težim formama bolesti i ustanovili da dijagnostička moć metode ne korelira sa težinom bolesti, čak šta više, veća stopa detekcije je utvrđena u grupi pacijenata sa blažom formom bolesti, mada nije bila statistički značajna (Gieldon *et al.*, 2018). Studija istih autora je pokazala i da je stopa detekcije uzročnih varijanti primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ veća kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama koji nemaju epilepsiju, u odnosu na one koji je imaju, što je neobično ako se uzme u obzir da literaturni podaci ukazuju vrlo visoke stope detekcije metoda sekvenciranja nove generacije kod pacijenata sa epilepsijom (Helbig *et al.*, 2016; Demos *et al.*, 2019). Autori studije smatraju da takav rezultat predstavlja artefakt nastao kao posledica malog

broja ispitanika u studiji (Gieldon *et al.*, 2018). Od ostalih ispitivanih fenotipskih karakteristika, veća stopa detekcije je pokazana kod pacijenata sa specifičnom kliničkom dijagnozom pre testiranja (Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). Pajusalu i saradnici smatraju da u prilog ovakavom rezultatu ide i činjenica da je značajno veća stopa detekcije primećena kod pacijenata kod kojih je analizirano deset i manje gena u odnosu na one kod kojih su analizirani veliki subpaneli (Pajusalu *et al.*, 2018). Međutim, ovi autori takođe ističu da je u njihovom istraživanju sekvenciranje “kliničkog egzoma” korišćeno i u slučaju veoma jasnih indikacija za testiranje samo jednog ili dva gena, kao recimo u slučaju tuberozne skleroze (Pajusalu *et al.*, 2018). U kohortu naših pacijenata su takođe bili uključeni pacijenti kod kojih je analiziran mali broj gena, kao što su oni sa kliničkom dijagnozom lizencefalije, rasopatija sindroma ili Retovog sindroma, što je vrlo verovatno doprinelo da specifična klinička dijagnoza bude češće zastupljena kod pacijenata sa patološkim nalazom sekvenciranja „kliničkog egzoma“. Treba međutim istaći da bi prema podacima iz literature trebalo očekivati da sa brojem analiziranih gena raste i stopa detekcije metoda sekvenciranja nove generacije imajući u vidu izrazitu genetičku heterogenost intelektualnih poteškoća, kao i veliki broj retkih uzročnih varijanti (Vissers *et al.*, 2016). Pokazano je i da veću verovatnoću detekcije metodom sekvenciranja “kliničkog egzoma” imaju pacijenti sa neurodegenerativnim bolestima (Chérot *et al.*, 2018), dok na značajno veću detekcionu moć egzomskog sekvenciranja kod pacijenata sa negativnom porodičnom anamnezom (38%) u odnosu na one sa pozitivnom porodičnom anamnezom (19,5%) ukazuje studija Bowling i saradnika (Bowling *et al.*, 2017).

U našoj studiji je utvrđena korelacija jedne *major* mane sa patološkim nalazom sekvenciranja “kliničkog egzoma” i korelacija multiplih *major* mana i mikrocefalije sa patološkim nalazom molekularnog kartiopa. Smatramo da je ovo u skladu sa literaturnim podacima s obzirom na to da su mutiple kongenitalne anomalije često asocirane sa promenama u broju kopija koje obično obuhvataju veliki broj gena pa se samim tim očekuju i promene na više organskih sistema (Rosenfeld and Patel, 2016; Maini *et al.*, 2018). Sa druge strane, izolovane srednje teške i teške nesindromske intelektualne poteškoće su u najvećem broju slučajeva uzrokovane *de novo* intragenskim alteracijama (Rauch *et al.*, 2012). Dismorfizmi su u našoj studiji češći kod pacijenata sa normalnim

nalazom kliničkog egzomskog sekvenciranja, ipak, nije dobijena statistička značajnost. Takođe, u našoj studiji, korelacija dismorfizama sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa nije ustanovljena. Iako nespecifični, i često prisutni čak i u opštoj populaciji, mnogobrojne studije ipak pokazuju da dismorfizmi jesu u korelaciji sa patološkim nalazom molekularnog kariotipa (Caramaschi *et al.*, 2014; Preiksaitiene *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2014; D'Arrigo *et al.*, 2016; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Maini *et al.*, 2018).

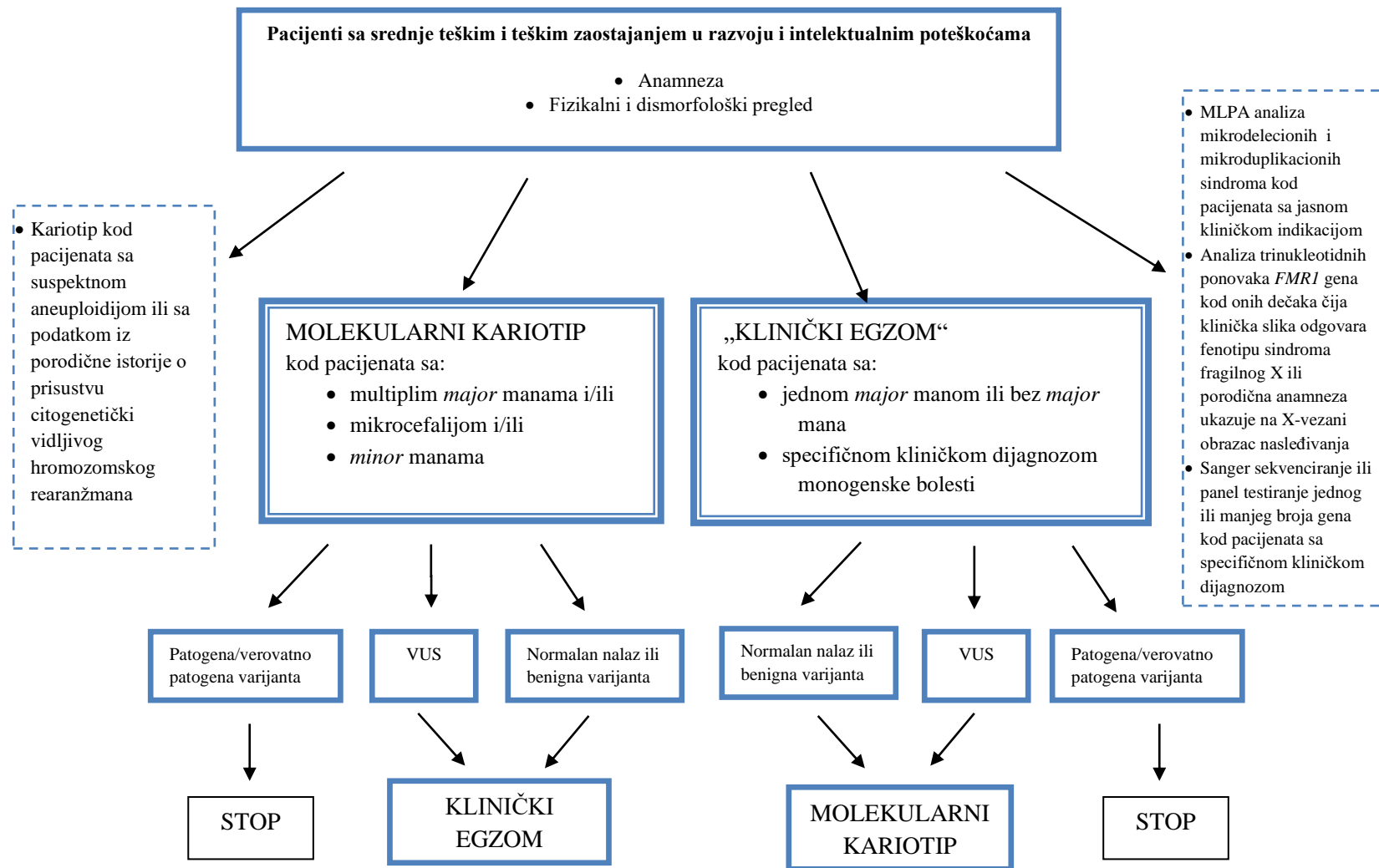
Pre prikaza algoritma dijagnostičkog genetičkog testiranja za pacijente sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, važno je da istači da trenutno postoji ograničen broj genetičkih testova koji se mogu uraditi u okviru zdravstvenog sistema Srbije, a uključuju analizu kariotipa, MLPA analizu, analizu molekularnog kariotipa (za manji broj pacijenata), i analize ograničenog broja pojedinačnih gena. Sve ostale genetičke testove je o trošku nacionalnih fondova moguće uraditi samo u inostranstvu, u slučaju da pacijenti ispunjavaju određene kriterijume koji su definisani od strane tih fondova. Za one pacijente sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama koji date kriterijume ne ispunjavaju, smatramo da bi MLPA analiza subtelomernih regiona bila odgovarajući izbor, s obzirom na visoku stopu detekcije od 10% u našoj studiji. U slučaju negativnog nalaza, naredni korak u dijagnostičkom putu kod ovih pacijenata bi trebalo da bude MLPA analiza mikrolecionih/mikroduplikacionih sindroma, s obzirom da je pokazano da se u kohortama pacijenata sa intelektualnim poteškoćama kombinovanjem kitova za subtelomerne regione (SALSA MLPA P036/SALSA MLPA P070) i mikrolecione/mikroduplikacione sindrome (SALSA MLPA P245) mogu postići veće stope detekcije u poređenju sa primenom pojedinačnih kitova (Pohovski *et al.*, 2013). Time bi se pored veće dijagnostičke moći omogućilo i ubrzanje dijagnostičke procedure. U slučaju identifikacije delecije i/ili duplikacije primenom MLPA analize, pre donošenja definitivnog zaključka o patogenosti identifikovane varijante, neophodno je rezultat potvrditi drugim dijagnostičkim testom zbog mogućnosti postojanja polimorfizma na mestu vezivanja proba i dobijanja lažno pozitivnog rezultata. Prema preporukama proizvođača u tu svrhu se može koristiti drugi MLPA kit ili neka druga analiza kao što je FISH ili

