

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, Д-Р, ДБН

д-р САВИНА ПЕТРОВА ХАДЖИДЕКОВА

**МИКРОСТРУКТУРНИ ГЕНОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ
ПАЦИЕНТИ С ВРОДЕНИ МАЛФОРМАЦИИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
“ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”, Шифър 7.1.

Професионално направление: „Медицина”

Научна специалност: „Генетика”, (шифър 01.06.06)

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН

НАУЧНО ЖУРИ В СЪСТАВ:

ПРЕДСЕДАТЕЛ: Доц. д-р Радка Стефанова Тинчева, дмн - становище

ЧЛЕНОВЕ: 1. Проф. д-р Спаска Димитрова Петкова, дбн- рецензент

2. Проф. д-р Бойка Борисова Аначкова, дбн - рецензент

3. Член кор. проф. д-р Иван Георгиев Иванов, дбн - становище

4. Проф. д-р Драга Иванова Тончева, дбн – становище

София, 2011

Изследванията са финансирани частично от:

Медицински Университет – София, Проект №12/2009, Договор № 46/2009 г. и Фонд „Научни изследвания“ към МОМН, Грант № ДТК02/76 от 21.12.2009 г.

Изследванията са извършени в Катедра по Медицинска генетика и Отделение по клинична генетика, СБАЛДБ „Княгиня Евдокия“, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертацията обхваща съдържа 234 стандартни страници и включва 48 фигури, 14 таблици и 4 приложения. Оформена е в 6 глави, заключение, общи изводи, приноси, приложения, литературни източници и декларация за оригиналност. Библиографията обхваща 402 източника като 281 броя са публикувани през последните 10 години.

Докторантът е задочен докторант към Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по Медицинска генетика към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 23.06.2011 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Медицинска генетика, 6-ти етаж на СБАЛАГ „Майчин дом“, ул. „Здраве“2, София, 1431.

Защитата ще се състои на 10.10.2011 год. от 15.00 часа в Аулата на СБАЛАГ „Майчин дом“.

Автор: д-р Савина Петрова Хаджидекова

Заглавие: Микроструктурни геномни аберации при пациенти с вродени малформации.

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“, Шифър 7.1.

Професионално направление: „Медицина“

Научна специалност: „Генетика“, (шифър 01.06.06)

Съдържание

Въведение	1
I. Цел и задачи	3
II. Материали и методи	3
1. Участници в проучването	3
2. Биологични проби	4
3. Използвани методи	4
3.1. Олигонуклеотидни микрочипове	5
3.2. ВАС - микрочипове	10
III. Резултати	14
1. Подбор на пациенти	14
2. Дизайн на експерименталната работа	15
3. Цитогенетичен анализ	16
4. Микрочипова СГХ	17
4.1. Патологични вариации в броя копия	17
4.2. Нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение	23
5. Молекулно-цитогенетичен анализ с FISH	25
6. Клинични фенотипи на пациентите с установени патологични CNVs	36
7. Сравняване възможностите на 2 различни микрочипови платформи - ВАС - чипове срещу олиго - микрочипове	43
IV. Обсъждане	44
1. Обсъждане на резултатите от цитогенетичния анализ	45
2. Обсъждане на резултатите от микрочиповата СГХ	46
2.1. Обсъждане на установените патологични вариации в броя копия	48
2.2. Анализ на генотип/фенотипни корелации при пациентите с патологични вариации в броя копия	48
2.3. Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение	59
3. Обсъждане на резултатите от FISH анализа	66
4. Анализ на диагностичните възможности на 2 различни микрочипови платформи - ВАС - чипове срещу олиго - микрочипове	69
V. Заключение	75
VI. Изводи	77
VII. Приноси	78
VIII. Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд	79
IX. Благодарности	81
X. Summary	82

Използвани в текста съкращения

Съкращения на кирилица

ВА	- вродени аномалии
г.с.	- гестационна седмица
ДНК	- дезокси - рибонуклеинова киселина
ЕЕГ	- електроенцефалограма
мтДНК	- митохондриална ДНК
СГХ	- сравнителна геномна хибридизация
ССС	- сърдечно-съдова система
ЦНС	- централна нервна система

Съкращения на латиница:

BAC	- <u>B</u> acterial <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome (изкуствена бактериална хромозома)
bp	- <u>B</u> ase <u>P</u> airs (базова двойка)
CGH	- <u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization (сравнителна геномна хибридизация)
CNVs	- <u>C</u> opy <u>N</u> umber <u>V</u> ariations (вариации в броя копия)
Cy3	- <u>C</u> yanine 3 (цианин 3)
Cy5	- <u>C</u> yanine 5 (цианин 5)
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамидин-2-фенилиндол)
DGV	- <u>D</u> atabase of <u>G</u> enomic <u>V</u> ariants (база данни на геномните варианти)
EDTA	- <u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> (етилен диамино-тетраоцетна киселина)
FISH	- <u>F</u> luorescent <u>i</u> n <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization (флуоресцентна ин ситу хибридизация)
GTG	- <u>G</u> -banding by <u>T</u> rypsin and <u>G</u> iemsa (G лентуване чрез трипсин и боя на Гимза)
Kb	- <u>K</u> ilobase (килобаза)
Mb	- <u>M</u> egabase (мегабаза)
MLPA	- <u>M</u> ultiplex <u>L</u> igation-dependent <u>P</u> robe <u>A</u> mplification (множествена лигазно медирана амплификация на пробата)
QC	- <u>Q</u> uality <u>C</u> ontrol (качествен контрол)
QF-PCR	- <u>Q</u> uantitative <u>F</u> luorescence <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция)
SBR	- <u>S</u> ignal to <u>B</u> ackground <u>R</u> atio (съотношение на интензитета на сигнала към фоновия шум)
SD	- <u>S</u> tandard <u>D</u> eviation (стандартно отклонение)
SG	- <u>S</u> pectrum <u>G</u> reen (зелен спектър)
SO	- <u>S</u> pectrum <u>O</u> range (оранжев спектър)
SSC	- <u>S</u> aline- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate (солеви натриев цитрат)

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Въведение

Настоящата дисертация насочва вниманието към актуален здравен проблем - вродени аномалии и малформативни синдроми, които поставят трудни диагностични задачи. Вродените аномалии (ВА) представляват тежко бреме за засегнатите семейства и обществото като цяло и имат пряк отрицателен ефект върху раждаемостта, увеличават заболяемостта и смъртността.

Честотата на вродените дефекти на развитието е 3-5% от всички раждания. Всяка година в България се раждат около 3500 нови болни с генетично заболяване. Изключително високата цена на лечението и отглеждането на засегнатите индивиди се плаща от всеки член на обществото чрез бюджета, социалното и здравно осигуряване. В развитите страни вродените аномалии са водещата причина за фетална, неонатална и детска смъртност и заболяемост. Двадесет процента от детската смъртност се дължат на вродените аномалии - процент, който непрекъснато се увеличава. Заболяемостта и инвалидизацията на преживелите деца са тежък медико-социален проблем. Приблизително 25% от хоспитализираните болни и около 1/3 от общия брой леглодни в педиатричните отделения се дължат на вродени аномалии от различен тип.

Причините за вродените аномалии в повечето случаи (40-60%) не могат да бъдат открити с прилагането на конвенционалните диагностични тестове. От развитието на хромозомните лентови техники в края на 60-те години цитогенетичният анализ е златен стандарт за диагностика на ВА и се прилага рутинно в България от много години. Въпреки, че е широко използван, методът има редица ограничения: ниска резолюция, времеемък, трудоемък, изисква квалифицирани умения и е труден за автоматизиране. Разрешителните възможности зависят от качеството на получените метафази, като обикновено са налице около 350-500 ленти на хаплоиден набор и съответно 5-15 Mb (Megabase) резолюция. В последните 2 десетилетия приложението на молекулни и молекулно-цитогенетични техники като FISH (Fluorescent in Situ Hybridization), QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) в допълнение към цитогенетичния анализ позволиха разширяването на спектъра от диагностицирани болести. Те имат по-висока резолюция в сравнение с конвенционалното кариотипиране, но не позволяват цялостен анализ и изискват предварителна информация относно suspectната хромозомна аномалия и локализацията ѝ. В по-голямата част от случаите чрез тези методи не могат да се открият промени и ВА се причисляват към тези с неясна етиология. Това би могло да се дължи на микроструктурни аберации, които се пропускат от по-горе изброените методи.

Като се има предвид бързото развитие на геномиката и високия процент на ВА без установен генетичен дефект, налице е очевидна нужда от прилагането на високорезолютивни скринингови методи за подобряване както на генетичната диагностика на ВА, така и на генетичното консултиране и изработването на стратегии за профилактика и лечение. Новите микрочипови ДНК (дезоксирибонуклеинова киселина) технологии като сравнителната геномна хибридизация върху микрочипове (СГХ - сравнителна геномна хибридизация, array CGH - array-based Comparative Genomic Hybridization) комбинират предимствата на по старите технологии като позволяват цялостен геномен скрининг, съчетан с висока реолюция. Принципът на метода се основава на конкурентна хибридизация на различно белязани контролна и тест ДНК върху фиксирани на твърд носител ДНК фрагменти, като резолюцията зависи само от размера и гъстотата на фиксираните клонове. В единична реакция може се скринира целия геном за небалансирани геномни микроизменения, което го прави високо ефективен при анализ на заболявания, зависими от генната доза. Въпреки че хромозомите не се визуализират под микроскоп, терминът “молекулно кариотипиране” се използва за този вид техники по аналогия с конвенционалното кариотипиране.

Чрез микрочипова СГХ биха могли да се идентифицират микроструктурни изменения и да се докаже генетична причина при случаи с нормална находка от другите изследвания. Микрочиповата СГХ би могла също да хвърли светлина върху молекулната основа на неясни малформативни синдроми, както и при неясна цитогенетична находка за поставяне на прецизна диагноза. Размерът на делецията и дори мястото на скъсване могат да бъдат недвусмислено уточнени. Това е важно при разкриването на генотип/фенотипни корелации и при идентификацията на свързани с болести гени. Приложението на микрочипова СГХ при случаи с установени при цитогенетичния анализ видимо балансирани транслокации може да установи наличието на микродупликация или микроделеция в мястото на скъсването (т.е. небалансирана транслокация) или да потвърди балансирания характер на преустройството. В допълнение микрочиповата СГХ има потенциал да подобри нашите знания и за нормалните количествени варианти в човешкия геном.

Досега в България редица изследователи са работили върху проблемите на клиничната симптоматика, етиологията и епидемиологията на вродените аномалии, но не са провеждани системни молекулно-генетични изследвания на целия геном. В литературата има съобщения за цялостен геномен анализ, но предимно на спорадични случаи.

Това е първото проучване в България върху по-голяма група пациенти с вродени аномалии посредством микрочипов ДНК анализ за вариации в броя копия (CNVs - Copy Number Variations) на целия геном.

I. Цел и задачи

Цел

Целта на настоящата дисертация е чрез молекулно кариотипиране да се разкрият микроструктурни геномни изменения при пациенти с идиопатични вродени малформации, да се установи произхода на патологичните вариации и да се анализират фенотип/генотипните корелации.

Задачи

1. Да се разкрият типа и честотата на патологичните микроструктурни геномни изменения като фактори в етиологията на вродените малформации;
2. Да се определят честотата и типа на нормалните вариации и на вариантите с неясно клинично значение при вродените малформации;
3. Да се установят фенотип/генотипни корелации при патологични микроаберации и да се потърсят кандидат-гени за патологичните нарушения;
4. Да се оптимизира технологията на микрочиповата СГХ с оглед въвеждането ѝ като метод за рутинна генетична диагностика на вродените малформации;
5. Да се сравнят възможностите за диагностика на две различни микрочипови платформи - ВАС-чипове срещу олиго-микрочипове;
6. Да се определи генетичния риск при засегнати семейства с микроделеционни/микродупликационни синдроми, за да се подобри генетичното консултиране;
7. Да се създаде ДНК банка от деца с вродени малформации и родителите им за бъдещи геномни изследвания.

II. Материали и методи

1. Участници в проучването

Основната група пациенти обхваща от 96 лица с дисморфични стигми, които се съпровождат или не от интелектуална недостатъчност, нарушения в поведението, изоставане във физическото развитие, конвулсивен синдром и други нарушения от страна на ЦНС (централна нервна система) и други органи и системи. Според Rio и сътр. наличието на вродени малформации, поведенчески проблеми и постнатално изоставане в развитието са най-честата комбинация от симптоми, която се среща при пациенти с установени

небалансиран геномни микроизменения. Възрастта на изследваните лица е от 2 седмици до 28 години. От тях 49 са от женски пол, а останалите 47 от мъжки пол.

Всички пациенти са изследвани с цитогенетичен анализ. Шестима от пациентите (пет момчета и едно момиче) след цитогенетичния анализ са изследвани с FISH с локус специфични сонди за известни микроделеционни синдроми - на Prader-Willi, на Angelman и на Williams-Beuren), тъй като са с добре дефинирани клинични фенотипи. В настоящата разработка за микрочипов СГХ анализ са селектирани 52 пациента с ВМ - 29 момичета и 23 момчета. Шестима от пациентите са изследвани едновременно с две различни микрочипови платформи - ВАС микрочипове и олигонуклеотидни микрочипове с цел сравняване възможностите на двете техники.

Всички участници са запознати със същността на изследването чрез писмена форма „Информация за участниците“ и са подписали информирано съгласие за участие или това е направено от техен родител/пълномощен представител.

Основната част от пациентите за настоящото проучване е набрана в рамките на съвместен проект „Молекулно кариотипиране на пациенти с вродени малформации“ на Катедрата по Медицинска генетика, Медицински университет София и Отделение по клинична генетика, СБАЛДБ „Княгиня Евдокия“, МУ - София с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ към МОМН, Грант № ДТК02/76 от 21.12.2009 год. Част от изследванията са проведени по проект „Високорезолютивен геномен скрининг за небалансирани геномни изменения при деца с вродени малформации“, финансиран от СМН към Медицински Университет - София, Договор № 46/2009 год., Проект №12/2009.

2. Биологични проби

От всеки участник е взета венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изолирането на ДНК кръвта е събирана във вакутейнери с EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic A) (4 ml) и съответно с Li-Heparine (4 ml) за изготвяне на лимфоцитни култури. След изолирането на високомолекулна геномна ДНК, тя е съхранявана в разтворено състояние в ТЕ буфер при -20°C в ДНК-банката на Катедрата по Медицинска генетика.

3. Използвани методи

В настоящата работа е приложена комбинация от цитогенетични, молекулно-цитогенетични и молекулни методи: конвенционален цитогенетичен анализ; фенол-хлороформна екстракция на високомолекулна ДНК от венозна кръв; хоризонтална гел-електрофореза и спектрофотометрично измерване; СГХ върху ВАС - микрочипове; СГХ върху

олиго ДНК - микрочипове; FISH анализ за валидиране на находката от микрочиповия СГХ анализ.

Използвани са две микрочипови платформи - олигонуклеотидни микрочипове и ВАС - микрочипове. Принципът и на двата метода се състои в конкурентна хибридизация между белязани с различни флуоресцентни багрила (Cy3 - Cyanine 3, цианин 3 и Cy5 - Cyanine 5, -цианин 5) тест- и контролна ДНК с фиксирани върху предметни стъкла ДНК секвенции (олигонуклеотиди или ВАС - клонове).

3.1. Олигонуклеотидни микрочипове

Използвани са олигонуклеотидни микрочипове, формат 2x105K, с гъстота 105,072 секвенции, покриващи целия геном с резолюция 35 Kb (килобази) CytoChip Oligo, версия 1.1., (BlueGnome, Cambridge, UK). CytoChip Oligo микрочиповете имат две отделни полета за хибридизация, даващи възможност за едновременен анализ на две проби върху един чип

Техника. Техниката включва няколко основни етапа - 1) подготовка на пробата; 2) белязване; 3) пречистване и комбиниране на белязаните проби; 4) хибридизация; 5) промиване; 6) скениране на микрочиповете; 7) софтуерен анализ на данните.

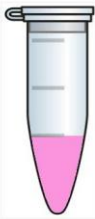
Подготовка на пробата. Работи се с разтворена в ТЕ буфер високомолекулна ДНК от порядъка на 10-20 Kb, със съотношение на чистота за протеини и РНК в границите между 1.8-2.0 при дължина на вълната OD 260/280 и със съотношение за органични разтворители при OD 260/230 > 2.0. При наличие на замърсяване пробите се пречистват с помощта на протеиназа K и повторно преципитиране. В някои случаи може да се използва и по-нискомолекулна ДНК, което налага предварителна рестрикция на тестваната и контролната ДНК посредством RsaI и AluI. Тестваните ДНК на пациентите (T1-T8) и контролните ДНК-и (K1-K8) се разреждат със свободна от нуклеази дестилирана H₂O до 100 ng/μl работна концентрация.

Белязване. Белязането се осъществява на принципа на nick транслацията. Използват се рандом праймери за белязване на тестваната и контролната ДНК с различни флуорохроми, които имат различен емисионен спектър. При белязането на ДНК е важно да се работи на лед, а пробите да се пазят от пряка светлина.

- **Подготовка на рандом праймерите.** За всяка реакция са необходими по 500 ng ДНК (5 μl от работния ДНК разтвор), които се разтварят в 21 μl dH₂O. Към всяка епруветка се добавят по 5 μl смес от рандом праймерите до краен обем от 31 μl, като се разбъркват с пипета и се центрофугират на пулс. Реакционната смес се инкубира за 10 min на 94°C, след което веднага се прехвърля на 4°C за 5 min. Следва центрофугиране за 1 min на 6000 G.