molekularni kariotip (<https://www.mrcholland.com/>). Kod pacijenata sa pozitivnim nalazom MLPA analize koji imaju netipičnu kliničku sliku bi u narednom koraku trebalo uraditi analizu molekularnog kariotipa sa ciljem identifikovanja veličine varijante i eventualnih dodatnih promena u broju kopija.

Za pacijente sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju/intelektualnim poteškoćama, na osnovu rezultata koji su dobijeni u ovoj studiji i njihovog poređenja sa podacima iz literature (Shoukier *et al.*, 2013; Caramaschi *et al.*, 2014; Caballero Pérez *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018), formirali smo algoritam genetičkog testiranja prikazan na Slici 14:

1. Nakon anamneze i detaljnog fizikalnog i dismorfološkog pregleda, klinički genetičar donosi odluku o genetičkom testu koji će biti primenjen sa ciljem identifikovanja uzročne varijante.
2. Kod pacijenata sa suspektom aneuploidijom ili sa podatkom iz porodične istorije o prisustvu citogenetički vidljivog hromozomskog rearanžmana prvi korak može biti analiza kariotipa.
3. Kod pacijenata sa jasnom kliničkom slikom mikrodelecionog ili mikroduplikacionog sindroma prvi korak može biti MLPA analiza mikrodelecionih/mikroduplikacionih sindroma.
4. Kod dečaka čija klinička slika odgovara fenotipu sindroma fragilnog X ili porodična anamneza ukazuje na X-vezani obrazac nasleđivanja prvi korak može biti analiza trinukleotidnih ponovaka *FMRI* gena.
5. Kod pacijenata sa specifičnom kliničkom dijagnozom u čijoj osnovi se nalazi jedan ili manji broj gena, za koje sekvenciranje „kliničkog egzoma“ nema dovoljnu senzitivnost (kao što je neurofibromatoza ili tuberozna skleroza), prvi korak u testiranju može biti Sanger sekvenciranje navedenih gena, dobro validirana ciljana NGS analiza datih gena ili validirani NGS panel (Bean *et al.*, 2019).
6. Kod pacijenata sa multiplim *major* manama i/ili mikrocefalijom i/ili dismorfizmima prvi test izbora može biti molekularni kariotip.

7. Kod pacijenata sa jednom ili nijednom *major* manom ili sa specifičnom dijagnozom monogenske bolesti pre testiranja, test prvog izbora može biti sekvenciranje „kliničkog egzoma“ ili drugi modaliteti sekvenciranja nove generacije kao što su sekvenciranje celog egzoma ili trio egzomsko sekvenciranje.
8. U slučaju identifikovanja patogene ili verovatno patogene varijante koja se na osnovu korelacije sa fenotipom može smatrati uzročnom, testiranje se prekida.
9. U slučaju identifikovanja varijante nepoznate značajnosti ili pristizanja normalnog nalaza molekularnog kariotipa, u narednom koraku treba razmotriti sekvenciranje „kliničkog egzoma“. U slučaju identifikovanja varijante nepoznate značajnosti ili pristizanja normalnog nalaza sekvenciranja „kliničkog egzoma“, treba razmotriti analizu molekularnog kariotipa.
10. Za sve pacijente koji ostanu bez identifikovane uzročne varijante, savetuje se periodična reevaluacija kliničkog genetičara i reevaluacija rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“ na jednu do tri godine (Srivastava *et al.*, 2019).



Slika 15. Algoritam za genetičko testiranje pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama.

Skracenicice: MLPA, srp., *višestruko umnožavanje proba zavisno od ligacije*; engl., *multiplex ligation probe dependent amplification*; VUS, srp., *varijanta nepoznatog značaja*; engl., *variant of uncertain significance*.

6. ZAKLJUČCI

1. U studiji su korišćene tri metode genetičkog testiranja: MLPA analiza, analiza molekularnog kariotipa i sekvenciranje „kliničkog egzoma“.
 - MLPA metodom je testirano 110 pacijenata. Patogena promena u broju kopija je identifikovana kod njih 11: delecija kod šest (54,5%, 6/11), duplikacija kod dva (18,2%, 2/11), delecija i duplikacija kod tri (27,3%, 3/11) pacijenta. Stopa detekcije MLPA metode u našoj studiji iznosi 10% (11/110).
 - Metodom molekularnog kariotipa je testirano 110 pacijenata. Patogena/verovatno patogena varijanta je identifikovana kod njih 29: delecija kod 17 (58,6%, 17/29), duplikacija kod sedam (24,1%, 7/29), dok je kod pet (17,3%, 5/29) pacijenata identifikovano prisustvo delecije i duplikacije. Stopa detekcije metode molekularnog kariotipa u našoj studiji iznosi 26,4% (29/110).
 - Metodom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ je testirano 110 pacijenata. Detektovano je 55 patogenih/verovatno patogenih varijanti kod 48 pacijenata, od toga 37 novih varijanti koje prethodno nisu opisane u literaturi. Od identifikovanih varijanti najzastupljenje su bile *missense* (41,8%, 23/55) i *nonsense* (23,6%, 13/55) varijante. *Frameshift*, *splice-site* varijante i *in-frame* delecije su identifikovane kod deset (18,2%, 10/55), šest (10,1%, 6/55) i tri (5,4%, 3/55) pacijenta. Stopa detekcije metode sekvenciranja „kliničkog egzoma“ u našoj studiji iznosi 43,6% (48/110).
2. Identifikovane su retke patogene promene u broju kopija u četiri hromozomska regiona: 1p21.1→p13.3, 6q14.1→q15, 2p25.3, 1q32.1→q32.3. U literaturi su opisane preklapajuće ali ne i istovetne varijante. Rezultati naše studije mogu poslužiti za bolje definisanje kliničke prezentacije ovih hromozomskih aberacija.

Također, identifikovane su patogene/verovatno patogene varijante u *BRAF*, *KAT6B*, *HERC2*, *COL18A1* i *MITF* genima, kod pacijenata čija klinička slika odstupa od tipične fenotipske prezentacije, što može upotpuniti naučna saznanja o ekspresiji otkrivenih uzročnih varijanti.

3. Ispitivanjem korelacije kliničkih parametara i rezultata molekularnog kariotipa utvrđeno je da je patološki nalaz molekularnog kariotipa u korelaciji sa prisustvom multiplih *major* mana i mikrocefalijom. Ispitivanjem korelacije kliničkih parametara i rezultata sekvenciranja „kliničkog egzoma“ utvrđeno je da je patološki nalaz sekvenciranja „kliničkog egzoma“ u korelaciji sa prisustvom jedne *major* mane.
4. Na osnovu dobijenih rezultata formiran je dijagnostički algoritam za genetičko testiranje pacijenata sa srednje teškim i teškim zaostajanjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama.

7. LITERATURA

- Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, Van De Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, et al. Postzygotic point mutations are an underrecognized source of de novo genomic variation. *Am J Hum Genet* 2015;97(1):67-74.
- Aguilera ZP, Belin PJ, Cavuoto KM, Jayakar P, McKeown CA. Acquired retinal pigmentary degeneration in a child with 13q deletion syndrome. *J AAPOS* 2015;19(5):482-4.
- Alfares A, Aloraini T, Subaie L Al, Alissa A, Qudsi A Al, Alahmad A, et al. Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing. *Genet Med* 2018;20(11):1328-33.
- Ali YF, El-Morshedy S, Elsayed RM, El-Sherbini AM, El-Sayed SAM, Abdelrahman NIA, et al. Metabolic screening and its impact in children with nonsyndromic intellectual disability. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2017;13:1065-70.
- Al-Sarraj Y, Al-Khair HA, Taha RZ, Khattab N, El Sayed ZH, Elhusein B, et al. Distal trisomy 10q syndrome, report of a patient with duplicated q24.31 – qter, autism spectrum disorder and unusual features. *Clin Case Rep* 2014;2(5):201-5.
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 2000;159(3):S173-8.
- Au PY, Argiropoulos B, Parboosingh JS, Micheil Innes A. Refinement of the critical region of 1q41q42 microdeletion syndrome identifies FBXO28 as a candidate causative gene for intellectual disability and seizures. *Am J Med Genet A* 2014;164A(2):441-8.
- Baertling F, Haack TB, Rodenburg RJ, Schaper J, Seibt A, Strom TM, et al. MRPS22 mutation causes fatal neonatal lactic acidosis with brain and heart abnormalities. *Neurogenetics* 2015;16(3):237-40.
- Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 2008;60(2):201-14.
- Battaglia A1, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003;117C(1):3-14.

- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, et al. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: A recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 2008;121(2):404–10.
- Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol* 2013;17(6):589–99.
- Bayani J, Squire J. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol* 2004; 23(1):22-4.
- Bean LJH, Funke B, Carlston CM, Gannon JL, Kantarci S, Krock BL, et al. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report—a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2019;22(3):453–61.
- Beard JL. Why Iron Deficiency Is Important in Infant Development. *J Nutr* 2008;138(12):2534-6.
- Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2013;98(6):236–8.
- Bellman M, Byrne O, Sege R. Developmental assessment of children. *BMJ*. 2013;346:e8687.
- Béna F, Bruno DL, Eriksson M, van Ravenswaaij-Arts C, Stark Z, Dijkhuizen T, et al. Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2013;162(4):388-403.
- Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet* 2013;132(4):359-83.
- Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, et al. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet* 2010;42(6):489-91.
- Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, et al. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* 2014;158(2):263-76.

- Berry-Kravis E, Hagerman R, Visootsak J, Budimirovic D, Kaufmann WE, Cherubini M, et al. Arbaclofen in fragile X syndrome: results of phase 3 trials. *J Neurodev Disord* 2017;9(1):3.
- Bessa C, Fátima L, Maciel P. Molecular genetics of intellectual disability. 2012:149-76.
- Bhutta ZA, Das JK, Bahl R, Lawn JE, Salam RA, Paul VK, et al. Can available interventions end preventable deaths in mothers, newborn babies, and stillbirths, and at what cost? *Lancet* 2014;384(9940):347-70.
- Bisgaard AM, Rasmussen LN, Møller HU, Kirchhoff M, Bryndorf T. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 1 (1p13.1p21.1) in a girl with mental retardation, short stature and colobomata. *Clin Dysmorphol* 2007;16(2):109–12.
- Bjornsson HT, Benjamin JS, Zhang L, Weissman J, Gerber EE, Chen YC, et al. Histone deacetylase inhibition rescues structural and functional brain deficits in a mouse model of Kabuki syndrome. *Sci Transl Med* 2014;6(256).
- Black MM, Walker SP, Fernald LC, Andersen CT, DiGirolamo AM, Lu C, et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. *Lancet* 2017;389(10064):77-90.
- Black MM, Aboud FE. Responsive Feeding Is Embedded in a Theoretical Framework of Responsive Parenting. *J Nutr* 2011;141(3):490–4.
- Boggula VR, Shukla A, Danda S, Hariharan S V, Nampoothiri S, Kumar R, et al. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: A study in 203 Indian patients. *Indian J Med Res* 2014;139(1):66.
- Börklü-Yücel E, Demiriz Ç, Avcı Ş, Vanlı-Yavuz EN, Eraslan S, Oflazer P, et al. Clinical exome sequencing in neuromuscular diseases: an experience from Turkey. *Neurol Sci* 2020; doi: 10.1007/s10072-020-04304-w.
- Bowdin S, Gilbert A, Bedoukian E, et al. Recommendations for the integration of genomics into clinical practice. *Genet Med* 2016;18(11):1075.
- Bowling KM, Thompson ML, Amaral MD, et al. Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome Med* 2017;9(1):43.

- Braat S, Kooy RF. The GABAA receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 2015;86(5):1119-30.
- Britto PR, Pérez-Escamilla R. No second chances? Early critical periods in human development. *Soc Sci Med.* 2013;97:238–40.
- Caballero Pérez V, López Pisón FJ, Miramar Gallart MD, González Álvarez A, García Jiménez MC, García Iñiguez JP, et al. Phenotype in patients with intellectual disability and pathological results in array CGH. *Neurologia* 2017;32(9):568–78.
- Cai X, Evrony GD, Lehmann HS, Elhosary PC, Mehta BK, Poduri A, et al. Single-cell, genome-wide sequencing identifies clonal somatic copy-number variation in the human brain. *Cell Rep* 2014;8(5):1280-9.
- Caku A, Seidah NG, Lortie A, Gagné N, Perron P, Dube J, et al. New insights of altered lipid profile in Fragile X Syndrome. *PloS One* 2017;12(3).
- Campbell IM, Yuan B, Robberecht C, Pfundt R, Szafranski P, McEntagart ME, et al. Parental somatic mosaicism is underrecognized and influences recurrence risk of genomic disorders. *Am J Hum Genet* 2014;7;95(2):173-82.
- Cancrini C, Puliafito P, Digilio MC, Soresina A, Martino S, Rondelli R, et al. Clinical features and follow-up in patients with 22q11. 2 deletion syndrome. *J Pediatr* 2014;164(6):1475-80.
- Cappuccio G, Vitiello F, Casertano A, Fontana P, Genesisio R, Bruzzese D, et al. New insights in the interpretation of array-CGH: Autism spectrum disorder and positive family history for intellectual disability predict the detection of pathogenic variants. *Ital J Pediatr* 2016;42(1):39.
- Caramaschi E, Stanghellini I, Magini P, Giuffrida MG, Scullin S, Giuva T, et al. Predictive diagnostic value for the clinical features accompanying intellectual disability in children with pathogenic copy number variations: A multivariate analysis. *Ital J Pediatr* 2014;40(1):39.
- Carey JC. Abbreviations and terminology surrounding autism spectrum disorders and intellectual disability. *Am J Med Genet A* 2011;155A(12):2905.