- **Приготвяне на смес за белязване (labeling mix).** Работи се с количества, необходими за 16 реакции (8 тест ДНК, белязани със Cy3 и 8 контролни ДНК, белязани със Cy5) (Табл. 1).

Таблица 1. Необходими реактиви за белязване на 16 реакции за олиго-микрочипов анализ.

Компоненти	Cy3 смес за белязване на 8 реакции		Cy5 смес за белязване на 8 реакции	
5xРеакционен буфер		85 µl		85 µl
10xdNTP* - смес за белязване		42.5 µl		42.5 µl
Cy3dUTP**		25.5 µl		
Cy5 dUTP				25.5 µl
Exo-Klenow ензим		8.5 µl		8.5 µl
Общо		161.5 µl		161.5 µl
За 1 реакция		19 µl		19 µl

* dNTP - Deoxyribonucleotides Triphosphate (дезоксирибонуклеотид трифосфат)

** dUTP - Deoxyuridine Triphosphate (деоксиуридин трифосфат)

- **Смесване на ДНК-те със сместа за белязване.** Във всяка епруветка, съдържаща ДНК и праймери се добавят по 19 µl от сместа за белязване, като тестваната ДНК се смесва със Cy3 и съответно контролната ДНК със Cy5 до краен обем 50 µl. Разбърква се чрез пипетиране и се центрофугира на пулс за събиране на компонентите на дъното на епруветката.
- **Белязване в термоциклер.** Реакционните смеси с контролните и тест ДНК-те се поставят в термоциклер със следния режим на работа: 2 часа на 37°C → 10 min на 65°C → 5 min на 4°C. Следва центрофуга за 1 min на 6000 G.

Пречистване и комбиниране на белязаните проби. Следва двукратно пречистване през колонки с нитроцелулозен филтър. Към всяка от пробите се добавят по 430 µl филтриран 1x ТЕ буфер (краен обем 480 µl).

- **Филтруване на пробите.** Колонките за пречистване на белязаните ДНК се надписват от П1 до П8 и от К1 до К8 и пробите се прехвърлят върху целулозните филтри. Центрофугират се 10 min на 14 000 G, след което филтруваната течност се отлива. При второто промиване в колонките се наливат по 480 µl филтриран 1x ТЕ буфер и отново се центрофугират 10 min на 14 000 G. Пречистената ДНК се задържа във филтъра, поради което той се обръща на 180° в чиста епруветка и се центрофугира 1 min на 1000 G. Интересуващата ни ДНК се утаява на дъното на епруветката.

- **Определяне на обема на пречистените проби.** Количеството на пречистената ДНК се измерва с помощта на пипета, като варира около 21 μl . Добавя се 1хТЕ буфер за получаване на краен обем от 41 μl .
- **Проверка на концентрацията на ДНК и качеството на белязане.** Концентрацията на ДНК и инкорпорацията на съответното багрило в пробата се определят чрез спектрофотометър NanoDrop® ND-2000с, като се използват по 2 μl от всяка проба. Белязането се приема за успешно, ако концентрацията, инкорпорацията и чистота на пробата са в следните граници:
 - Концентрация на ДНК: 100 - 200 ng/ μl ;
 - Инкорпорация на багрилото: 4 - 8 pmol/ μl ;
 - Чистота на пробата при 260/280 nm: 1,8 – 2.
- **Комбинация на пробите с тествана и контролна ДНК.** Всяка тест ДНК (39 μl), белязана със Cy3 се комбинира със Cy5, белязана контролна ДНК (39 μl), като се съблюдава съвпадение по пола на пациента и контролата (общ обем 78 μl).

Хибридизация. Смесените тествана и контролна ДНК хибридизират върху микрочипа на принципа на конкурентното свързване.

- **Приготвяне на хибридизационна смес.** Предварително се разтваря с дестилирана вода 10х блокиращият агент, който е в лиофилизирано състояние и се инкубира 1 час на стайна температура. Към всяка проба (78 μl) се добавят: 130 μl 2х хибридизационен буфер (Hi-RPM), 26 μl 10х блокиращ агент (вортексира се преди употреба) и 25 μl човешка СОТ ДНК
- **Подготовка на хибридизационната смес в термоциклер.** След вортексиране и центрофугиране пробите се слагат в термоциклер при следния режим на работа: 3 min на 95°C → 30 min на 37°C.
- **Накапване на хибридизационната смес върху микрочиповете.** Върху покривното стъкло в средата на гумения уплътнител се накапват по 245 μl от пробата, така че течността да не докосне гумата. Върху покривното стъкло се поставя микрочипът с активната си страна към покривното стъкло, като е препоръчително е да се избягва образуването на мехури. Двете хибридизационни полета на CytoChip Oligo чипа се означават като bottom (долно поле до баркода) и top (горно поле). Микрочипът и покривното стъкло се монтират в хибридизационната касета и се завъртат няколко пъти, за да се отстранят неподвижните мехури.
- **Поставяне в хибридизационна печка.** Микрочиповете стъкла се оставят за 40 часа в предварително подгрята до 65°C печка с ротатор на 20 оборота за 1 min.

Промиване. Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК. Предварително се приготвят се следните разтвори (Табл. 2):

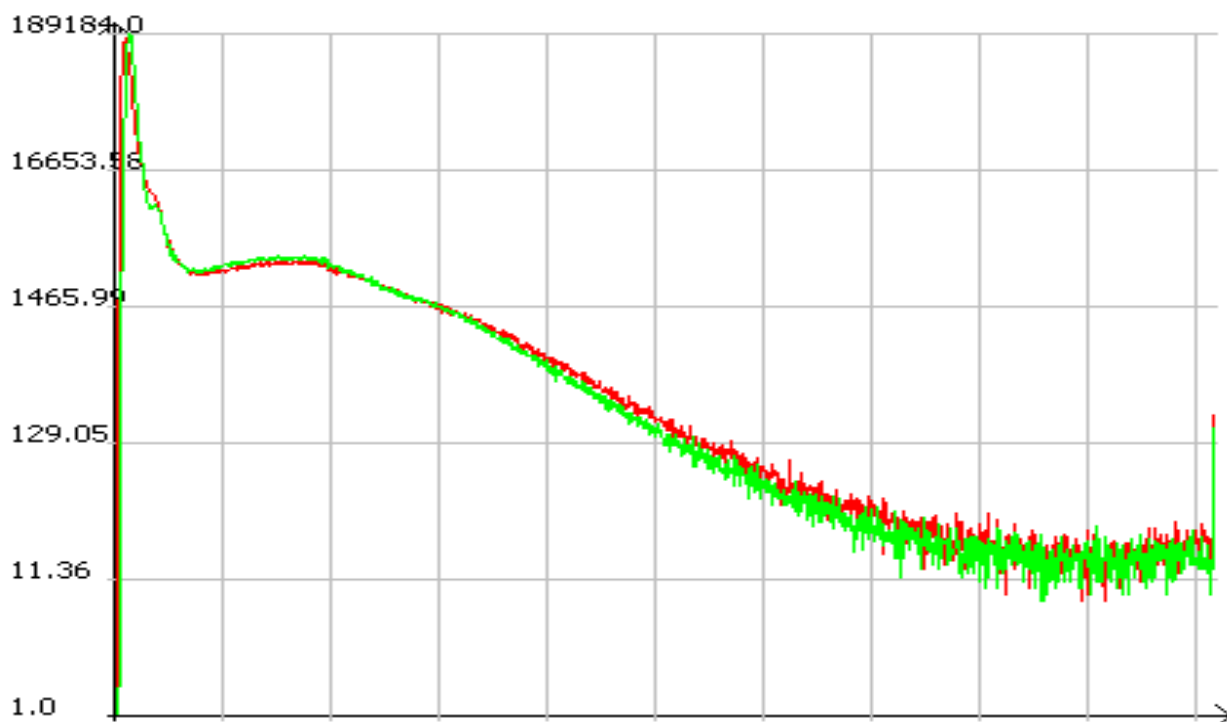
Таблица 2. Необходими разтвори за промиването на олиго-микрочиповете.

Обем	Температура	Шейкър	Буфер
400 ml	Стайна температура	Не	Олиго буфер 1
400 ml	Стайна температура	Да	Олиго буфер 1
400 ml	37°C	Не	Олиго буфер 2

- **Стопиране на хибридизацията.** На 40-ия час стъклата се вадят от печката и покривните стъкла се отлепят от микрочипа в първия промивен буфер на стайна температура. Микрочиповете се поставят в метален държател и се изплакват за 5 min в първия промивен разтвор в стъклена кювета с помощта на магнитна бъркалка или шейкър. Работи се на тъмно, като лабораторните съдове се покриват с алуминиево фолио. След 5 min чиповете се прехвърлят във втори промивен разтвор на водна баня на 37°C за 1 min при непрекъснато разклащане. Много бавно (10-12 sec) стъклата се вадят от разтвора с цел да не се образуват капки по повърхността на чиповете.
- **Съхранение.** Микрочиповете могат да се съхраняват за определено време с помощта на покривни стъкла с бариера за озона в оригиналната им кутийка на тъмно и сухо място.

Скениране на микрочиповете. Препоръчително е микрочиповете да се скенират същия ден, защото багрилата, особено Cy5, много бързо се разрушават под действието на атмосферния озон и светлината. Cytochip Oligo микрочиповете бяха скенирани на двуканален лазерен скенер GenePix 4100A, с 532 nm дължина на вълната за зеления лазер и 635 nm за червения лазер.

- **Прескениране.** По време на прескенирането при резолюция от порядъка на 50 μm се получава нискорезолютивен образ, на който се идентифицират хибридизационните полета и прилежащият баркод. С помощта на софтуерна програма GenePix Pro 6.0. се огражда зоната за скениране, съвпадаща с хибридизационното поле, като по този начин се намалява нивото на фоновия шум.
- **Скениране.** Поради голямата гъстотата на секвенциите (105,072) беше необходимо високорезолютивно скениране от порядъка на 5 μm . По време на скенирането е възможно да се настройва мощността на лазерите и/или силата на фотомултиплициращите тръби (PMT gain - photomultiplier tube), които се използват за детекция на флуоресценцията. Оптималната сила на лазерите се преценява по вида на хистограмата (Фиг. 1).



Фигура 1. Хистограма на зелената и червената флуоресценция. В този пример ординатата показва броя на пикселите, а абцисата интензитетът на сигналите на пикселите. Зелената линия отговаря на зеления лазер (532 nm) и съответно червената линия на червения лазер (635 nm). Високият пик до ординатата показва сигналите от фоновия шум (голям брой пиксели със слаб сигнал). Вторият по-нисък пик представлява сигналите, асоциирани с репликите от чипа (малък брой пиксели със силен интензитет на сигнала). PMT - и лазерните параметри трябва така да се настроят, че разстоянието между двата пика да е ясно изразено и зелената и червената хистограма да имат максимално препокриване.

PMT - и лазерните параметри могат да се настройват само по време на същинското скениране на хибридационното поле. Прескенът не позволява тази операция, защото фоновият шум, баркодът и други артефакти оказват съществен ефект. Мануалната настройка позволява получаването на по-качествени образи, като веднъж настроени следващите чипове се скенират автоматично. Скенираните образи се запамятват в TIFF формат, като се означават съответно с наставка „top” или „bottom”.

Софтуерен анализ на данните. Всички данни са обработени с програма BlueFuse Multi version 2.2., (BlueGnome, Cambridge). При анализа репликите на чипа се дефинират автоматично от софтуера. Флуоресцентните интензитети на всички реплики се калкулират след автоматично елиминиране на локалния фон, като нормализацията на интензитетите на Cy3 и Cy5 се извършва спрямо целия набор от реплики върху чипа. Калкулира се съотношението Cy3/Cy5 (при тест - ДНК, белязана със Cy3) и се взема средната стойност на това съотношение от репликите за всеки клон.

Критерии за отчитане на резултатите от експеримента. При обработка на данните се генерира графика за всяка тествана ДНК, като абцисата показва хромозната позиция на хибридизираните белязани клонове, а ординатата показва логаритмичното съотношение $\log_2$ между интензитетите на флуоресценция на Cy5 белязаните към Cy3 белязаните клонове, съобразно позицията им в микрочипа. $\log_2$ - стойности на флуоресцентното съотношение между +0.3 и -0.3 отразяват нормален брой копия. Стойности над +0.3 са отчетени като генетични допълнения/дупликации и съответно под -0.3 като загуба (делеция).

- **QC (Quality control)** - контрол на качеството. Софтуерът дава възможност за оценка на качеството на хибридизация, промивка и достоверност на получените резултати.
- **DLR raw (Derivative log Ratio raw)**. Приемливите стойности за DLR raw са < 0.20 . DLR е производно от $\log_2$ съотношението на интензитетите на флуоресценция. То отразява степента на разлика между съседни олигонуклеотидни клонове. По принцип два съседно разположени клона в повечето случаи трябва да имат много сходни съотношения, напр. ако са нормални те ще са с 1:1 съотношение. Увеличаването на стойността на DLR показва увеличаване на разликата между два съседни олиго клона.
- **DLR fused (Derivative log Ratio fused)**. Стойностите на DLR fused трябва да са по-ниски от < 0.20 . DLR fused показва съотношението на нормализираните необработени данни.
- **SD (standard deviation)** – стандартно отклонение на автозомите. Референтни граници 0.07-0.17. SD отразява разпределението на $\log_2$ съотношенията на всички клонове от чипа, върху нормализирани, но не обработени данни.
- **SBR**. Референтни граници 5 - 20. Представява съотношение между силата на сигнала и фоновия шум за двете багрила поотделно.

3.2. BAC - микрочипове

Използвани са CytoChip BAC - микрочипове (BlueGnome, Cambridge, UK), за изследване на промените в броя копия на 4400 секвенции от целия геном, покриващи всички хромозоми със средна плътност 1 клон/0.5 Mb, версия 2.01. CytoChip Oligo микрочиповете имат две отделни полета за хибридизация, даващи възможност за dye swap експеримент

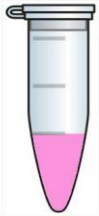
Техника. Техниката включва няколко основни етапа: 1) подготовка на пробата; 2) белязване; 3) пречистване и комбиниране на белязаните проби; 4) хибридизация; 5) промиване; 6) скениране на микрочиповете; 7) софтуерен анализ на данните.

Подготовка на пробата. Подготовката на пробата не се различава от протокола за олигонуклеотидните микрочипове, като при този метод не се прилага дигестия с рестриктази (вж. стр. 5, раздел II. 3.1.).

Белязание. Белязането както при олигонуклеотидните микрочипове се осъществява на принципа на *nick* транслацията с помощта на рандом праймери.

- **Приготвяне на смес за белязание (labeling mix).** Работи се с количества, необходими за 16 реакции (8 тест ДНК, белязани със Cy3 и 8 контролни ДНК, белязани със Cy5) (Табл. 3).

Таблица 3. Необходими реактиви за белязание на 16 реакции за ВАС-микрочипов анализ.

Компоненти	Cy3 смес за белязание на 8 реакции		Cy5 смес за белязание на 8 реакции	
Реакционен буфер		84 µl		84 µl
Свободна от нуклеази вода		159.6 µl		159.6 µl
рандом праймери		84 µl		84 µl
dCTP - смес за белязание		42.5 µl		42,5 µl
Cy3 dCTP*		8,4 µl		
Cy5 dCTP				8,4 µl
Общо		378 µl		378 µl
За 1 реакция		45 µl		

*dCTP - 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate - 2'-дезоксцитидин 5'-трифосфат

- **Смесване на ДНК-те със сместа за белязание.** По 45 µl от Cy3 сместа за белязание се разпределят в 8 епруветки, надписани от Т1 до Т8 (тест ДНК) и съответно по 45 µl от Cy5 микса в 8 епруветки, надписани от К1 до К8 (контролна ДНК). Във всяка епруветка се добавят по 4 µl от работния разтвор ДНК (100 ng/µl).
- **Подготовка на компонентите за белязание.** Реакционната смес се инкубира за 5 min на 94°C, след което веднага се прехвърля на 4°C за 5 min. Във всяка епруветка се добавя по 1 µl Klenow ензим (общ обем 50 µl), разбърква се внимателно и се центрофугира на пулс.
- **Белязание в термоциклер.** Реакционните смеси с контролните и тест ДНК-те се поставят в термоциклер на 37°C за 16-20 часа.
- **Стопиране на реакцията.** На края на белязането във всяка епруветка се добавят по 5 µl ЕДТА, като се вортексира добре за блокиране на реакцията на белязание (краен обем 55 µl).

Пречистване и комбиниране на белязаните проби. Следва пречистване през AutoSeq G50 колонки със смола, AutoSeq G50.

- **Подготовка на колонките.** Колонките се вортексират с капачките надолу, след което капачките се отвъртат на $\frac{1}{4}$ оборот и се отчупват дръжките отдолу. Поставят се в събирателни епруветки с дръжката надолу и се центрофугират на 2000 G/60 sec.
- **Пречистване на белязаните ДНК-и през колонките.** Сместа внимателно се размесва с пипета и цялото количество ДНК се прехвърля върху центъра на смолата без да се докосва с връхчето на пипетата. Следва центрофуга на 2000 G за 60 sec, като епендорфките се поставят в същата ориентация като колонките при центрофугирането.
- **Проверка на концентрацията на ДНК и качеството на белязание.** Концентрацията на ДНК и инкорпорацията на съответното багрило в пробата се определят чрез спектрофотометър NanoDrop® ND-2000с, като се използват по 2 μ l от всяка проба. Белязането се приема за успешно, ако концентрацията, инкорпорацията и чистота на пробата са в следните граници:
 - Концентрация на ДНК: 180 - 325 ng/ μ l
 - Инкорпорация на багрилото: 6 - 15 pmol/ μ l
 - Чистота на пробата при 260/280 nm: 1,8 - 2
- **Комбинация на пробите с тествана и контролна ДНК.** Всяка тест ДНК, белязана със Cy3 се комбинира със Cy5, белязана контролна ДНК, като се съблюдава съвпадение по пола на пациента и контролата.
- **Преципитация на белязаните ДНК – и.** Във всяка епруветка се добавят по 25 μ l Cot-1-ДНК и 11 μ l 3M натриев ацетат и се вортексират. Прибавят се 312 μ l абсолютен алкохол, завъртат се двукратно и се оставят на тъмно на -20°C за най-малко 2 часа.

Хибридизация. Преципитираните тествана и контролна ДНК хибридизират върху микрочипа на принципа на конкурентното свързване.

- **Подготовка на преципитираните ДНК за хибридизация.** След преципитацията пробите се центрофугират 15 min/13000 G на 4°C. ДНК - утайката трябва да има отчетливо виолетов цвят. Отстранява се супернатантът като се излива върху салфетка и се добавят 312 μ l 70% етанол (4°C). Центрофугира се за 5 min/13000 G на 4°C, супернатантът се излива, центрофугира се на пулс за събиране на капките, отстраняват се с пипета остатъците от алкохол и епруветките се оставят 5 min с отворена капачка за изпарение на последните количества етанол.
- **Подготовка на хибридизационната смес.** За намаляване на вискозитета 10%-ият декстранов буфер се загрява на 65°C за 5 min и към всяка ДНК- утайка се добавят по 21 μ l от него. Сместа се инкубира за 10 min на 75°C

до пълното разтваряне на утайката. Денатурацията може да се удължи с още 10 min при необходимост.

- **Подготовка на хибридизационната камера.** В пластмасова непрозрачна кутия се поставя лигнин и се напоява с 10 ml 2xSSC (Saline-Sodium Citrate - соли натриев цитрат)/50% формамид.
- **Накапване на хибридизационната смес върху микрочиповете.** Хибридизационната смес се охлажда на стайна температура и в центъра на покривното стъкло се накапват 19 μ l. Ръководейки се по матрица, микрочипът се залепя върху покривното стъкло като се внимава да не се образуват мехури. Микрочиповете се поставят в хибридизационната камера, която се увива плътно с парафилм и се инкубира на тъмно на 47°C за 16 - 21 часа.

Промиване. Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК. Предварително се приготвят следните разтвори (Табл. 4). След приключване на хибридизацията покривните стъкла се отлепят от микрочипа в кювета с 2xSSC/0,05% Tween 20 буфер на стайна температура. Микрочиповете се поставят в метален държател и се изплакват последователно в предварително подготвените буфери при непрекъснато разбъркване.

Таблица 4. Необходими разтвори за промиването на хибридизиралите ВАС-микрочипове.

№	Буфер	Обем	Т°С	Шейкър	Време
1.	2xSSC/0,05%	400 ml	Стайна температура	Да	10 min
2.	2xSSC/0,05%	400 ml	Стайна температура	Да	10 min
3.	2xSSC/0,05%	400 ml	60°C	Да	5 min
4.	1xSSC	400 ml	60°C	Да	5 min
5.	0,1xSSC	400 ml	60°C	Да	5 min
6.	0,1xSSC	400 ml	Стайна температура	Да	5 min

След приключване на хибридизацията покривните стъкла се отлепят от микрочипа в кювета с 2xSSC/0,05% Tween 20 буфер на стайна температура. Микрочиповете се поставят в метален държател и се изплакват последователно в предварително подготвените буфери при непрекъснато разбъркване.

Изсушаване на микрочиповете. Микрочиповете се поставят с баркода нагоре в епруветки от 50 ml и се центрофугират на 170 G за 3 min. По този начин се предотвратява изсъхването на капчици върху активната повърхност на чипа, които могат да доведат до артефакти по време на скенирането.

Скениране на микрочиповете. При скенирането на ВАС - микрочиповете се повтарят същите стъпки при олигочиповете, вж. стр. 8, раздел II. 3.1.

Софтуерен анализ на данните. При софтуерния анализ се спазва същия подход като при олигонуклеотидните чипове, вж. стр. 9, раздел II. 3.1.

III. Резултати

1. Подбор на пациенти

Подборът на пациенти с вродени малформации е проведен в клинична обстановка от лекари педиатри, дисморфолози и генетици. Вродените малформации се съпровождат или не от изоставане в нервно-психичното развитие, нарушения на поведението, изоставане във физическото развитие, конвулсивен синдром и други нарушения от страна на ЦНС и други органи и системи. В нашето проучване при подбора на пациентите се отдаде предимство на съчетанието на вродени малформации, лицев дисморфизъм и поведенчески нарушения, както и на пациенти с множествени аномалии и наличие на поне една голяма аномалия. Клиничният подбор е извършен в Отделението по Клинична генетика, СБАЛДБ „Княгиня Евдокия“, Медицински Университет – София.

Първоначалната селекция, включва група от 96 пациента (49 от женски пол и 47 от мъжки пол) на възраст от 2 седмици до 28 години. От тях впоследствие за микрочипов СГХ - анализ са селектирани 52 пациента (29 момичета и 23 момчета) на възраст от 1 месец до 28 години. От микрочиповия анализ са изключени пациенти с по-леки дисморфични стигми и вродени аномалии с ясен произход (вродени инфекции, бройни хромозомни аберации, потвърдени известни микроделеционни/микродупликационни синдроми, физични и химични тератогени и др.).

2. Дизайн на експерименталната работа



Фигура 2. Алгоритъм при молекулно кариотипиране на пациенти с вродени малформации.

Приложен е специфичен алгоритъм при подбора на пациенти с ВМ. Първият етап от работата е селекцията на пациенти с клиничен фенотип, насочващ към хромозомна болест. Създадена е подробна електронна база данни, съдържаща клинични данни за всеки пациент. От всеки пациент е изолирана високомолекулна ДНК, тествана електрофоретично и е изготвена лимфоцитна култура за цитогенетичен анализ. Пациенти с установена ясна хромозомна болест или известен микроделеционен синдром са изключени от микрочиповия анализ. След анализ на данните патологичните находки са валидирани допълнително с FISH метод. За всички установени патологични находки и CNVs с неясно клинично значение е направена подробна справка в обществено достъпни бази данни като DGV (Database of Genomic Variants - база данни на геномните варианти) (<http://projects.tcag.ca/variation/>), които позволяват фино картиране на засегнатите региони. След установяване на най-малките райони на препокриване с други сходни фенотипи е потърсена корелация между промяната в генната доза и клиничния фенотип (Фиг. 2).

3. Цитогенетичен анализ

При всички 96 пациента е направен подробен структурен анализ на хромозомите от 5 метафазни клетки плюс преброяването на хромозомите в други 25 метафазни пластинки. При краткосрочни култури това дава 95% вероятност за откриване на 10% мозаицизъм. Хромозомният анализ е проведен при резолюция 350-400 ленти на хаплоиден набор, което позволява резолюция от около 15 Mb. Основните критерии за хромозомна идентификация, определяне на състояния като мозаицизъм и използваната номенклатура за отразяване на хромозомните отклонения се основават на ISCN (1995): International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Хромозомният анализ е извършен в Катедрата по Медицинска генетика, МУ-София.

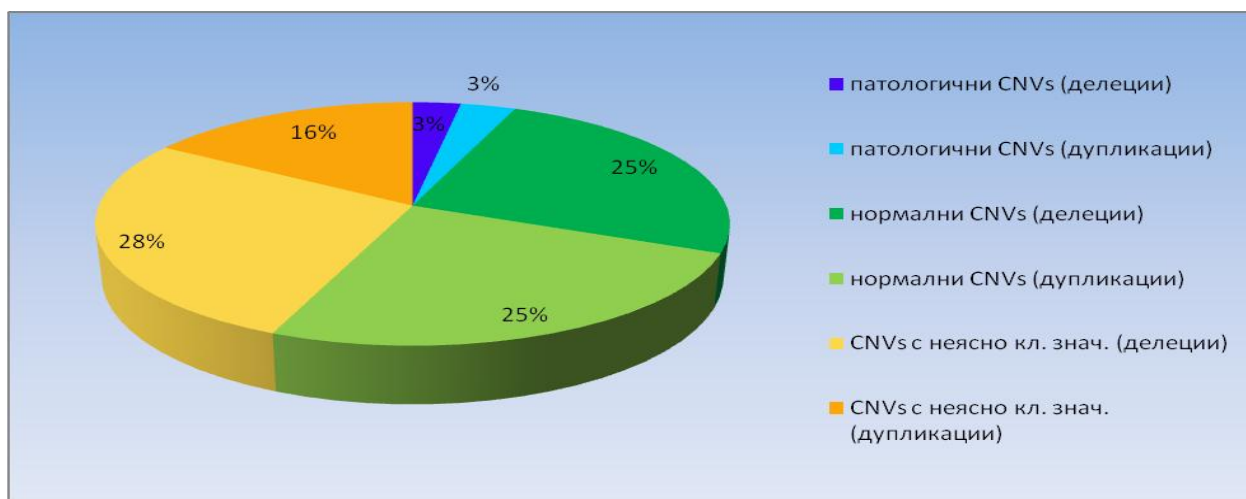
С цитогенетичния анализ в изследваната група е установена 14,5% честота на патологични хромозомни аберации.

Цитогенетичният анализ на култивирани лимфоцити от периферна кръв на 96-мата пациенти показва при 79 нормален женски (46,XX) или нормален мъжки (46,XY) кариотип. Шестима от пациентите (пациенти 53, 54, 55, 56, 57 и 58) са с регулярна форма на синдрома на Даун, а петима с различни мозаични състояния (Пациенти 59, 60, 61, 62 и 63). Тези 11 пациента са изключени от микрочиповия анализ, тъй като при тях диагнозата беше дефинитивно изяснена. При шестима от селектираните за микрочипов анализ пациенти са установени два хромозомни полиморфизма, една балансирана реципрочна транслокация и три кариотипа с неясна цитогенетична находка. При Пациенти 5 и 12 е намерен мъжки кариотип с полиморфна перичентрична инверсия на хромозома 9 - 46,XY, inv(9)(p11q13). Този вид инверсия на 9-та хромозома се приема за нормален вариант, тъй като се среща при повече от 1% от хората и не предизвиква клинични симптоми у носителите. При Пациент 42 е доказана видимо балансирана транслокация между хромозоми 13 и 18 - 46,XX,t(13;18)(q13;q23). При трима от пациентите е установен допълнителен хромозомен материал с неясен произход: Пациент 1 - 46,XX,add(4)(q35); Пациент 2 - 46, XX, add(17)(q25); Пациент 4 - 46,XY,add(18)(p11.2).

За да установяване произхода (де ново или унаследени) на хромозомните преустройства цитогенетично са изследвани родителите на Пациенти 1, 2 и 5. За съжаление част от пациентите са от държавни институции за изоставени деца и нямахме достъп до биологичен материал от родителите им. При родителите на Пациенти 1, 2 и 9 се установи нормален мъжки (46,XY) и нормален женски (46,XX) кариотип. При Пациент 5 инвертираната 9-та хромозома е с бащин произход, а при майката е установен нормален женски кариотип.

4. Микрочипова СГХ

От изследваните с микрочипов олиго-СГХ анализ 52 - ма пациенти при 9 са установени патологични CNVs. В допълнение при мнозинството от изследваните (41 пациента) са намерени нормални вариации в броя копия и вариации с неясно клинично значение (34 пациента). Детектирани са общо 247 вариации в броя копия, от които 15 патологични (7 делеции, 8 дупликации), 124 нормални (62 делеции, 62 дупликации) и 108 с неясно клинично значение (68 делеции, 40 дупликации) (Фиг. 3).



Фигура 3. Разпределение на общия брой установени CNVs.

Микрочиповият ДНК анализ е извършен в Катедрата по Медицинска генетика, Медицински Университет - София

4.1. Патологични вариации в броя копия

С микрочиповия анализ са разкрити общо 15 патологични вариации, които са разпределени върху осем хромозоми (хромозоми 1, 4, 6, 10, 18, 8, 9 и 17). При 6-ма от анализиранияте (Пациенти 1, 3, 4, 5, 6 и 9) се касае за комбинация от две патологични CNVs в различни хромозоми. Три от децата са с единична патологична вариация (Пациенти 2, 7 и 8) (Табл. 5). Шест от установените аберации са интерстициални, а останалите 9 с терминална локализация. При осем от аберациите се касае за дуплициран генетичен материал, съответно при седем за делетиран. Размерът на откритите патологични геномни изменения варира в границите от 1,5 Mb до 22 Mb.

Таблица 5. Обобщени резултати с патологични находки, установени след микрочиповата СГХ.

Пациенти	Хромозома	Тип аберация	Позиция в bp*		Размер (bp)	Цитолента	
			Начало	Край		Начало	Край
Пациент 1	4	делеция	184626382	188241505	3,615,123	4q35.1	4q35.2
	6	дупликация	145093143	159086577	13,993,434	6q24.2	6q25.3
Пациент 2	17	дупликация	61609811	72383563	10,773,752	17q24.2	17q25.2
Пациент 3	6	делеция	157888732	170867418	12,978,687	6q25.3	6q27
	10	дупликация	113995737	135356694	21,360,000	10q25.2	10q26.3
Пациент 4	6	дупликация	92548327	113881461	21,333,134	6q16.1	6q21
	18	дупликация	8698309	14178151	5,479,842	18p11.22	18p11.21
Пациент 5	8	дупликация	123500361	146264874	22,764,514	8q24.13	8q24.3
	9	делеция	153161	18176777	18,023,616	9p24.3	9p22.2
Пациент 6	1	дупликация	232841378	247190744	14,349,367	1q42.3	1q44
	6	делеция	158168855	170753136	12,584,281	6q25.3	6q27
Пациент 7	17	делеция	16450773	20372588	3,921,815	17p11.2	17p11.2
Пациент 8	4	делеция	82592957	84293873	1,700,916	4q21.21	4q21.22
Пациент 9	1	делеция	236642045	247190744	10,548,700	1q43	1q44
	6	дупликация	158902925	170780979	11,878,054	6q25.3	6q27

*bp – базова двойка

Казус 1. При цитогенетичния анализ на Пациент 1 е намерен допълнителен материал терминално в дългото рамо на 4 хромозома - 46,XX,add(4)(q35). Тъй като размерът на допълнителния материал е с много малки размери, не е възможно идентифицирането му само с микроскопски анализ. С оглед установяването на произхода му е приложен микрочипов СГХ анализ, при което са установени две патологични аберации - интерстициална дупликация на голям район в дългото рамо на 6 хромозома - dup(6)(q24.2q25.3), обхващаща 13,993,434 bp и терминална делеция в дългото рамо на 4 хромозома - del(4)(q35.1q35.2) с размер от 3,615,123 bp (Фиг. 4 А и Б, Табл. 5):

arr 4q35.1q35.2(184,626,382-188,241,505)x1, 6q24.2q25.3(145,093,143-159,086,577)x3.