- Carulla LS, Reed GM, Vaez-Azizi LM, Cooper S-A, Leal RM, Bertelli M, et al. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for “mental retardation/intellectual disability” in ICD-11. *World Psychiatry* 2011;10(3):175–80.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;30;53(3):57.
- Chaudhry A, Noor A, Degagne B, Baker K, Bok LA, Brady AF, et al. Phenotypic spectrum associated with PTCHD1 deletions and truncating mutations includes intellectual disability and autism spectrum disorder. *Clin Genet* 2015;88(3):224-33.
- Cheng SSW, Chan KYK, Leung KKP, Au PKC, Tam WK, Li SKM, et al. Experience of chromosomal microarray applied in prenatal and postnatal settings in Hong Kong. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2019;181(2):196–207.
- Chérot E, Keren B, Dubourg C, Carré W, Fradin M, Lavillaureix A et al. Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: Experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clin Genet* 2018;93(3):567-76.
- Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F1000Res* 2016;5.
- Chong WWS, Lo IFM, Lam STS, Wang CC, Luk HM, Leung TY, et al. Performance of chromosomal microarray for patients with intellectual disabilities/developmental delay, autism, and multiple congenital anomalies in a Chinese cohort. *Mol Cytogenet* 2014;7(1).
- Choo YY, Agarwal P, How CH, Yeleswarapu SP. Developmental delay: Identification and management at primary care level. *Singapore Med J* 2019;60(3):119–23.
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* 2012;6(2):80-92.
- Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med* 2018;3.

- Contestabile A, Magara S, Cancedda L. The GABAergic hypothesis for cognitive disabilities in Down syndrome. *Front Cell Neurosci* 2017;11:54.
- Cooper DN, Chen JM, Ball EV, Howells K, Mort M, Phillips AD, et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat* 2010;31(6):631-55.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011;43(9):838–46.
- Córdoba M, Rodríguez-Quiroga SA, Vega PA, Salinas V, Perez-Maturo J, Amartino H, et al. Whole exome sequencing in neurogenetic odysseys: An effective, cost- and time-saving diagnostic approach. *PLoS One* 2018;13(2).
- Daelmans B, Black MM, Lombardi J, Lucas J, Richter L, Silver K, et al. Effective interventions and strategies for improving early child development. *BMJ* 2015;351:h4029.
- Damjanovic T, Cuturilo G, Maksimovic N, Dimitrijevic N, Mitic V, Jekic B, et al. Subtelomeric screening in Serbian children with dysmorphic features and unexplained developmental delay/intellectual disabilities. *Turk J Pediatr* 2015;57(2):154–60.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, et al. Mutations in *GDI1* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* 1998;19(2):134-9.
- D'Arrigo S, Gavazzi F, Alfei E, Zuffardi O, Montomoli C, Corso B, et al. The diagnostic yield of array comparative genomic hybridization is high regardless of severity of intellectual disability/developmental delay in children. *J Child Neurol* 2016;31(6):691–9.
- Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol* 2010;6(12):e1001025.
- Deacon RM, Glass L, Snape M, Hurley MJ, Altimiras FJ, Biekofsky RR, et al. NNZ-2566, a novel analog of (1–3) IGF-1, as a potential therapeutic agent for fragile X syndrome. *Neuromol Med* 2015;17(1):71-82.

- Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell* 2008;14(6):926-39.
- Dierssen M1, Ramakers GJ. Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes Brain Behav* 2006;5 Suppl 2:48-60.
- De Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability. *N Engl J Med* 2012;367(20):1921–9.
- Demos M, Guella I, DeGuzman C, McKenzie MB, Buerki SE, Evans DM, et al. Diagnostic Yield and Treatment Impact of Targeted Exome Sequencing in Early-Onset Epilepsy. *Front Neurol* 2019;10:434.
- De Pristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella K V., Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43(5):491.
- De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: A checklist. *J Med Genet* 2001;38(3):145–50.
- De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, Van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: A diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003;40(6):385-98.
- Di Donato N, Timms AE, Aldinger KA, Mirzaa GM, Bennett JT, Collins S, et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genet Med* 2018;20(11):1354-64.
- Dierking A, Schmidtke J. The future of Clinical Utility Gene Cards in the context of next-generation sequencing diagnostic panels. *Eur J Hum Genet* 2014;22(11):1247-.
- Digilio MC, Bernardini L, Capalbo A, Capolino R, Gagliardi MG, Marino B, et al. 16p subtelomeric duplication: A clinically recognizable syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009;17(9):1135–40.
- Doco-Fenzy M, Leroy C, Schneider A, , Petit F, Delrue MA, Andrieux J, et al. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. *Eur J Hum Genet* 2014;22(4):471.

- Dy AB, Tassone F, Eldeeb M, Salcedo-Arellano MJ, Tartaglia N, Hagerman R. Metformin as targeted treatment in fragile X syndrome. *Clin Genet* 2018;93(2):216-22.
- Edmond KM, Strobel NA, Adams C, McAullay D. Effect of early childhood development interventions implemented by primary care providers commencing in the neonatal period to improve cognitive outcomes in children aged 0-23 months: Protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2019;8(1):1–8.
- Eggermann T, de Nanclares GP, Maher ER, Temple IK, Tümer Z, Monk D, et al. Erratum to: Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics* 2016;8(1):27.
- Eldomery MK, Coban-Akdemir Z, Harel T, Rosenfeld JA, Gambin T, Stray-Pedersen A, et al. Lessons learned from additional research analyses of unsolved clinical exome cases. *Genome Med* 2017;9(1):26.
- Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 2012;5(3):160-79.
- Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics* 2015;8(1):S4.
- Fan Y, Wu Y, Wang L, Wang Y, Gong Z, Qiu W, et al. Chromosomal microarray analysis in developmental delay and intellectual disability with comorbid conditions. *BMC Med Genomics* 2018;11(1):49.
- Farwell KD, Shahmirzadi L, El-khechen D, Powis Z, Chao EC, Tippin Davis B, et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med* 2015;17(7):578-86.
- Fitzgerald TW, Gerety SS, Jones WD, Van Kogelenberg M, King DA, McRae J, et al. et al. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* 2015;519(7542):223-8.
- 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(2):132-40.

Fombonne E. Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry* 2002;7(2):S4-6.

Gantois I, Popic J, Khoutorsky A, Sonenberg N. Metformin for treatment of fragile X syndrome and other neurological disorders. *Annu Rev Med* 2019;70:167-81.

Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E, et al. Mutations in the Small GTPase Gene RAB39B Are Responsible for X-linked Mental Retardation Associated with Autism, Epilepsy, and Macrocephaly. *Am J Hum Genet* 2010;86(2):185-95.

Gieldon L, Mackenroth L, Kahlert AK, Lemke JR, Pormann J, Schallner J, et al. Diagnostic value of partial exome sequencing in developmental disorders. *PloS One* 2018;13(8):e0201041.

Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, Van De Vorst M, Van Bon BWM, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014;511(7509):344-7.

Gillentine MA, Schaaf CP. The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number. *Biochem Pharmacol* 2015;97(4):352-62.

Gogliotti RG, Niswender CM. A coordinated attack: Rett syndrome therapeutic development. *Trends Pharmacol Sci* 2019;40(4):233-6.

Guerrini R, Parrini E. Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis* 2010;38(2):154-66.

Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi JM, Daoud H, Nassif C, Patry L, et al. De Novo Mutations in Moderate or Severe Intellectual Disability. *PLoS Genet* 2014;10(10).

Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids res* 2005;33(suppl_1):D514-7.

Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet* 2003;64(4):310-6.

Helbig KL, Hagman KD, Shinde DN, Mroske C, Powis Z, Li S, et al. Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genet Med* 2016;18(9):898.