Казус 2. При Пациент 2 подобно на Пациент 1 кариограмата показва неясна находка - допълнителен материал терминално в дългото рамо на 17 хромозома - 46, XX, add(17)(q25). Проведеният микрочипов ДНК анализ доказва, че се касае за интерстициална дупликация на материал в дългото рамо на 17 хромозома с размер 10,773,752 bp - dup(17)(q24.2q25.2) (Фиг. 4 В, Табл. 5):

arr 17q24.2q25.2(61,609,811-72,383,563)x3

Казус 3. Пациент 3 е с нормален женски кариотип (46,XX) и множествени малформации, поради което се селектира за микрочипов анализ. Резултатите показват комбинация от две различни аберации - терминална делеция на голям район в дългото рамо на 6 хромозома - del(6)(q25.3q27), обхващаща 12,978,687 bp и терминална дупликация в дългото рамо на 10 хромозома, обхващаща 21,360,598 bp (Фиг. 4 Д и Е, Табл. 5):

arr 6q25.3q27(157,888,732-170,867,418)x1, 10q25.2q26.3(113,995,737-135,356,694)x3

Казус 4. Пациент 4 подобно на Пациенти 1 и 2 е с неясна находка след цитогенетичния анализ - 46,XY,add(18)(p11.2). С цел изясняване произхода на допълнителния участък е направен микрочипов ДНК анализ, който показва, че се касае за две комбинирани аберации - интерстициална дупликация на материал в късото рамо на 18 хромозома - dup(18)(p11.22p11.21) с размер 5,479,842 bp и интерстициална дупликация в дългото рамо на 6 хромозома - dup(6)(q16.1q21) с размер от 21,333,134 bp (Фиг. 4 Ж и З, Табл. 5):

arr 6q16.1q21(92,548,327-113,881,461)x3, 18p11.22p11.21(8,698,309-14,178,151)x3

Казус 5. При Пациент 5 цитогенетичния анализ показва нормален мъжки кариотип с полиморфна перичентрична инверсия на хромозома 9 - 46,XY,inv(9)(p11q13). Тъй като този тип инверсия се приема за вариант на нормата, пациентът е насочен за микрочипов анализ. Резултатите показват комбинация от две аберации в 8-ма и 9-та хромозоми - терминална дупликация в дългото рамо на 8 хромозома - dup(8)(q24.13q24.3) с размер около 22 Mb и терминална делеция на голям район в късото рамо на 9 хромозома - del(9)(p24.2p23), обхващаща приблизително 18 Mb (Фиг. 4 И и К, Табл. 5):

arr 8q24.13q24.3(123,500,361-146,264,874)x3, 9p24.2p23(153,161-18,176,777)x1

Казус 6. При шестият пациент - момиче с нормален женски кариотип (46,XX) и множествени малформации, проведеният микрочипов анализ показва терминална делеция на голям район в дългото рамо на 6 хромозома - del(6)(q25.3q27), обхващащ 12,584,281 Kb (Kilobase - килобаза)

и терминална дупликация в дългото рамо на 1 хромозома - $\text{dup}(1)(\text{q}42.3\text{q}44)$ с размер от 10,739,896 Kb (Фиг. 4 Л и М, Табл. 5):

arr 1q42.3q44(232,841,378-247,190,744)x3, 6q25.3q27(158,168,855-170,753,136)x1

Казус 7. При Пациент 7 (момиче с нормален женски кариотип и множествени малформативни стигми) проведеният микрочипов анализ показва една патологична аберация - интерстициална делеция в късото рамо на 17 хромозома - $\text{del}(17)(\text{p}11.2\text{p}11.2)$ с размер от 3,921,815 bp (Фиг. 4 Г, Табл. 5):

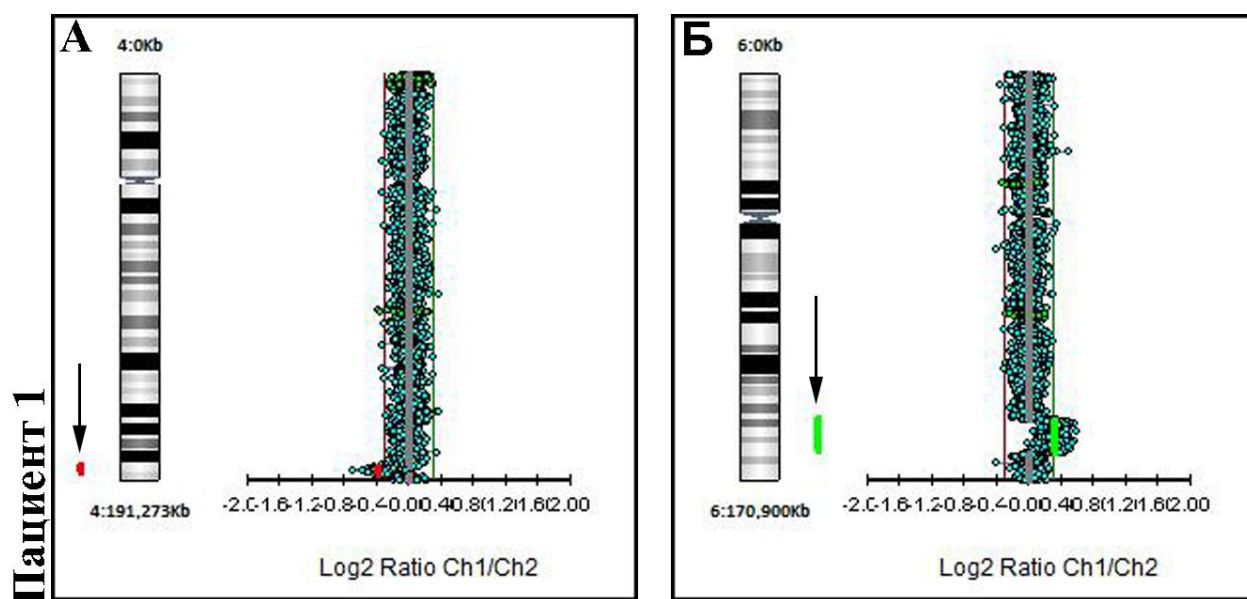
arr 17p11.2(16,450,773-20,372,588)x1

Казус 8. При Пациент 8 (момче с нормален мъжки кариотип и множествени малформации) молекулното кариотипиране установява една патологична аберация - интерстициална делеция в дългото рамо на 4 хромозома - $\text{del}(4)(\text{q}21.1\text{q}21.22)$ с размер 1,700,916 bp (Фиг. 4 П, Табл. 5):

arr 4q21.1q21.22(82,592,957-84,293,873)x1

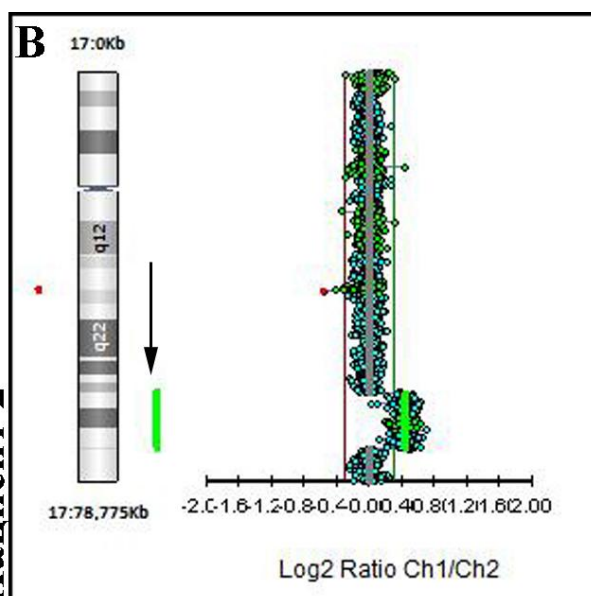
Казус 9. При пациент 9 - момиче с нормален женски кариотип (46,XX) и синдром на вродени аномалии с неясна етиология, молекулното кариотипиране намира две комбинирани аберации - терминална делеция на голям район в дългото рамо на 1 хромозома - $\text{del}(1)(\text{q}43\text{q}44)$, обхващащ 110,548,700 Kb и терминална дупликация в дългото рамо на 6 хромозома - $\text{dup}(6)(\text{q}25.3\text{q}27)$ с размер от 11,878,054 Kb (Фиг. 4 Н и О, Табл. 5):

arr 1q43q44(236,642,045-247,190,744)x1, 6q25.3q27(158,902,925-170,780,979)x3

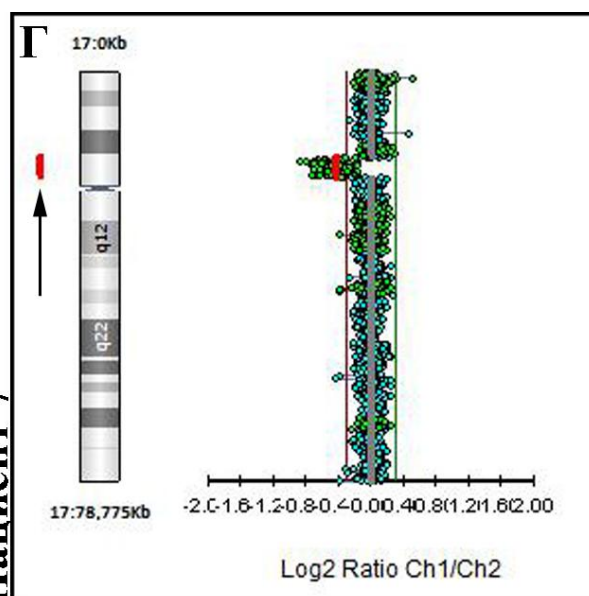


продължена

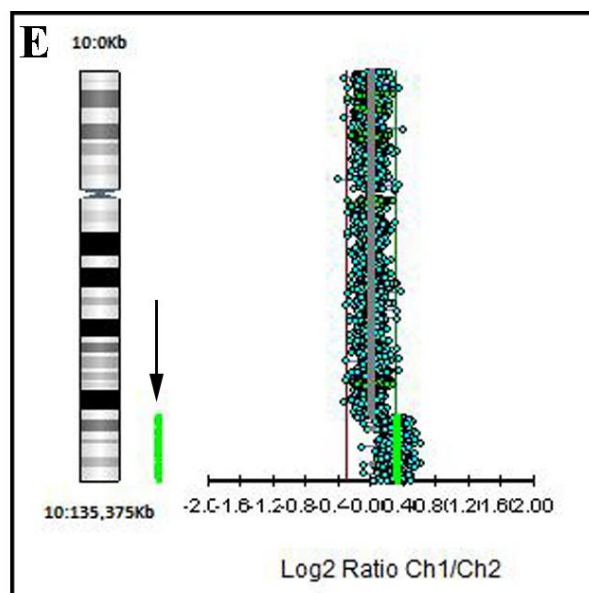
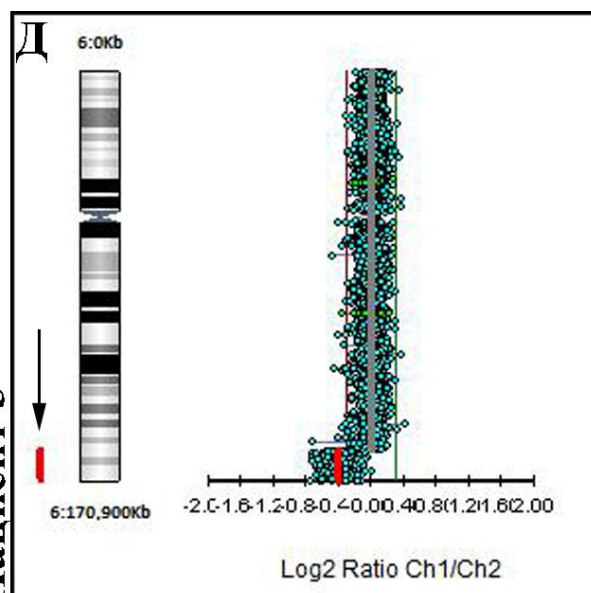
Пациент 2



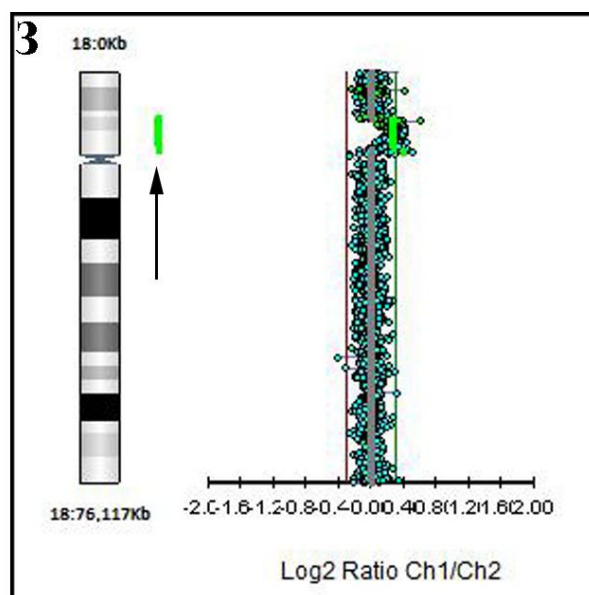
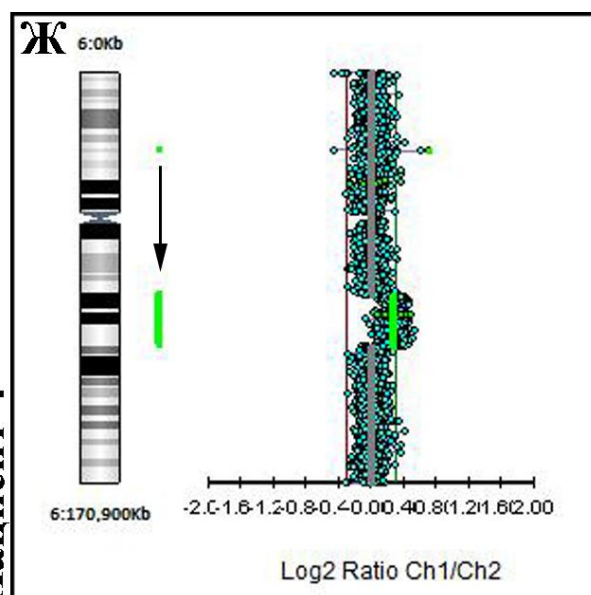
Пациент 7



Пациент 3

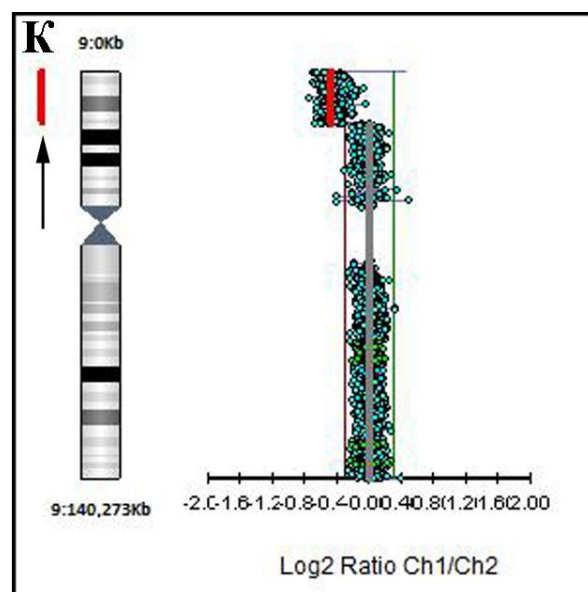
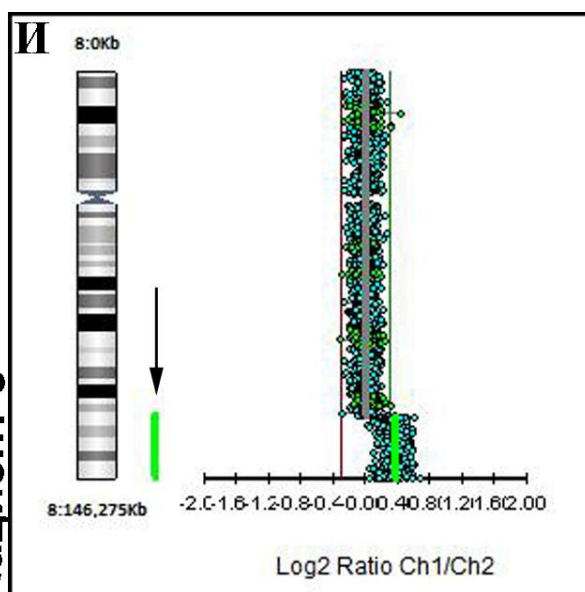


Пациент 4

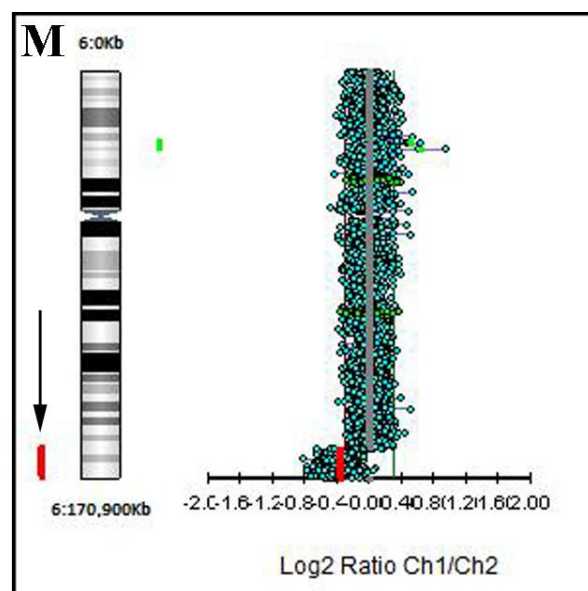
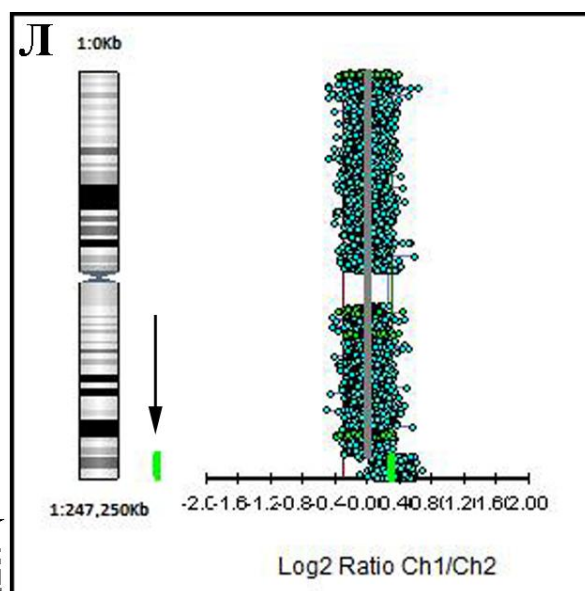


продължена

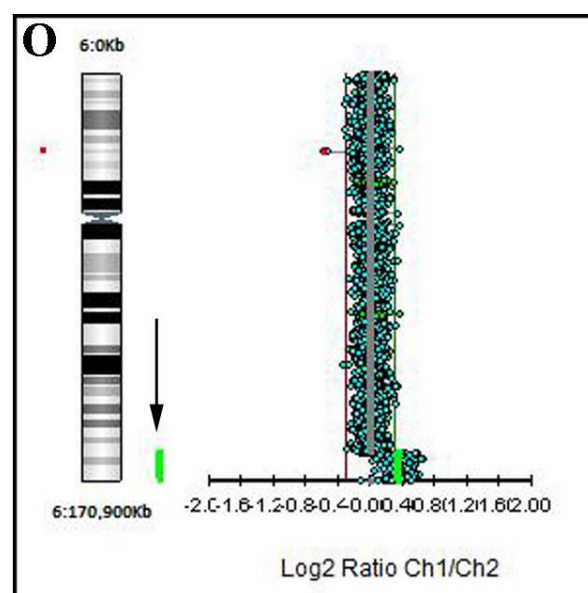
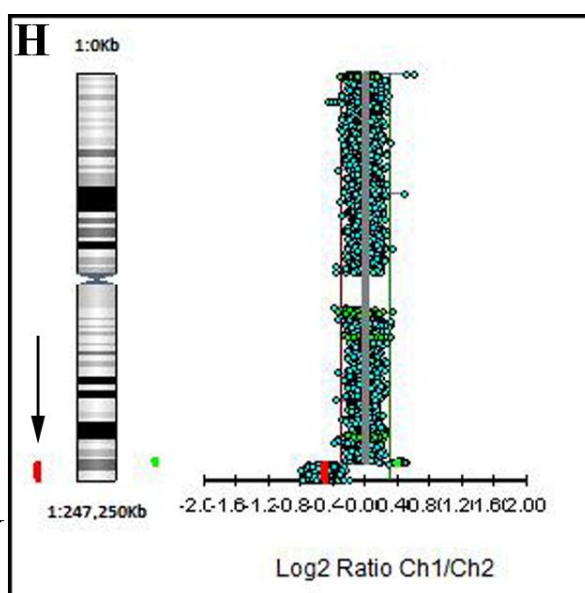
Пациент 5



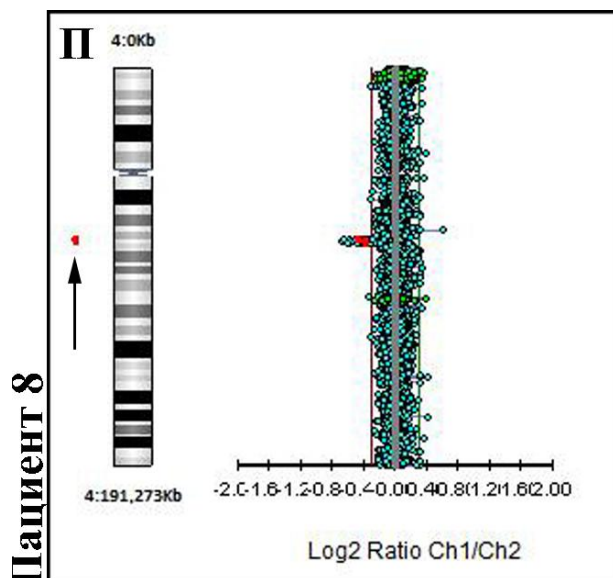
Пациент 6



Пациент 9



продължена



Фигура 4. Геномни профили на хромозомите с установени патологични CNVs.

Аберациите са показани със стрелки.

Пациент 1: А) Геномен профил на Пациент 1 за хромозома 4; Б) Геномен профил на Пациент 1 за хромозома 6 - стрелката показва дупликацията, маркирана в зелен цвят. **Пациент 2:** В) Геномен профил на Пациент 2 за хромозома 17, разкриващ $\text{dup}(17)(q24.2q25.2)$ с размер 10,773,752 bp. **Пациент 7:** Г) Геномен профил на Пациент 7 за хромозома 17. **Пациент 3:** Д) Геномен профил на Пациент 3 за хромозома 6, разкриващ $\text{del}(6)(q25.3q27)$ с размер 12,978,687 bp;

Е) Геномен профил на Пациент 3 за хромозома 10, разкриващ $\text{dup}(10)(q25.2q26.3)$ с размер 21,360,598 bp. **Пациент 4:** Ж) Геномен профил на Пациент 4 за хромозома 6, разкриващ $\text{dup}(6)(q16.1q21)$ с размер 21,333,134 bp; З) Геномен профил на Пациент 4 за хромозома 18, разкриващ $\text{dup}(18)(p11.22p11.22)$ с размер 5,479,842 bp. **Пациент 5:** И) Геномен профил на Пациент 5 за хромозома 8, разкриващ $\text{dup}(8)(q24.13q24.3)$ с размер 22,764,514 bp; К) Геномен профил на Пациент 5 за хромозома 9, разкриващ $\text{del}(9)(p24.3p22.2)$ с размер 18,023,617 bp. **Пациент 6:** Л) Геномен профил на Пациент 6 за хромозома 1, показващ дупликация в дългото рамо на 1-ва хромозома, визуализирана със зелен стълб; М) геномен профил на Пациент 6 за хромозома 6, разкриващ делецията в дългото й рамо (червен стълб). **Пациент 9:** Н) Геномен профил на Пациент 9 за хромозома 1, показващ делеция в дългото рамо на 1-ва хромозома, визуализирана с червен стълб; О) геномен профил на Пациент 9 за хромозома 6, разкриващ дупликация в дългото й рамо (зелен стълб). **Пациент 8:** П) Геномен профил на Пациент 8 за хромозома 4.

4.2. Нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение

В допълнение, освен патологични вариации, са открити нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение, наброяващи 232 вариации (средно по 4,5 вариации на пациент от общата група изследвани). Вариациите са разпределени върху всички хромозоми с изключение на хромозома 20, върху която при всички 52 пациента не се установяват CNVs. Върху 19 хромозома е открита само една нормална CNVs при Пациент 45 - дупликация с размер 253,274 bp: $\text{arr } 19q13.31(47952719-48205993)\times 3$. Всички останали хромозоми имат повече от една CNVs.

Размерите на установените варианти варират по размер от 16,554 bp до 1,662,782 bp. От тях 133 са делеции, съответно 104 с дуплициран генетичен материал. Най-голямата дупликация е с размер 1,662,782 bp, а най-малкият дуплициран сегмент включваше 16,554 bp. Регионът на най-малката делеция обхваща 31,66 bp, а размерът на най-голямата е 19,030,044 bp. в (9)(p11.1q12) региона: $\text{arr } 9p11.1q12(47002212-66032256)\times 1$.

От общия брой (232 - без патологичните) установени CNVs, 103 (44,3%) са с размер под 100 Kb, 92 (39,7%) - с размер 100 - 500 Kb, 21 (9%) -

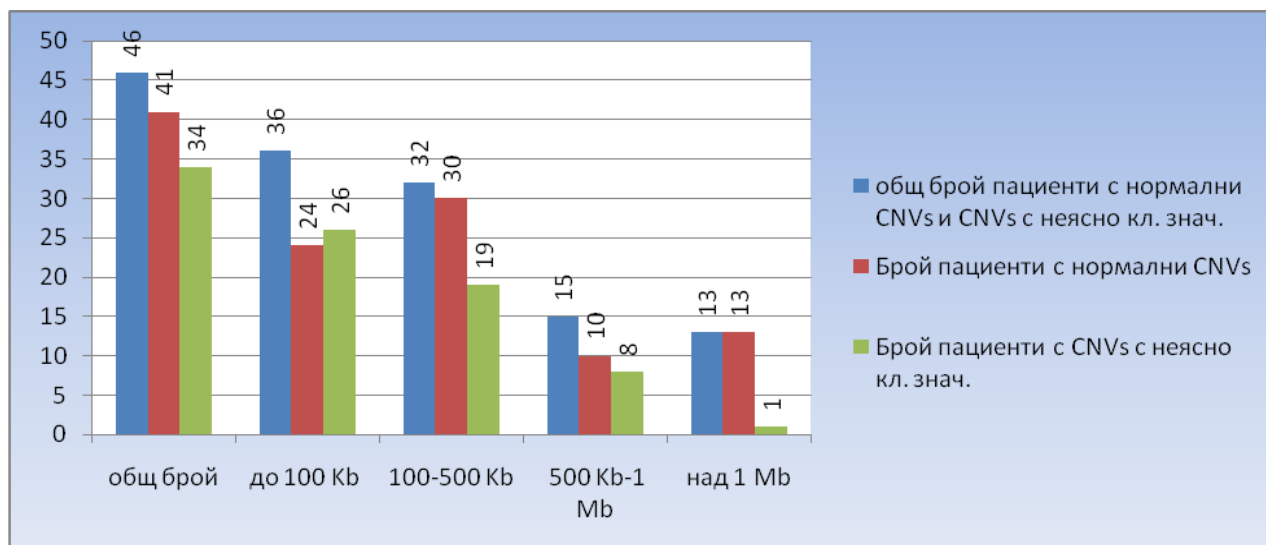
с размер 500 Kb - 1 Mb и 16 (7%) - с размер над 1 Mb. От тях 130 са делеции и 102 дупликации (Табл. 6).

С нормална природа са 124. Те са разпределени по размер както следва: 46 (37%) с размер под 100 Kb; 52 (42%) с размер 100 - 500 Kb; 11 (9%) с размер 500 Kb - 1 Mb; 15 (12%) с размер над 1 Mb. От тях 62 са дупликации и 62 делеции (Табл. 6).

Вариантите с неясно клинично значение наброяват 108, със следното разпределение по размер: 57 (52,8%) с размер под 100 Kb; 40 (37%) с размер 100-500 Kb; 10 (9,3%) с размер 500 Kb-1 Mb; 1 (0,9%) с размер над 1 Mb (Табл. 6).

Таблица 6. Брой и размери на установените нормални CNVs и CNVs неясно клинично значение.

	общ брой CNVs	до 100 Kb	100 - 500 Kb	500 Kb - 1 Mb	над 1 Mb
норм. CNVs + CNVs с неясно клин. знач.	232	103	92	21	16
нормални CNVs	124	46	52	11	15
CNVs с неясно кл. знач.	108	57	40	10	1



Фигура 5. Брой пациенти с нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение.

CNVs (без патологичните) са доказани при 88,5% (46 пациента) от изследваната група. При 36 лица от общата група са установени CNVs с размери до 100 Kb; при 32 лица, размерите на CNVs варират от 100 - 500 Kb; при 15 лица, CNVs са в границите 500 Kb - 1 Mb; при 13 лица са открити CNVs с размери над 1 Mb. Броят на пациентите надхвърля 52, тъй като при

голяма част от изследваните се намира комбинация от нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение. На Фигура 5 е показано разпределението по размери на нормалните CNVs и CNVs с неясно клинично значение и броят пациенти, при които са установени.

5. Молекулно-цитогенетичен анализ с FISH

Шестима от пациентите са изследвани със специфични FISH сонди за известни микроделеционни синдроми, тъй като имат добре разпознаваеми клинично характерни фенотипи. Две от момчетата са със съмнение за синдрома на Williams-Beuren, три момчета със съмнение за синдрома на Prader-Willi и едно момиче със съмнение за синдрома на Angelman. И при шестте случая FISH анализът установи делеция на специфичните за синдромите локуси:

46,XY, ish del 7q11.23(LSI ELNx1), 7q31(LSI D7S486, D7S522x2)

46,XY,ish del (15)(q11q13)(D15S10x1), 15p11.2(D15Z1x2), 15q22(PMLx2)

46,XX,ish del (15)(q11q13)(D15S10x1), 15p11.2(D15Z1x2), 15q22(PMLx2)

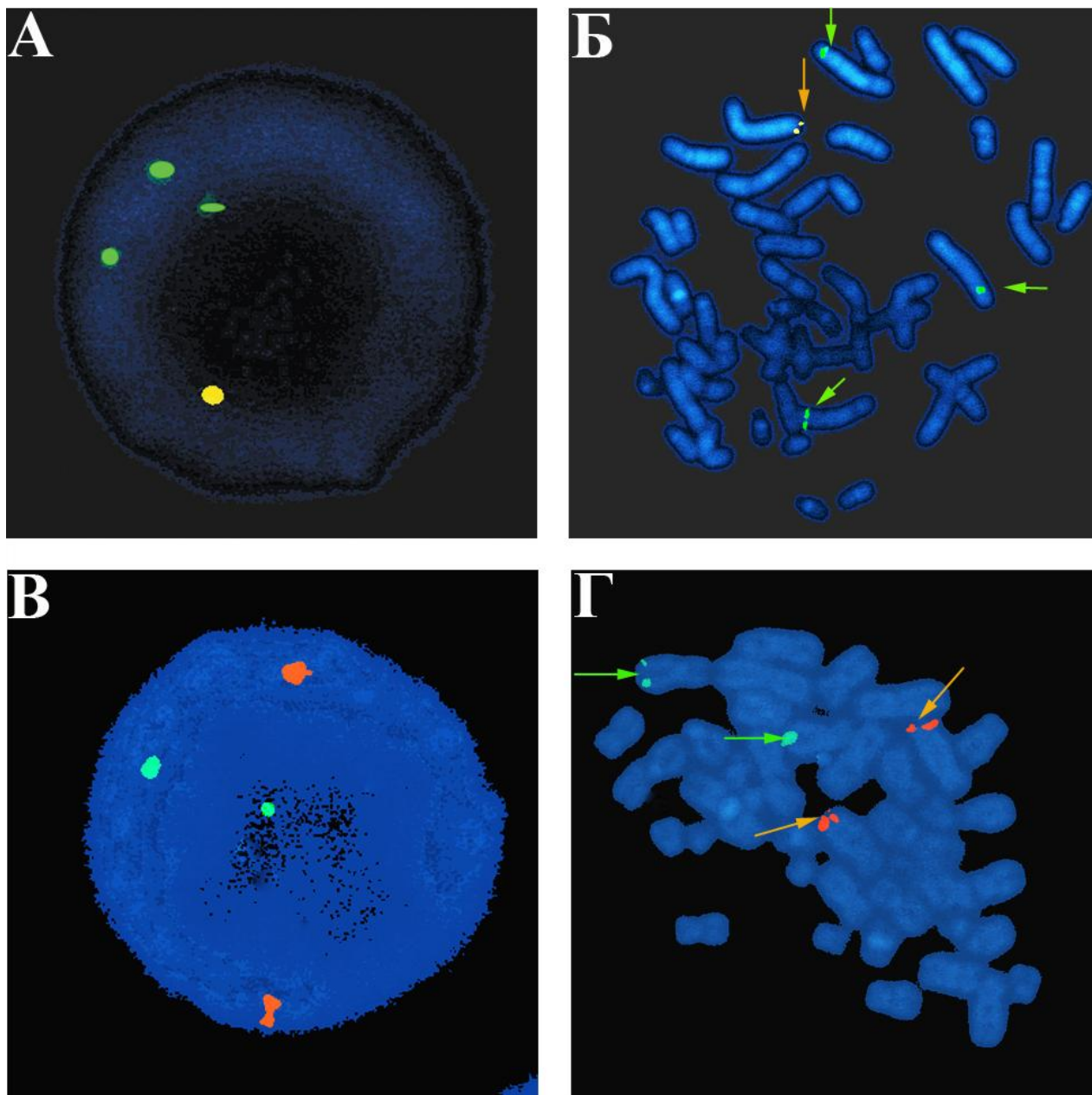
Всички пациенти с патологични находки, установени при молекулното кариотипиране, са допълнително анализирани с FISH метод. Резултатите от FISH анализа напълно потвърждават находките от микрочиповото изследване при всички изследвани пациенти. От базата данни на BlueFuse (BlueGnome, UK, Cambridge) са подбрани специфични потвърдителни BAC – клонове (Bacterial Artificial Chromosome - изкуствена бактериална хромозома), белязани със зелено (Spectrum Green - SG) или оранжево флуоресцентно багрило (Spectrum Orange - SO), за отделните геномни находки при пациентите. Допълнително за установяване на произхода и хромозомната локализация на геномните аберации е проведен FISH анализ и на родителите на Пациенти 1, 2, 5 и 9.

FISH анализът е извършен в Катедрата по Медицинска генетика, Медицински Университет – София.