- Helsmoortel C, Vulto-van Silfhout AT, Coe BP, Vandeweyer G, Rooms L, Van Den Ende J, et al. A SWI/SNF-related autism syndrome caused by de novo mutations in ADNP. *Nat Genet* 2014;46(4):380.
- Hengst U, Jaffrey SR. Function and translational regulation of mRNA in developing axons. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18(2):209-15.
- Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(9):647-58.
- Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 2010;189(4):619-29.
- Hurley KM, Yousafzai AK, Lopez-Boo F. Early Child Development and Nutrition: A Review of the Benefits and Challenges of Implementing Integrated Interventions. *Adv Nutr* 2016;7(2):357–63.
- Jaeschke G, Kolczewski S, Spooren W, Vieira E, Bitter-Stoll N, Boissin P, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 negative allosteric modulators: discovery of 2-chloro-4-[1-(4-fluorophenyl)-2, 5-dimethyl-1 H-imidazol-4-ylethynyl] pyridine (basimglurant, RO4917523), a promising novel medicine for psychiatric diseases. *J Med Chem* 2015;58(3):1358-71.
- Jamuar SS, Lam AT, Kircher M, D’Gama AM, Wang J, Barry BJ, et al. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med* 2014;371(8):733-43.
- Jang W, Kim Y, Han E, Park J, Chae H, Kwon A, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-tier clinical diagnostic test in patients with developmental delay/intellectual disability, autism spectrum disorders, and multiple congenital anomalies: A prospective multicenter study in Korea. *Ann Lab Med* 2019;39(3):299–310.
- Jehee FS, Takamori JT, Vasconcelos Medeiros PF, Pordeus ACB, Latini FRM, Bertola DR, et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet* 2011;54(4):e425-32.
- Jensen M, Girirajan S. Mapping a shared genetic basis for neurodevelopmental disorders. *Genome Med* 2017;9(1):109.

Jeong J, Pitchik HO, Yousafzai AK. Stimulation interventions and parenting in low-and middle-income countries: a meta-analysis. *Pediatrics* 2018;141(4):e20173510.

Jordan VK, Zaveri HP, Scott DA. 1p36 deletion syndrome: An update. *Appl Clin Genet* 2015;8:189–200.

Kaindl AM, Passemard S, Kumar P, Kraemer N, Issa L, Zwirner A, et al. Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Prog Neurobiol* 2010;90(3):363-83.

Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017;19(2):249–55.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258(5083):818–21.

Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Bio* 2014;2:49.

Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *BioRxiv* 2019;1:531210.

Kato M. A new paradigm for West syndrome based on molecular and cell biology. *Epilepsy Res* 2006;70:87-95.

Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 2011;13(7):680-5.

Kendler KS. Advances in our understanding of genetic risk factors for autism spectrum disorders. *Am J Psychiatry* 2010;167(11):1291-3.

Kessi M, Xiong J, Wu L, Yang L, He F, Chen C, et al. Rare copy number variations and predictors in children with intellectual disability and epilepsy. *Front Neurol* 2018;9:947.

Kim YS, State MW. Recent challenges to the psychiatric diagnostic nosology: a focus on the genetics and genomics of neurodevelopmental disorders. *Int J Epidemiol* 2014;43(2):465-75.

- Kim YS, Leventhal BL. Genetic epidemiology and insights into interactive genetic and environmental effects in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 2015;77(1):66-74.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in Comparative Genomic Hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998;31(3):163-73.
- Klein CJ, Foroud TM. Neurology individualized medicine: when to use next-generation sequencing panels. In *Mayo Clinic Proceedings 2017* (Vol. 92, No. 2, pp. 292-305). Elsevier.
- Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999;354(9191):1676–81.
- Krupp DR, Barnard RA, Duffourd Y, Evans SA, Mulqueen RM, Bernier R, et al. Exonic mosaic mutations contribute risk for autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2017;101(3):369-90.
- Kundakovic M, Champagne FA. Early-life experience, epigenetics, and the developing brain. *Neuropsychopharmacology* 2015;40(1):141-53.
- Kuperberg M, Lev D, Blumkin L, Zerem A, Ginsberg M, Linder I, et al. Utility of whole exome sequencing for genetic diagnosis of previously undiagnosed pediatric neurology patients. *J Child Neurol* 2016;31(14):1534-9.
- LaDuca H, Farwell KD, Vuong H, Lu H-M, Mu W, Shahmirzadi L, et al. Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels. *PLoS One* 2017;12(2).
- Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2014;42(D1):D980-5.
- Lassi ZS, Haider BA, Bhutta ZA. Community-based intervention packages for reducing maternal and neonatal morbidity and mortality and improving neonatal outcomes. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2010.

- Lassi ZS, Middleton PF, Crowther C, Bhutta ZA. Interventions to Improve Neonatal Health and Later Survival: An Overview of Systematic Reviews. *EBioMedicine*. 2015;2(8):985–1000.
- Lechuga L, Franz DN. Everolimus as adjunctive therapy for tuberous sclerosis complex-associated partial-onset seizures. *Exp Rev Neurotherap* 2019;19(10), 913–925.
- Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 2014;312(18):1880-7.
- Lee JS, Hwang H, Kim SY, Kim KJ, Choi JS, Woo MJ, et al. Chromosomal microarray with clinical diagnostic utility in children with developmental delay or intellectual disability. *Ann Lab Med* 2018;38(5):473–80.
- Lee AW, Ventola P, Budimirovic D, Berry-Kravis E, Visootsak J. Clinical development of targeted fragile X syndrome treatments: an industry perspective. *Brain sci* 2018;8(12):214.
- Legg S, Hutter M. Universal intelligence: A definition of machine intelligence. *Minds and machines*. 2007;17(4):391-444.
- Levenga J, Hayashi S, de Vrij FM, Koekkoek SK, van der Linde HC, Nieuwenhuizen I, et al. AFQ056, a new mGluR5 antagonist for treatment of fragile X syndrome. *Neurobiol Dis* 2011;42(3):311-7.
- Levy B, Burnside RD. Are all chromosome microarrays the same? What clinicians need to know. *Prenat Diagn* 2019;39(3):157-64.
- Li Z, Liu J, Li H, Peng Y, Lv W, Long Z, et al. Phenotypic expansion of the interstitial 16p13.3 duplication: a case report and review of the literature. *Gene* 2013;531(2):502-5.
- Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. In: *Seminars in hematology* 2000 (Vol. 37, No. 4, pp. 348-357). WB Saunders.
- Ligsay A, Van Dijck A, Nguyen DV, Lozano R, Chen Y, Bickel ES, et al. A randomized double-blind, placebo-controlled trial of ganaxolone in children and adolescents with fragile X syndrome. *J Neurodev Disord* 2017;9(1):26.

- Lim ET, Uddin M, De Rubeis S, Chan Y, Kamumbu AS, Zhang X, et al. Rates, distribution and implications of postzygotic mosaic mutations in autism spectrum disorder. *Nat Neurosci* 2017;20(9):1217.
- Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med* 2018; 20(4):435-443.
- Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Hum Mutat* 2013;34(9): e2393-402.
- Liu Z, Smith CB. Lithium: a promising treatment for fragile X syndrome. *ACS Chem Neurosci* 2014;5(6):477-83.
- Lowry RB, Chernos JE, Connelly MS, Wyse JPH. Interstitial deletions at 6q14.1q15 associated with developmental delay and a marfanoid phenotype. *Mol Syndromol* 2013;4(6):280–4.
- Lowther C, Costain G, Stavropoulos DJ, Melvin R, Silversides CK, Andrade DM, et al. Delineating the 15q13.3 microdeletion phenotype: A case series and comprehensive review of the literature. *Genet Med* 2015;17(2):149-57.
- Lucas JE, Richter LM, Daelmans B. Care for Child Development: an intervention in support of responsive caregiving and early child development. *Child Care Health Dev* 2018;44(1):41–9.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 2015;161(5):1012-25.
- Maini I, Ivanovski I, Djuric O, Caraffi SG, Errichiello E, Marinelli M, et al. Prematurity, ventricular septal defect and dysmorphisms are independent predictors of pathogenic copy number variants: A retrospective study on array-CGH results and phenotypical features of 293 children with neurodevelopmental disorders and/or multiple congenital anomalies. *Ital J Pediatr* 2018;44(1):34.
- Martin CL, Kirkpatrick BE, Ledbetter DH. Copy number variants, aneuploidies, and human disease. *Clin Perinatol* 2015;42(2):227-42.