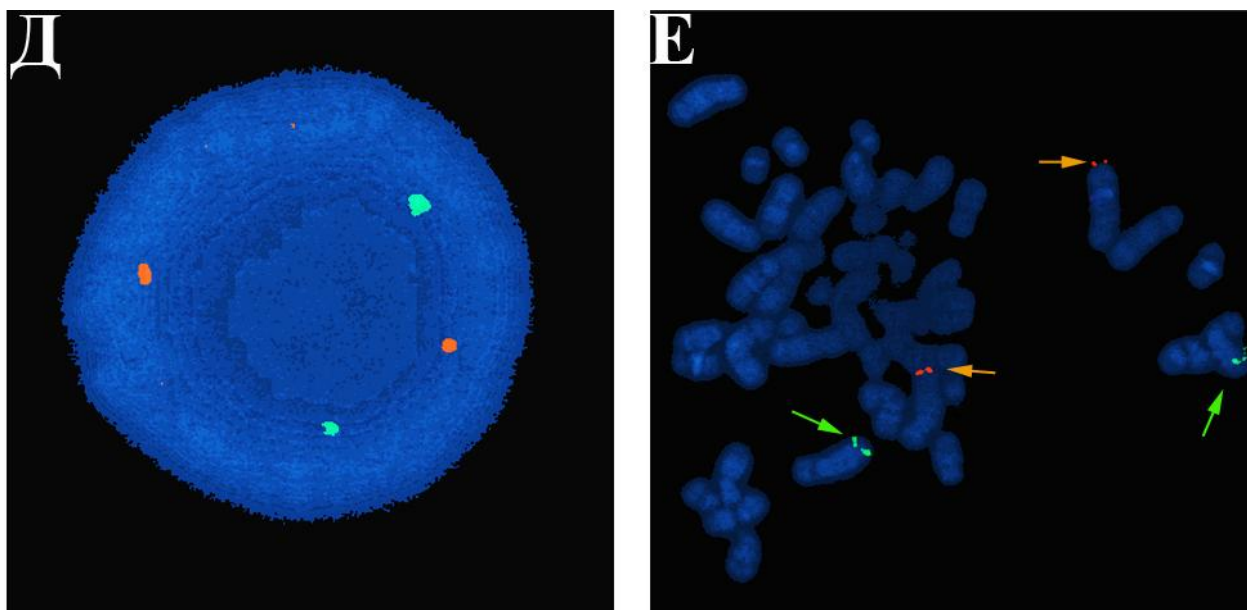
Казус 1 - FISH валидиране на патологичните вариации. За FISH анализа на Пациент 1 от базата данни на BlueFuse (BlueGnome, UK, Cambridge) са подбрани специфични потвърдителни BAC - клонове за находките в 4 и 6 хромозома, белязани съответно в SO за 4q35.1 района - RP11-45I20 и SG за 6q25.2 района. Във всички анализирани метафазни пластинки и интерфазни ядра е установено наличие само на един оранжев сигнал и по три зелени сигнала, свидетелстващо за дупликация в 6q25.2 локуса - ish 4q35.1 (RP11-45I20x1),6q25.2(RP11-289C14x3) (Фиг. 6 А и Б).

С цел проверка възможността да се касае за микропреустройство в някой от двамата родители и установяване произхода на микроаберациите е проведен FISH анализ и на двамата родители на пациентката (Фиг. 6 В, Г, Д и Е).

И при двамата родители са установени по два оранжеви сигнала от RP11-45I20 и по два зелени сигнала от RP11-289C14 - ish 4q35.1 (RP11-45I20x2),6q25.2(RP11-289C14x2). Прецизният анализ на DAPI II (4',6-diamidino-2-phenylindole - 4',6-диамидин-2-фенилиндол) -оцветените хромозоми показва, че оранжевите сигнали идват от хромозоми от група В, а зелените от хромозоми от група С. Като се вземе предвид и че кариотипът на двамата родители е нормален, категорично се доказва, че установените при пациентката патологични CNVs не са резултат от микроструктурно преустройство в някой от родителите ѝ.

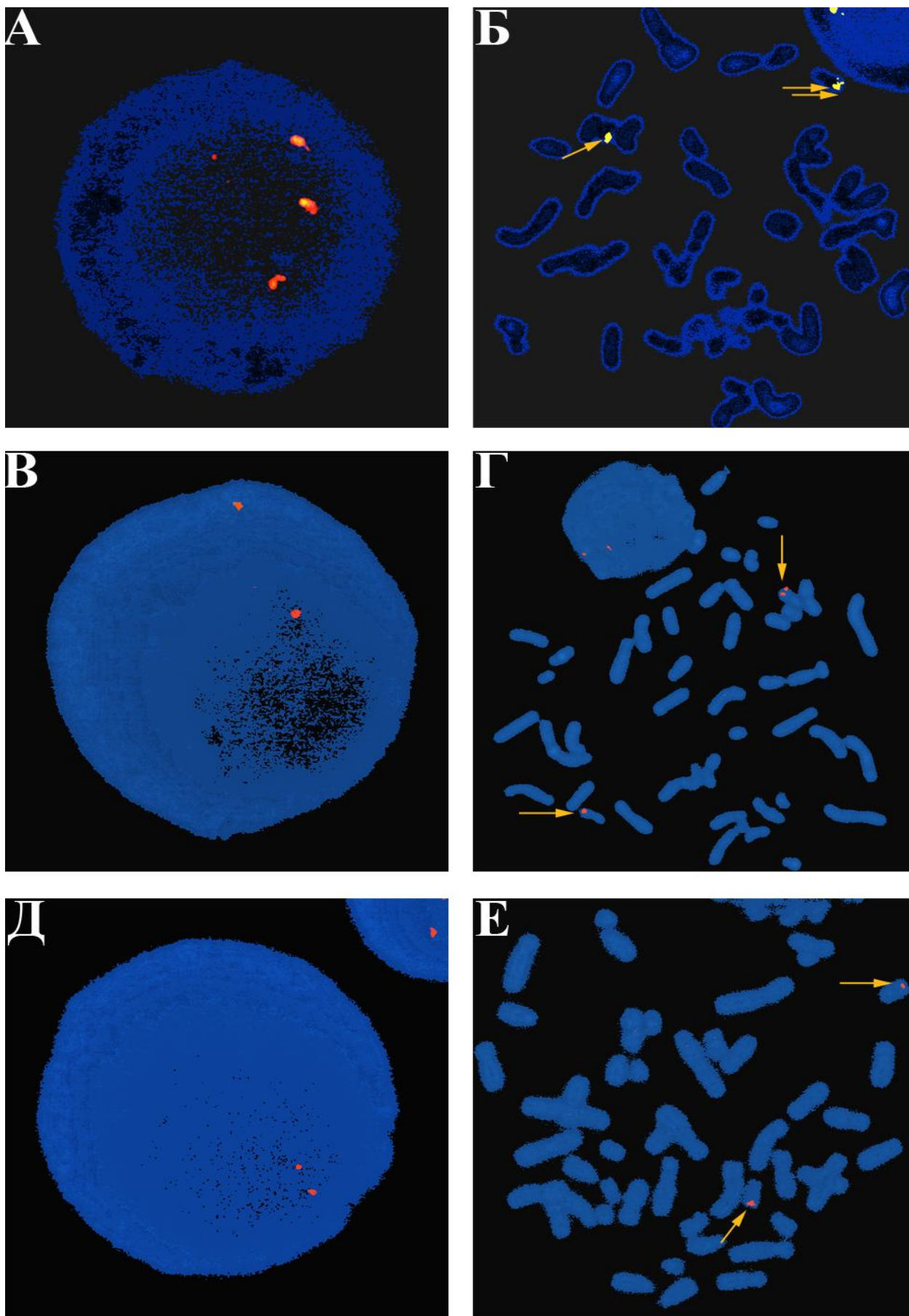


продължена



Фигура 6. FISH анализ на Пациент 1 и родителите. С оранжеви стрелки са показани сигналите от RP11-45I20 за 4q35.1 локуса, а със зелени стрелки сигналите от RP11-289C14 за 6q25.2 локуса: А) FISH анализ на интерфази от Пациент 1. Наблюдава се само един оранжев сигнал от RP11-45I20 - клона, показващо хетерозиготна делеция в 4q35.1 - локуса и по три зелени сигнала от RP11-289C14 - клона, посочващо дупликация на 6q25.2 района; Б) FISH анализ на метафазни хромозоми от Пациент 1. Наблюдава се само един оранжев сигнал от RP11-45I20 - клона, показващо хетерозиготна делеция в 4q35.1 - локуса (показан е с оранжевата стрелка) и по три зелени сигнала от RP11-289C14 - клона, посочващо дупликация на (6)(q25.1q25.3) района - показани са със зелените стрелки; В) Интерфазен FISH на майката; Г) Метафазен FISH на майката; Д) Интерфазен FISH на бащата; Е) Метафазен FISH на бащата.

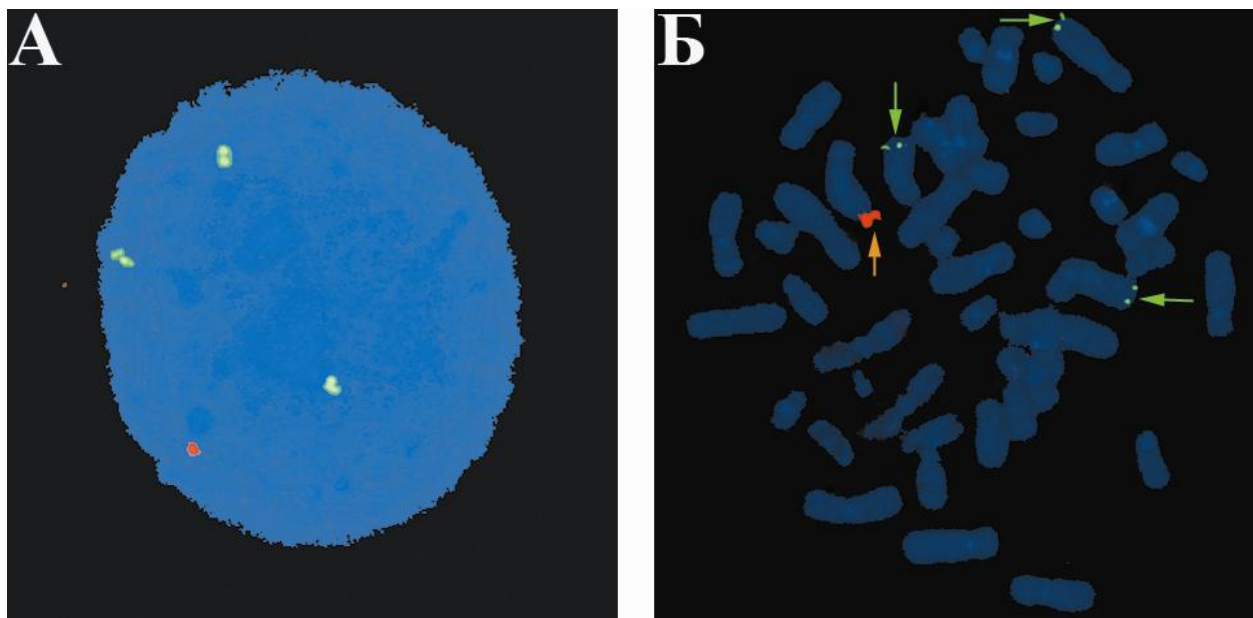
Казус 2 - FISH валидиране на патологичните вариации. При Пациент 2 за FISH валидирането на аберацията в 17 хромозома е избран специфичен потвърдителен BAC - клон, белязан с оранжево флуоресцентно багрило - RP11-94E7/SO, цитолента 17q24.2. Във всички анализирани интерфазни ядра са установени по три оранжеви сигнала, отговарящи на дупликация в 17q24.2 локуса - nuc ish 17q24.2 (RP11-94E7x3) (Фиг 7 А). При FISH анализа на метафазни пластинки оранжевият сигнал от дуплицирания район на 17 хромозома е визуализиран с двойно по-големи размери (Фиг. 7 Б). С цел проверка възможността да се касае за микропреустройство в някои от двамата родители и установяване произхода на микроаберациите е проведено FISH изследване и на родителите. FISH анализът показва следните резултати (Фиг. 7 В, Г, Д и Е): nuc ish 17q24.2 (RP11-94E7x2) - при майката на пациентката; nuc ish 17q24.2 (RP11-94E7x2) - при бащата на пациентката.



Фигура 7. FISH анализ на Пациент 2 и родителите. С оранжеви стрелки са по-

казани сигналите от RP11-94E7 клона. А). FISH анализ на интерфазни ядра от Пациент 2. Наблюдават се три оранжеви сигнала от RP11-94E7 - клона, показващо дупликация в 17q24.2 района; Б) FISH анализ на метафазни хромозоми от Пациент 2. Наблюдават се оранжевите сигнали от RP11-94E7 - клона, като единият, посочен с две оранжеви стрелки е с двойно по-големи размери; В) Интерфазен FISH на майката; Г) Метафазен FISH на майката; Д) Интерфазен FISH на бащата; Е) Метафазен FISH на бащата.

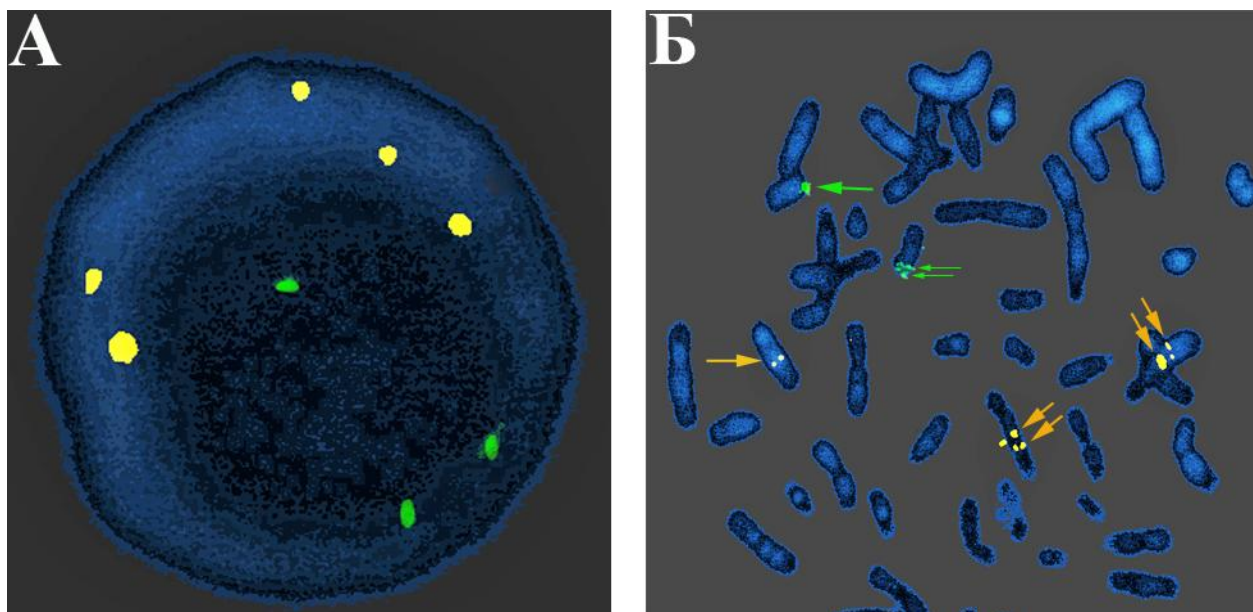
Казус 3 - FISH валидиране на патологичните вариации. За Пациент 3 от базата данни на BlueFuse (BlueGnome, UK, Cambridge) са подбрани потвърдителни BAC - сонди за делецията в 6-та хромозома - RP11-157L10/SO, локус 6q26 и RP11-62L18/SG, локус 10q25.2 за дупликацията в 10-та хромозома. Във всички анализирани метафазни пластинки и интерфазни ядра е установено наличие само на един оранжев сигнал - *nuc ish 6q26* (RP11-157L10x1), което показва хетерозиготна делеция в този локус и по 3 зелени сигнала от 10q25.2 - *nuc ish 10q25.2* (RP11-62L18x3), доказващо дупликация на района (Фиг. 8 А и Б).



Фигура 8. FISH анализ на Пациент 3. Наблюдава се само един оранжев сигнал от RP11-157L10 - клона и 3 зелени сигнала от RP11-62L18 - клона., показващо хетерозиготна делеция в 6q26– локуса. А) Интерфазен FISH; Б) Метафазен FISH.

За съжаление нямашме биологичен проби от родителите, което не позволи изследване на произхода на аберациите, както и хромозомното разпределение на геномните дисбаланси.

Казус 4 - FISH валидиране на патологичните вариации. За FISH валидирането на находката от микрочиповия анализ на Пациент 4 са подбрани специфични потвърдителни BAC - клонове за находките в 6 и 18 хромозома от региони без полиморфни CNVs - RP3-522O2/SO, локус 6q21 и RP11-94H14/SG, локус 18p11.21. Във всички анализирани интерфазни ядра са установени по пет оранжеви сигнала - *nuc ish 6q21* (RP3-522O2x5) и по три зелени сигнала - 18p11.21(RP11-94H14x3) (Фиг. 9 А).

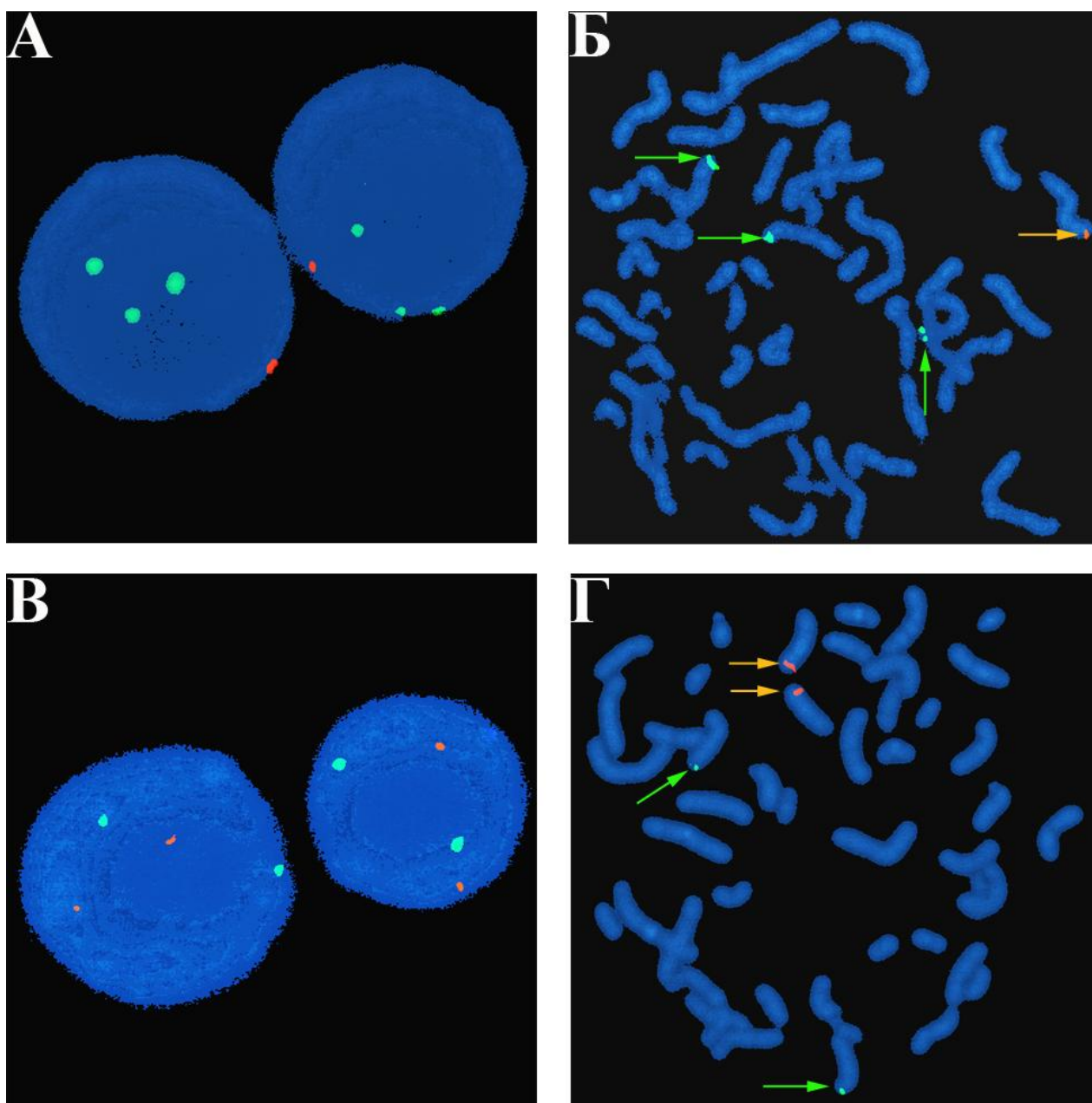


Фигура 9. FISH анализ на Пациент 4. А) Интефазен FISH; Б) Метафазен FISH.

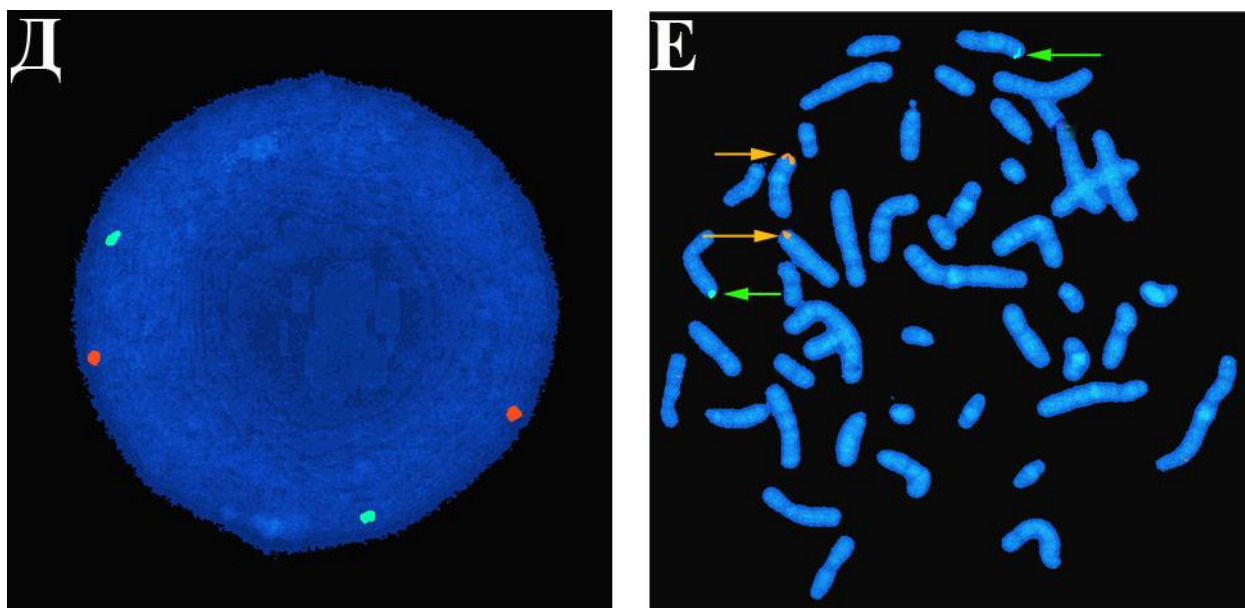
FISH анализът на метафазни пластинки показва, че 2 от допълнителните оранжеви сигнала от RP3-522O2 се дължат на крос хибридазация в късото рамо на 6-та хромозома. Петият оранжев сигнал е локализиран в хромозома от група D. Проведен е повторен цитогенетичен анализ, при което е установено, че между двете 15-ти хромозоми е налице хромозомен хетероморфизъм, като едната хромозома е със сравнително по-голям размер. Въз основа на това е допуснато, че допълнителния материал от дългото рамо на 6-та хромозома е инсертиран в 15-хромозома. Възможно е да се касае за унаследено от родителите в небалансиран вид микроструктурно хромозомно преустройство, но тъй като пациентът е от държавна институция, нямаше възможност за анализ на генетичен материал от родителите. На метафазни хромозоми допълнителният зелен сигнал от RP11-94H14 се намира върху р рамото на 18 хромозома, което показва, че се касае за дупликация на част от късото ѝ рамо и потвърди находката от цитогенетичния анализ (Фиг. 9 Б).

Казус 5 - FISH валидиране на патологичните вариации. FISH анализът на Пациент 5 потвърждава находката от микрочиповия анализ. Подбрани са локус - специфични потвърдителни BAC - клонове: RP11-346A14, белязан със зелено флуоресцентно багрило, локус 8q24.23 и RP11-527D15, белязан с оранжево флуоресцентно багрило, локус 9p23. Във всички анализирани метафазни пластинки и интерфазни ядра са установени 3 зелени сигнала, отговарящи на RP11-346A14 - клон от 8q24 локуса и един оранжев сигнал - nuc ish 9p23(RP11-527D15x1), което показва хетерозиготна делеция в този локус (Фиг. 10 А и Б).

За уточняване на произхода на патологичните CNVs е направен FISH анализ на родителите на пациента. Тъй като RP11-527D15 BAC - клонът се намира в зона на CNVs с докладвани полиморфни делеции в този район, е важно родителите да се изследват със същия BAC - клон, за да се отхвърли евентуален полиморфизъм при пациента. FISH анализът и при двамата родители с RP11-346A14/SG и RP11-527D15/SO показва наличие на 2 оранжеви и 2 зелени сигнала във всички отчетени метафази и интерфази - *puc ish 8q24(RP11-346A14x3), 9p23 (RP11-527D15x1)[100]* (Фиг. 10 В, Г, Д и Е).

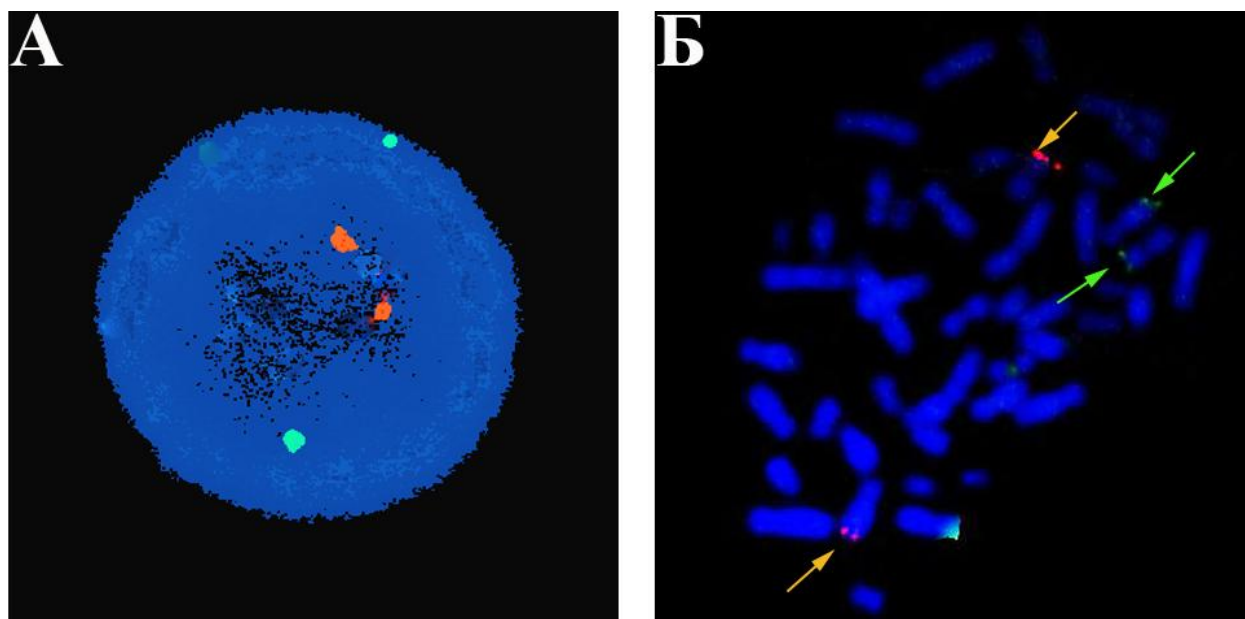


продължена



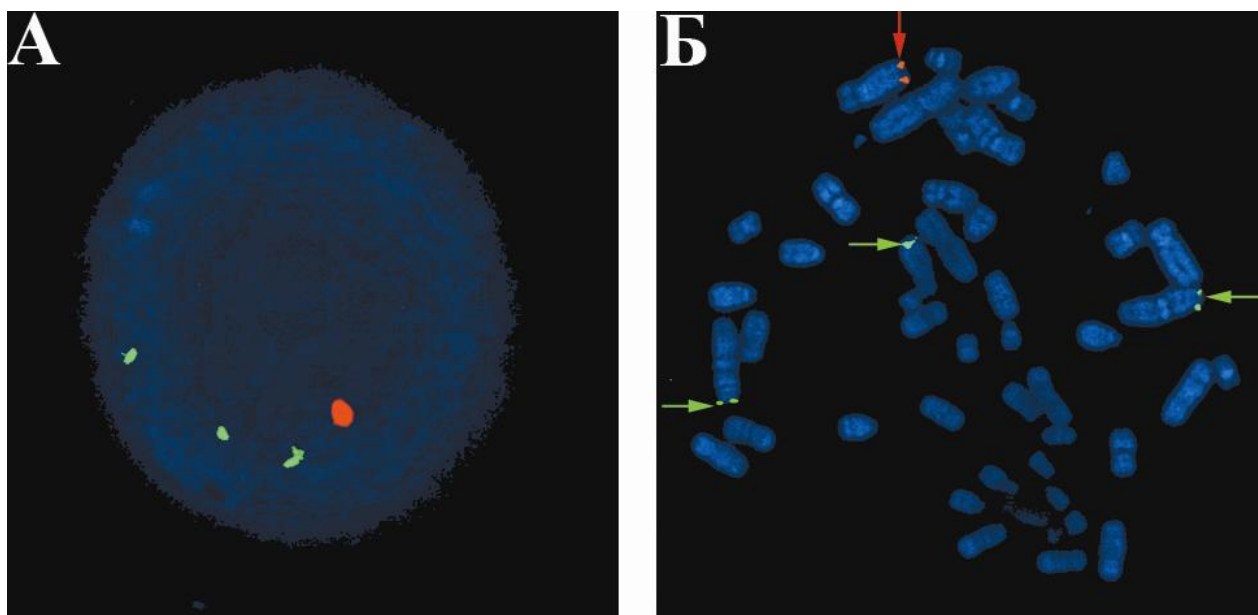
Фигура 10. FISH анализ на Пациент 5 и родителите. Със зелена стрелка са показани сигналите от RP11-346A14 за 8q24, а с оранжева стрелка сигналите от RP11-527D15 за 9p23 цитолентата: А) Интерфазен FISH анализ на пробанда; Б) Метафазен FISH на пробанда; В) Интерфазен FISH на бащата; Г) Метафазен FISH на бащата; Д) Интерфазен FISH анализ на майката; Е) Метафазен FISH на майката.

Пробандът има по-голяма сестра на 12 години. На семейството е предложено да се изследва хромозомния статус на сибса на пробанда. Проведеният цитогенетичен анализ показва, че пациентката е унаследила дериватната хромозома от баща си. Направеният FISH анализ със същите ВАС - сонди на сибса показва нормален брой сигнали и от двата локуса (Фиг. 11 А и Б).



Фигура 11. FISH анализ на сестрата на Пациент 5. Навсякъде се установиха по 2 зелени и 2 оранжеви сигнала.: А) Интерфазен FISH; Б) Метафазен FISH.

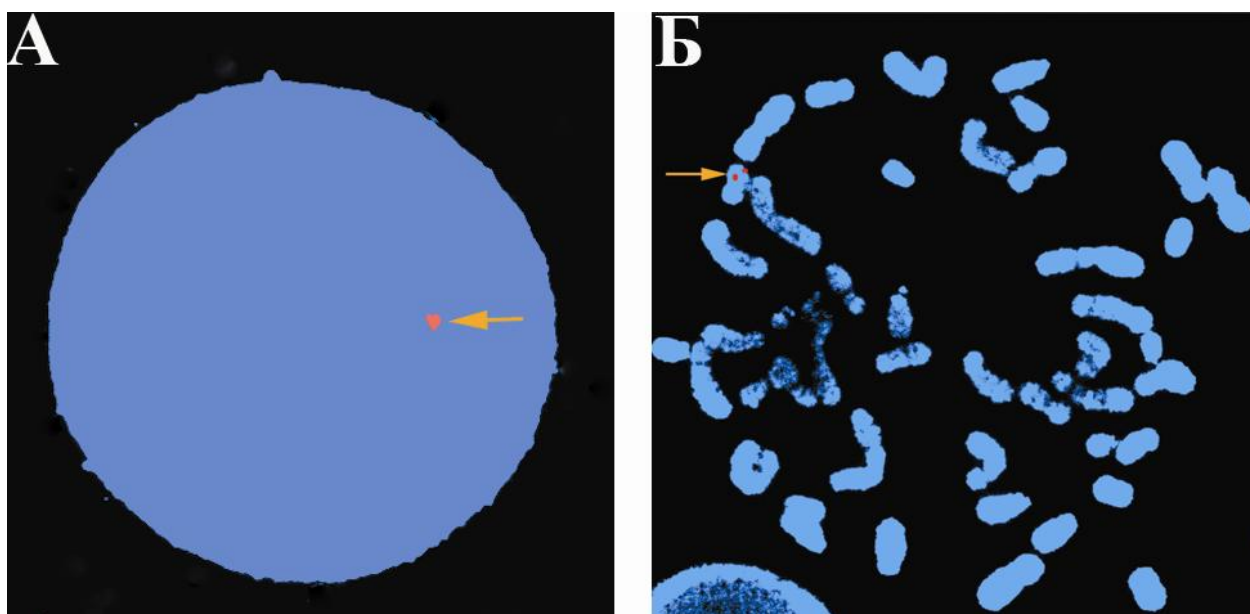
Казус 6 - FISH валидиране на патологичните вариации. FISH анализът на Пациент 6 потвърждава резултатите от молекулното кариотипиране. Използвани са BAC - клонове: RP11-99F4/SG с хромозомна позиция 1q43 и RP11-157L10/SO с хромозомен локус 6q26 (Фиг. 12 А и Б). Във всички анализирани интерфази и метафази са установени по 3 зелени сигнала и по един оранжев сигнал: ish 1q43(RP11-99F4x3), 6q26(RP11-157L10x1).



Фигура 12. FISH анализ на Пациент 6. Отчетливо се виждат 3 зелени и един оранжев сигнал - със зелени стрелки са показани сигналите от RP11-99F4 от 1q43, а с червена стрелка сигнала от RP11-157L10 от 6q26 цитолентата.: А) Интерфазен FISH; Б) Метафазен FISH.