- Mattina T, Palumbo O, Stallone R, Pulvirenti RM, Di Dio L, Pavone P, et al. Interstitial 16p13.3 microduplication: Case report and critical review of genotype-phenotype correlation. *Eur J Med Genet* 2012;55(12):747–52.
- Maussion G, Cruceanu C, Rosenfeld JA, Bell SC, Jollant F, Szatkiewicz J, et al. Implication of LRRC4C and DPP6 in neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet Part A* 2017;173(2):395-406.
- Maver A, Lovrecic L, Volk M, Rudolf G, Writzl K, Blatnik A, et al. Phenotype-driven gene target definition in clinical genome-wide sequencing data interpretation. *Genet Med* 2016;18(11):1102-10.
- McClung CA, Nestler EJ. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(1):3-17.
- McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, et al. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* 2013;342(6158):632-7.
- McDonald Culp A. The transactional model of development: How children and contexts shape each other. Edited by Arnold Sameroff. American Psychological Association, Washington, DC, 2009, 290 pp. *Infant Mental Health Journal: Official Publication of The World Association for Infant Mental Health*. 2010;31(1):115-7.
- Medina A, Piñeros L, Arteaga C, Velasco H, Izquierdo A, Giraldo A, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to subtelomeric rearrangements in idiopathic intellectual disability in Colombia. *Pediatr Neurol* 2014;50(3):250–4.
- Meng L, Pammi M, Saronwala A, Magoulas P, Ghazi AR, Vetrini F, et al. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr* 2017;171(12):e173438.
- Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, et al. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat* 2015;36(6):573-80.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86(5):749-64.

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- Mircher C, Rethore M-O, Lespinasse J, Fert-Ferrer S, Lundsteen C, Kirchoff M. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 1: Attempt to establish a clinical phenotype (46,XX,del (1)(p22p32)). *Am J Med Genet* 2003;118A(2):176–9.
- Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, et al. KMD6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat* 2013;34(1):108-10.
- Moeschler JB, Shevell M, Saul RA, Chen E, Freedenberg DL, Hamid R, et al. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* 2014;134(3):903-18.
- Moreno-De-Luca A, Evans DW, Boomer KB, Hanson E, Bernier R, Goin-Kochel RP, et al. The role of parental cognitive, behavioral, and motor profiles in clinical variability in individuals with chromosome 16p11.2 deletions. *JAMA Psychiatry* 2015;72(2):119-26.
- Moreno-De-Luca D, Mulle JG, Kaminsky EB, Sanders SJ, Myers SM, Adam MP, et al. Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2010;87(5):618-30.
- Morris-Rosendahl DJ, Segel R, Born AP, Conrad C, Loeys B, Brooks SS, et al. New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet* 2010;18(10):1100-6.
- Mundhofir FEP, Nillesen WM, Van Bon BWM, Smeets D, Pfundt R, van de Ven-Schobers G, et al. Subtelomeric chromosomal rearrangements in a large cohort of unexplained intellectually disabled individuals in Indonesia: A clinical and molecular study. *Indian J Hum Genet* 2013;19(2):171–8.
- Musante L, Ropers HH. Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends Genet* 2014;30(1):32-9.
- Na ES, Morris MJ, Nelson ED, Monteggia LM. GABA A receptor antagonism ameliorates behavioral and synaptic impairments associated with MeCP2 overexpression. *Neuropsychopharmacology* 2014;39(8):1946-54.

- Natera-de Benito D, García-Pérez MA, Martínez-Granero MÁ, Izquierdo-López L. A patient with a duplication of chromosome 3p (p24.1p26.2): A comparison with other partial 3p trisomies. *Am J Med Genet Part A* 2014;164(2):548–50.
- Nellist M, Van Den Heuvel D, Schluep D, Exalto C, Goedbloed M, Maat-Kievit A, et al. Missense mutations to the TSC1 gene cause tuberous sclerosis complex. *Eur J Hum Genet* 2009;17(3):319-28.
- Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, et al. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol* 2014;37(1):210-9.
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010;42(9):790.
- Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, et al. WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat Genet* 2010;42(11):1010-4.
- Nissenkorn A, Kidon M, Ben-Zeev B. A potential life-threatening reaction to Glatiramer acetate in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 2017;68:40-3.
- Noll AC, Miller NA, Smith LD, Yoo B, Fiedler S, Cooley LD, et al. Clinical detection of deletion structural variants in whole-genome sequences. *NPJ genomic Med* 2016;1:16026.
- Novo-Filho GM, Montenegro MM, Zanardo ÉA, Dutra RL, Dias AT, Piazzon FB, et al. Subtelomeric Copy Number Variations: The Importance of 4p/4q Deletions in Patients with Congenital Anomalies and Developmental Disability. *Cytogenet Genome Res* 2016;149(4):241–6.
- Novy J, McWilliams E, Sisodiya SM. Asystole in alternating hemiplegia with de novo ATP1A3 mutation. *Eur J Hum Genet* 2014;57(1):37-9.
- Nowakowska BA, De Leeuw N, Ruivenkamp CAL, Sikkema-Raddatz B, Crolla JA, Thoelen R, et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet* 2012;20(2):166–70.

- O'Leary C, Leonard H, Bourke J, D'Antoine H, Bartu A, Bower C. Intellectual disability: Population-based estimates of the proportion attributable to maternal alcohol use disorder during pregnancy. *Dev Med Child Neurol* 2013;55(3):271-7.
- O'Leary HM, Kaufmann WE, Barnes KV, Rakesh K, Kapur K, Tarquinio DC, et al. Placebo-controlled crossover assessment of mecasermin for the treatment of Rett syndrome. *Ann Clin Transl Neurol* 2018;5(3):323-32.
- Olds DL, Henderson CR Jr, Tatelbaum R. Prevention of intellectual impairment in children of women who smoke cigarettes during pregnancy. *Pediatrics* 1994;93(2):228-33.
- Okazaki T, Murata M, Kai M, Adachi K, Nakagawa N, Kasagi N, et al. Clinical diagnosis of Mendelian disorders using a comprehensive gene-targeted panel test for next generation sequencing. *Yonago Acta Med* 2016;59:118-25.
- Päkkilä F, Männistö T, Hartikainen AL, Ruukonen A, Surcel HM, Bloigu A, et al. Maternal and Child's Thyroid Function and Child's Intellect and Scholastic Performance. *Thyroid* 2015;25(12):1363-74.
- Pajusalu S, Kahre T, Roomere H, Murumets Ü, Roht L, Simenson K, et al. Large gene panel sequencing in clinical diagnostics – results from 501 consecutive cases. *Clin Genet* 2018;93(1):78-83.
- Pal DK, Pong AW, Chung WK. Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2010;6(8):445.
- Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, et al. MLPA vs multiprobe FISH: Comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 2006;69(3):228–33.
- Park K-B, Nam KE, Cho A-R, Jang W, Kim M, Park JH. Effects of Copy Number Variations on Developmental Aspects of Children With Delayed Development. *Ann Rehabil Med* 2019;43(2):215–23.
- Payne JM, Barton B, Ullrich NJ, Cantor A, Hearps SJ, Cutter G, et al. Randomized placebo-controlled study of lovastatin in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology* 2016;87(24):2575-84.

- Peacock-Chambers E, Ivy K, Bair-Merritt M. Primary care interventions for early childhood development: A systematic review. *Pediatrics* 2017;140(6).
- Plecko B, Paul K, Paschke E, Stoeckler-Ipsiroglu S, Struys E, Jakobs C, et al. Biochemical and molecular characterization of 18 patients with pyridoxine-dependent epilepsy and mutations of the antiquitin (ALDH7A1) gene. *Hum mutat* 2007;28(1):19-26.
- Plecko B, Paul K, Mills P, Clayton P, Paschke E, Maier O, et al. Pyridoxine responsiveness in novel mutations of the PNPO gene. *Neurology* 2014;82(16):1425-33.
- Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* 2013;341(6141):1237758.
- Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol cytogenet* 2013;6(1):7.
- Poninska JK, Bilinska ZT, Franaszczyk M, Michalak E, Rydzanicz M, Szpakowski E, et al. Next-generation sequencing for diagnosis of thoracic aortic aneurysms and dissections: diagnostic yield, novel mutations and genotype phenotype correlations. *J Transl Med* 2016;14(1):115.
- Posey JE, Rosenfeld JA, James RA, Bainbridge M, Niu Z, Wang X, et al. Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet Med* 2016;18(7):678-85.
- Preiksaitiene E, Molytė A, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Utkus A, Patsalis PC, et al. Considering specific clinical features as evidence of pathogenic copy number variants. *J Appl Genet* 2014;55(2):189-96.
- Price DJ, Kennedy H, Dehay C, Zhou L, Mercier M, Jossin Y, et al. The development of cortical connections. *Eur J Neurosci* 2006;23(4):910-20.
- Quintela I, Fernandez-Prieto M, Gomez-Guerrero L, Resches M, Eiris J, Barros F, et al. A 6q14.1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22.31 copy number gain. *Clin Case Reports* 2015;3(6):415–23.
- Radhakrishnan B, Anand AA. Role of miRNA-9 in brain development. *J Exp Neurosci* 2016;10:JEN-S32843.

- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006; 140(19):2063-74.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 2012;380:1674–82.
- Redin C, Gérard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2014;51(11):724–36.
- Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 2013;15(9):733–47.
- Reinstein E, Liberman M, Feingold-Zadok M, Tenne T, Graham JM Jr. Terminal microdeletions of 13q34 chromosome region in patients with intellectual disability: Delineation of an emerging new microdeletion syndrome. *Mol Genet Metab* 2016;118(1):60-3.
- Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. Non-syndromic X-linked mental retardation: From a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol* 2005;204(1):8-20.
- Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* 2016;18(7):696–704.
- Rice LJ, Einfeld SL, Hu N, Carter CS. A review of clinical trials of oxytocin in Prader–Willi syndrome. *Curr Opin Psychiatry* 2018;31(2):123-7.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405.

- Rivière JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 2012;44(8):934.
- Roberson EDO, Wohler ES, Hoover-Fong JE, Lisi E, Stevens EL, Thomas GH, et al. Genomic analysis of partial 21q monosomies with variable phenotypes. *Eur J Hum Genet* 2011;19(2):235–8.
- Robertson J, Hatton C, Emerson E, Baines S. Prevalence of epilepsy among people with intellectual disabilities: a systematic review. *Seizure* 2015;29:46-62.
- Robinson PN, Mundlos S. The human phenotype ontology. *Clin Genet* 2010;77(6):525–34.
- Rooms L, Reyniers E, Van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, et al. Subtelomeric Deletions Detected in Patients with Idiopathic Mental Retardation Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Hum Mutat* 2004;23(1):17–21.
- Roselló M, Martínez F, Monfort S, Mayo S, Oltra S, Orellana C. Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18(5):558–66.
- Rosenfeld J, Patel A. Chromosomal Microarrays: Understanding Genetics of Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies. *J Pediatr Genet* 2016;06(01):042–50.
- Rowe LR, Lee JY, Rector L, Kaminsky EB, Brothman AR, Martin CL, et al. U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements. *J Med Genet* 2009;46(10):694–702.
- Ruiter EM, Koolen DA, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N, Hamel BCJ, et al. Pure subtelomeric microduplications as a cause of mental retardation. *Clin Genet* 2007;72(4):362–8.
- Ruiz-Antoran B, Sancho-López A, Cazorla-Calleja R, López-Pájaro LF, Leiva Á, Iglesias-Escalera G, et al. A randomized placebo controlled clinical trial to evaluate the efficacy and safety of minocycline in patients with Angelman syndrome (A-MANECE study). *Orphanet J Rare Dis* 2018;13(1):144.

- Rump A, Hildebrand L, Tzschach A, et al. A mosaic maternal splice donor mutation in the EHMT1 gene leads to aberrant transcripts and to Kleefstra syndrome in the offspring. *Eur J Hum Genet* 2013;21(8):887.
- Rump P, Jazayeri O, van Dijk-Bos KK, Johansson LF, van Essen AJ, Verheij JB, et al. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. *BMC med genomics* 2015;9(1):7.
- Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2008;40(6):782-8.
- Saitsu H, Kato M, Matsumoto N. Haploinsufficiency of STXBP1 and Ohtahara syndrome. *Epilepsia* 2010;51(suppl.5):71.
- Salahshourifar I, Halim AS, Sulaiman WA, Ariffin R, Nor NN, Zilfalil BA. De novo interstitial deletion of 1q32. 2–q32. 3 including the entire IRF6 gene in a patient with oral cleft and other dysmorphic features. *Cytogenet Genome Res* 2011;134(2):83-7.
- San Lucas FA, Wang G, Scheet P, Peng B. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. *Bioinformatics* 2012;28(3):421-2.
- Santa María L, Faundes V, Curotto B, Morales P, Morales K, Aliaga S, et al. Comparison of two subtelomeric assays for the screening of chromosomal rearrangements: analysis of 383 patients, literature review and further recommendations. *J Appl Genet* 2016;57(1):63-9.
- Santen GWE, Aten E, Sun Y, Almomani R, Gilissen C, Nielsen M, et al. Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 2012;44(4):379-80.
- Santos M, Coelho PA, Maciel P. Chromatin remodeling and neuronal function: Exciting links. *Genes Brain Behav* 2006;5 Suppl 2:80-91.
- Sarri C, Douzgou S, Gyftodimou Y, Tümer Z, Ravn K, Pasparki A, et al. Complex distal 10q rearrangement in a girl with mild intellectual disability: Follow up of the patient

- and review of the literature of non-acrocentric satellited chromosomes. *Am J Med Genet Part A* 2011;155(11):2841–54.
- Sawyer SL, Hartley T, Dymant DA, Beaulieu CL, Schwartzenuber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: Time to address gaps in care. *Clin Genet* 2016;89(3):275-84.
- Schaefer TL, Davenport MH, Grainger LM, Robinson CK, Earnheart AT, Stegman MS, et al. Acamprosate in a mouse model of fragile X syndrome: modulation of spontaneous cortical activity, ERK1/2 activation, locomotor behavior, and anxiety. *J Neurodev Disord* 2017;9(1):6.
- Schalock RL, Luckasson RA, Shogren KA, Borthwick-Duffy S, Bradley V, Buntinx WHE, et al. The renaming of mental retardation: Understanding the change to the term intellectual disability. *Intellectual and Developmental Disabilities*. 2007.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270(5235):467-70.
- Scherzer AL, Chhagan M, Kauchali S, Susser E. Global perspective on early diagnosis and intervention for children with developmental delays and disabilities. *Dev Med Child Neur* 2012;54(12):1079-84.
- Schouten JP, Schouten JP, McElgunn CJ, McElgunn CJ, Waaijer R, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57-.
- Shaffer LG, Lupski JR. Molecular Mechanisms for Constitutional Chromosomal Rearrangements in Humans. *Annu Rev Genet* 2000;34(1):297–329.
- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 2008;40(3):322-8.
- Shevell MI, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D 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(3):367-80.

- Shevell M, Majnemer A, Platt RW, Webster R, Birnbaum R. Developmental and functional outcomes at school age of preschool children with global developmental delay. *J Child Neurol* 2005;20(8):648–54.
- Shonkoff JP, Boyce WT, McEwen BS. Neuroscience, molecular biology, and the childhood roots of health disparities: building a new framework for health promotion and disease prevention. *JAMA* 2009;301(21):2252-9.
- Shonkoff JP, Garner AS, Siegel BS, Dobbins MI, Earls MF, McGuinn L, et al. The lifelong effects of early childhood adversity and toxic stress. *Pediatrics* 2012;129(1):232–46.
- Shoukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schröder J, Zoll B, et al. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: Are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet* 2013;83(1):53–65.
- Short PJ, McRae JF, Gallone G, Sifrim A, Won H, Geschwind DH, et al. De novo mutations in regulatory elements in neurodevelopmental disorders. *Nature* 2018;555(7698):611–6.
- Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell* 2017;170(1):17-33.
- Slopis JM, Arevalo O, Bell CS, Hebert AA, Northrup H, Riascos RF, et al. Treatment of Disfiguring Cutaneous Lesions in Neurofibromatosis-1 with Everolimus: A Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial. *Drugs R D* 2018;18(4):295-302.
- Snijders Blok L, Madsen E, Juusola J, Gilissen C, Baralle D, Reijnders MRF, et al. Mutations in DDX3X Are a Common Cause of Unexplained Intellectual Disability with Gender-Specific Effects on Wnt Signaling. *Am J Hum Genet* 2015;97(2):343–52.
- Soden SE, Saunders CJ, Willig LK, Farrow EG, Smith LD, Petrikin JE, et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Sci Transl Med* 2014;3;6(265).
- South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision. *Genet Med* 2013;15(11):901.
- Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-

- tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med* 2019;21(11):2413–21.
- Srour M, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch Dis Child* 2014;99(4):386-9.
- Stankiewicz P, Pursley AN, Cheung SW. Challenges in clinical interpretation of microduplications detected by array CGH analysis. *Am J Med Genet A* 2010;152(5):1089-100.
- Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, Bowdin S, Monfared N, Thiruvahindrapuram B, et al. Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. *NPJ Genomic Med* 2016;13;1(1):1-9.
- Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, et al. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet* 2017;100(6):895–906.
- Strom SP, Lee H, Das K, Vilain E, Nelson SF, Grody WW, et al. Assessing the necessity of confirmatory testing for exome-sequencing results in a clinical molecular diagnostic laboratory. *Genet Med* 2014;16(7):510-5.
- Stromme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SME, Bruyere H, et al. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet* 2002;30: 441-5.
- Swinkels MEM, Simons A, Smeets DF, Vissers LE, Veltman JA, Pfundt R, et al. Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *Am J Med Genet A* 2008;146A(11):1430–8.
- Tărlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Exp Mol Med* 2018;50(8):1-7.
- Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A, Lefebvre M, Feillet F, El Chehadeh-Djebbar S, et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin Genet* 2016;89(6):700-7.

- Tierney AL, Nelson CA. Brain Development and the Role of Experience in the Early Years. *Zero Three* 2009;30(2):9–13.
- Trujillano D, Bertoli-avella AM, Kumar kandaswamy K, Weiss ME, Köster J, Marais A, et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet* 2017;25(2):176-182.
- Utari A, Chonchaiya W, Rivera SM, Schneider A, Hagerman RJ, Faradz SM, et al. Side effects of minocycline treatment in patients with fragile X syndrome and exploration of outcome measures. *Am J Intellect Dev Disabil* 2010;115(5):433-43.
- Vaillend C, Poirier R, Laroche S. Genes, plasticity and mental retardation. *Behav Brain Res* 2008;192(1):88-105.
- Vaivada T, Gaffey MF, Bhutta ZA. Promoting early child development with interventions in health and nutrition: a systematic review. *Pediatrics* 2017;140(2):e20164308.
- Valetto A, Orsini A, Bertini V, Toschi B, Bonuccelli A, Simi F, et al. Molecular cytogenetic characterization of an interstitial deletion of chromosome 21 (21q22.13q22.3) in a patient with dysmorphic features, intellectual disability and severe generalized epilepsy. *Eur J Med Genet* 2012;55(5):362–6.
- Van Bokhoven H, Bokhoven H van. Genetic and Epigenetic Networks in Intellectual Disabilities. *Annu Rev Genet* 2011;45(1):81–104.
- Van Karnebeek CD, Bowden K, Berry-Kravis E. Treatment of neurogenetic developmental conditions: from 2016 into the future. *Pediatr Neurol* 2016;65:1-3.
- Van Kuilenburg ABP, Meijer J, Mul ANPM, Hennekam RCM, Hoovers JMN, de Die-Smulders CEM, et al. Analysis of severely affected patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency reveals large intragenic rearrangements of DPYD and a de novo interstitial deletion del(1)(p13.3p21.3). *Hum Genet* 2009;125(5–6):581–90.
- Vega AI, Medrano C, Navarrete R, Desviat LR, Merinero B, Rodríguez-Pombo P, et al. Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing. *Genet Med* 2016;18(10):1037–43.
- Verrotti A, Spalice A, Ursitti F, Papetti L, Mariani R, Castronovo A, et al. New trends in neuronal migration disorders. *Eur J Paediatr Neurol* 2010;14(1):1-12.

- Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: From copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet* 2010;47(5):289-97.
- Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* 2016;17(1):9-18.
- Vissers LE, Van Nimwegen KJ, Schieving JH, Kamsteeg JJ, Kleefstra T, Yntema HG, et al. A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genet Med* 2017;19(9):1055.
- Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet* 2007;369(9556):145–57.
- Wang K, Li M, Hakonarson H, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;38(16): e164.
- Wang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH, et al. Epilepsy-associated genes. *Seizure* 2017;44:11-20.
- Wentzel C, Lynch SA, Stattin EL, Sharkey FH, Annerén G, Thureson AC. Interstitial deletions at 6q14.1-q15 associated with obesity, developmental delay and a distinct clinical phenotype. *Mol Syndromol* 2010;1(2):75–81.
- WHO/CDC/ICBDSR. Birth Defects Surveillance a Manual for Programme Managers. Geneva World Heal Organ. 2014.
- Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, Ploeg M Van Der, Tanke HJ, Raap AK. In situ hybridisation with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* 1991;19(12):3237–41.
- World Health Organization. International Classification of Functioning, Disability, and Health: Children & Youth Version: ICF-CY. World Health Organization; 2007.
- Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* 2015;385(9975):1305-14.
- Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J, et al. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet* 2010;11(1):72.

- Wu YW, Sullivan J, McDaniel SS, et al. Incidence of Dravet syndrome in a US population. *Pediatrics* 2015;136(5):e1310-5.
- Wynshaw-Boris A. Lissencephaly and LIS1: Insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin Genet* 2007;72(4):296-304.
- Xiao B, Ji X, Xing Y, Jiang W-T, Zhang J-M, Tao J. Inverted Duplication and Deletion of 10q25q26 in a Patient without Any Obvious Skeletal Anomalies. *Mol Syndromol* 2012;3(4):185-9.
- Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003;117C(1):15–24.
- Yamamoto T, Shimojima K, Nishizawa T, Matsuo M, Ito M, Imai K. Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including DYRK1A and KCNJ6. *Am J Med Genet Part A* 2011;155(1):113–9.
- Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014;312(18):1870-9.
- Yokoyama E, Del Castillo V, Sánchez S, Ramos S, Molina B, Torres L, et al. Derivative chromosomes involving 5p large rearranged segments went unnoticed with the use of conventional cytogenetics. *Mol Cytogenet* 2018;11(1).
- Zhang F, Lupski JR. Non-coding genetic variants in human disease. *Hum Mol Genet* 2015;24(R1):R102-10.
- Zuffardi O, Bonaglia M, Ciccone R, Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements?? *Clin Genet* 2009;75(6):505–13.

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Ruml Stojanović je rođena 21. februara 1983. u Beogradu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek Molekularna biologija i fiziologija, smer Eksperimentalna biomedicina, sa prosečnom ocenom 9,20 i diplomskim radom na temu „Analiza polimorfizma *CYP27B1* gena (C2838T) kod bolesnika sa oralnim skvamocelularnim karcinomom”. Specijalističke akademske studije, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Genetika, završila je 2016. godine sa prosekom 10,0 i specijalističkim radom pod nazivom „Ispitivanje genetičke osnove rasopatija u grupi pacijenata iz Srbije”, čime je stekla zvanje specijalista biologije. Od 2011. godine je angažovana na projektu „Analiza genetičkih markera mišićne distonije“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od januara 2012. godine je zaposlena na Univerzitetnoj dečjoj klinici u Genetičkoj laboratoriji Službe za kliničku genetiku. Autor je tri naučna rada objavljena u međunarodnim časopisima kao i 15 saopštenja koja su prezentovana na konferencijama u zemlji i inostranstvu. Član je Društva genetičara Srbije i Evropskog udruženja za humanu genetiku. Tečno govori engleski jezik.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Jelena Ruml Stojanović

Broj upisa: MM-05/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Karakterizacija genetičke osnove zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća kod dece

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 13.03.2020.

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Ruml Stojanović

Broj upisa: MM-05/11

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: Karakterizacija genetičke osnove zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća kod dece

Mentor: Doc.dr Goran Čuturilo

Komentor: Prof. Dr Ivana Novaković

Potpisana: Jelena Ruml Stojanović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 13.03.2020.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija genetičke osnove zaostajanja u razvoju i intelektualnih poteškoća kod dece

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 13.03.2020.

Potpis doktoranda