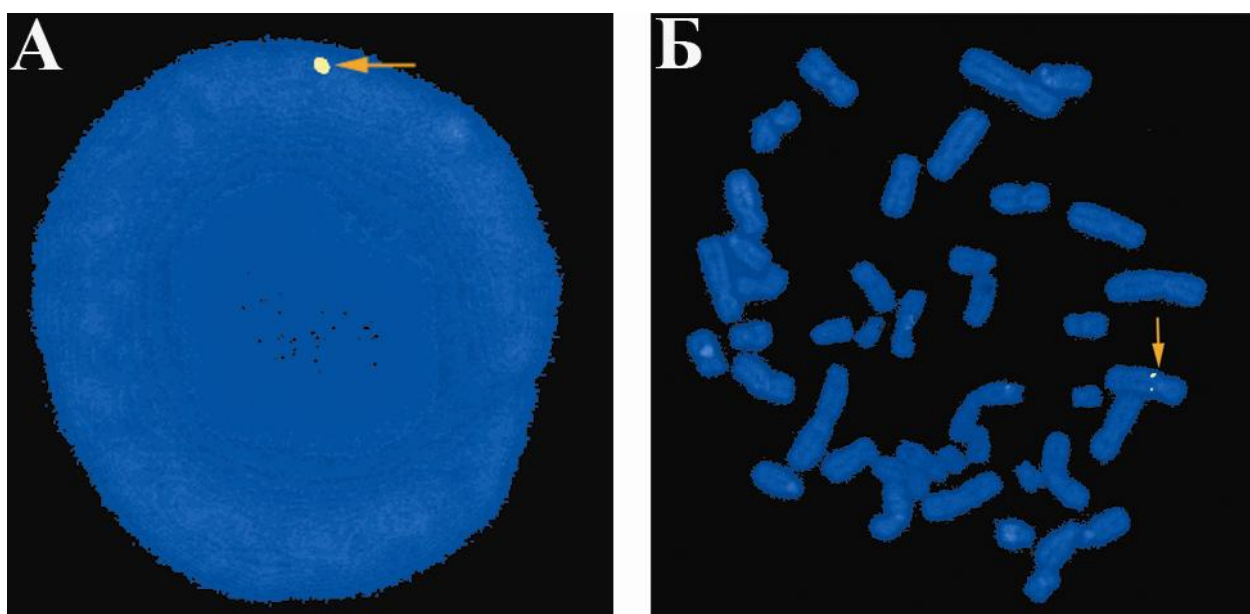
При Пациент 6 нямаше възможност за анализ на родителите, поради което не може да се отхвърли възможността да се касае за фамилна реципрочна транслокация между 1 - ва и 6 - та хромозома.

Казус 7 - FISH валидиране на патологичните вариации. При Пациент 7 за провеждането на FISH валидирането на находката в 17 хромозома е подбран специфичен BAC - клон RP11-384M20, белязан в spectrum orange. Във всички анализирани метафазни пластинки и интерфазни ядра е установен един оранжев сигнал - ish 17p11.2 (RP11-384M20x1), (Фиг. 13 А и Б).



Фигура 13. FISH анализ на Пациент 7. Наблюдава се само един оранжев сигнал от RP11-384M20 - клона, потвърждаващо хетерозиготна делеция в 17p11.2 - локуса. Сигналите са посочени със стрелки: А) Интерфазен FISH; Б) Метафазен FISH.

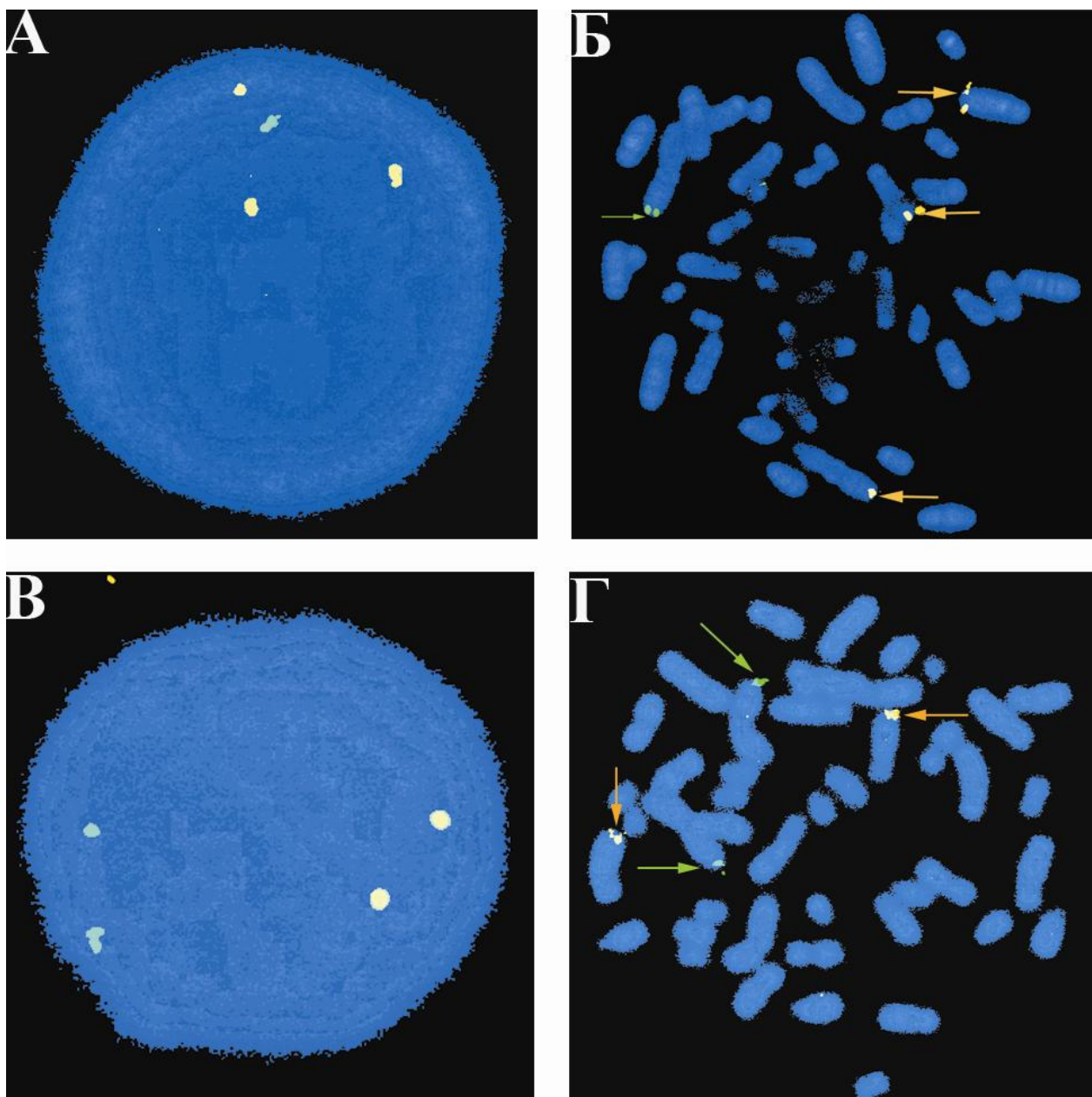
Казус 8 - FISH валидиране на патологичните вариации. При Пациент 8 проведеният FISH анализ с RP11-45I20, белязан в spectrum orange показва наличие само на един оранжев сигнал - ish 4q35.1 (RP11-45I20x1), което потвърждава резултата от молекулното кариотипиране (Фиг. 14 А и Б).

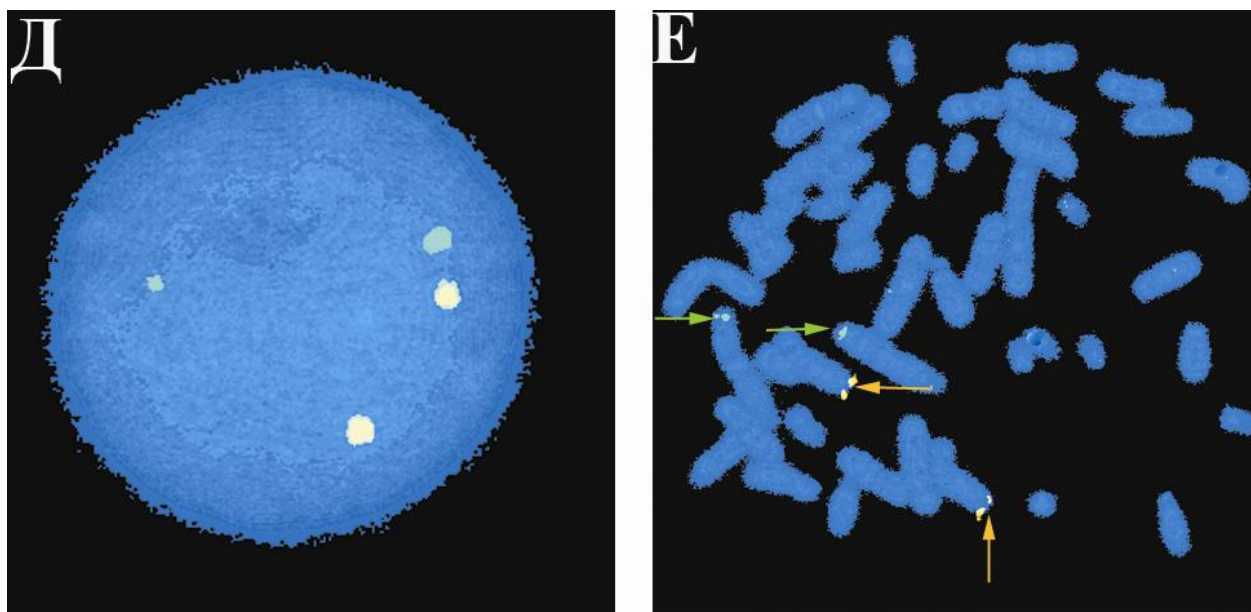


Фигура 14. FISH анализ на Пациент 8. Сигналите са посочени със стрелки - наблюдава се само един оранжев сигнал от RP11-95L12 - клона, потвърждаващо хетерозиготна делеция в 4q21.22 - локуса.: А) Интерфазен FISH и Б) Метафазен FISH.

Казус 9 - FISH валидиране на патологичните вариации. При Пациент 9 за FISH анализ са подбрани локус - специфични потвърдителни BAC - клонове: RP11-99F4/SG с хромозомна позиция 1q43 и RP11-157L10/SO с хромозомен локус 6q26 (Фиг. 15 А и Б). Във всички анализирани интерфази и метафази са установени по един зелен сигнал и по 3 оранжеви сигнала: ish 1q43(RP11-99F4x1), 6q26(RP11-157L10x3).

Проведеният FISH анализ на родителите на Пациент 9 показва по два зелени сигнала от RP11-99F4 и по два оранжеви сигнала от RP11-157L10 - ish 1q43(RP11-99F4x2), 6q26(RP11-157L10x2). Прецизният анализ на DAPI-оцветените хромозоми показва, че зелените сигнали идват от хромозома 1, а оранжевите от хромозома от група C, което категорично се доказва, че установените при пациентката патологични CNVs не са резултат от микроструктурно преустройство в някой от родителите ѝ (Фиг. 15 В, Г, Д и Е).





Фигура 15. FISH анализ на Пациент 9 и родителите. Със зелени стрелки са показани сигналите от RP11-99F4 за 1q43, а с оранжеви стрелки сигналите от RP11-157L10 за 6q26 цитолентата: А) Интерфазен FISH анализ на пробанда; Б) Метафазен FISH на пробанда; В) Интерфазен FISH на бащата; Г) Метафазен FISH на бащата; Д) Интерфазен FISH на майката; Е) Метафазен FISH на майката.

6. Клинични фенотипи на пациентите с установени патологични CNVs

По-долу са описани клиничните фенотипи и първичната информация, получена от анамнезата на пациентите с установени патологични геномни преустройства (Пациенти 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9). При състояния на множествени аномалии или дисморфичен фенотип е извършвана справка чрез софтуерна дисморфологична програма Oxford Medical Database: London Dysmorphology Database, version 2.10, както и са използвани допълнителни интернет източници като OMIM.

Казус 1 - клиничен фенотип. Касае се за момиче на 2 год. и 2 мес. със задръжка в психо-моторното развитие, родено от четвърта патологична бременност 12 дни преди определения термин, с тегло 2200 g и ръст 49 cm. Първите три бременности са завършили със спонтанен аборт. След раждането са установени малформативни стигми и генерализирана хипотония. На двумесечна възраст е установен персистиращ артериален канал и хипертрофия на двете камери, която намалява след затваряне на дуктуса. Направените до момента изследвания: лактат, бета-галактозидаза, алфа-глюкозидаза - не показват отклонения. При изследване на мтДНК (митохондриална ДНК) е установена ins T3159, като не е известно значението на тази замяна върху митохондриалната функция - най-вероятно става въпрос за нормален вариант. Описана е лицева дисморфия: микроретрогнатия, депресия в основата на носа, къс филтрум, обърнати

надолу устни ъгли, коси очни цепки, птоза, хипертелоризъм, преаурикуларна висулка в дясно, раздалечени, ниско поставени мамили. Дихателна система - без особености. ССС (сърдечно-съдова система) - протомезосистолен шум 2/6 степен. Корем над нивото на гръдния кош, без органомегалия. Крайници: двустранна четирипръстна бразда, клинодактилия на стъпалата, разширени терминални фаланги на длани и стъпала, проминиращи възглавнички на пръстите на ръцете и генерализирана мускулна хипотония. Въз основа на наблюдаваната симптоматика е поставена работна диагноза Kabuki make-up синдром (Фиг. 16).



Фигура 16. Клиничен фенотип на Пациент 1. Наблюдава се лицев дисморфизъм, преаурикуларна висулка, четирипръстна бразда.

Казус 2 - клиничен фенотип. Пациентът е момиче на 6 месечна възраст, родено от първа бременност на 17 годишна майка, фамилно обременено по бащина линия с аномалии на крайниците. Детето е родено с шестпръстие на ръцете и краката, високо небце и протрахирана жълтеница. Налице е лицев дисморфизъм с микроцефална конфигурация на главата, изпъкване на окципиталната част, хипертелоризъм, високо небце, по-голяма дясна буза, ниско разположени ушни миди. Налице е двустранна хексадактилия за сметка на допълнителни фалангеални кости, синдактилично свързани с 5-ти пръст. Описано е тежко изоставане в психомоторното развитие. Поставена е работна диагноза синдром на Смит-Лемли-Опитц.

Казус 3 - клиничен фенотип. Третият пациент е момиче, родено от III-та патологично протекла бременност (първата е завършила със спонтанен аборт в първи триместър), родено по естествен механизъм, в средно депресивно състояние. Тегло при раждането 3400 g, ръст 51 cm. След раждането са установени множество малформативни стигми. На 10 дневна възраст е диагностицирана ВСМ - дясна камера с двоен изход, клапна и подклапна пулмонална стеноза, декстропозиция на големите артерии. Плагиоцефалия с къса шия и ниско окосмяване. Дисморфичен фациес: хипертелоризъм, епикант, антимонголоидни очни цепки, микрофталмия, малки, диспластични, ротирани назад ушни миди, високо небце. Хипоплазия на корпус калозум. Лошо подредени пръсти на ръцете (II-ри и V-ти препокриват III-ти и IV-ти) и краката, четирипръстна бразда в ляво, затруднена екстензия на II-ри и III-ти пръст на двете ръце (Фиг. 17). Психологично изследване: задръжка в психо-моторното развитие и КоР = 28. Въз основа на наблюдаваната симптоматика е поставена работна диагноза синдром на Едуардс.



продължена



Фигура 17. Клиничен фенотип на Пациент 3. Наблюдава се отчетлив лицев дисморфизъм, диспластични ротираны назад уши.

Казус 4 - клиничен фенотип. Касае се за момче на 1 год. и 3 мес., родено на термин от нормално протекла бременност. След 10 месечна възраст е забелязано изоставане в моторното развитие и нервно - психичното развитие. Налице е обременена фамилна анамнеза - брат на майката с хейлопалатосхизис. Описани са следните дисморфични стигми: асиметрия на лицето и главата - проминираща дясна половина; хипертелоризъм, епикант; депресия на основата на носа; диспластични уши, високо небце; къса шия; разширена долна апертура на гръдния кош; двустранна четирипръстна бразда; микроцефалия (Фиг. 18).



Фигура 18. Клиничен фенотип на Пациент 6.

Казус 5 - клиничен фенотип. Касае се за момче на 2 год. с тежко изоставане в нервно-психическото развитие, родено на термин от патологично протекла бременност (кървене в III лунарен месец) по оперативен път поради неефективни контракции, с тегло 3850 g и ръст 52 cm. Първата бременност е завършила със спонтанен аборт във втори лунарен месец. Установени са множество малформативни стигми и умерена генерализирана хипотония: омфалоцеле; сърдечен дефект; лицев дисморфизъм (долихоцефалия с проминаращ фронтален ръб, краниосиностоза, косо разположени очни цепки, къс нос с топчест връх, високо небце, дълъг филтрум с две бразди, микроретрогнатия, ниско разположени ушни миди с проминаращ хеликс), високо имплантирани палци на ръцете, непълни четирипръстни бразди двустранно, палци-чукче на краката, пес еквиноварус, хипоспадия с крипторхизъм в хипопластичен скротум. Въз основа на наблюдаваната симптоматика е поставена работна диагноза синдром на вродени аномалии с предимно засягане на лицевата област (Фиг. 19).



Фигура 19. Клиничен фенотип на Пациент 5.

Казус 6 - клиничен фенотип. Касае се за момиче на 14 месеца, родено на термин от нормално протекла бременност. След раждането е установен лицев дисморфизъм и атрезия на дясна хоана. От третия месец са започнали пристъпи на втрещване на погледа и гърчове (миоклонии или клонуси) на крайниците. Установено е изоставане в нервно-психичното развитие и наличие на множество малформативни стигми. От статуса: микроцефалия, хипоплазия на корпус калозум, разширена цистерна

церебеломедуларис, къс филтрум, горна устна с форма на обърнато V, високо небце, широки алвеоларни израстъци, антимонголоидни очни цепки, особено разположение на косата в челната област, ниско разположени уши, заострена дясна ушна мида, дистално изтънени пръсти (Фиг. 20).



Фигура 20. Клиничен фенотип на Пациент 6.

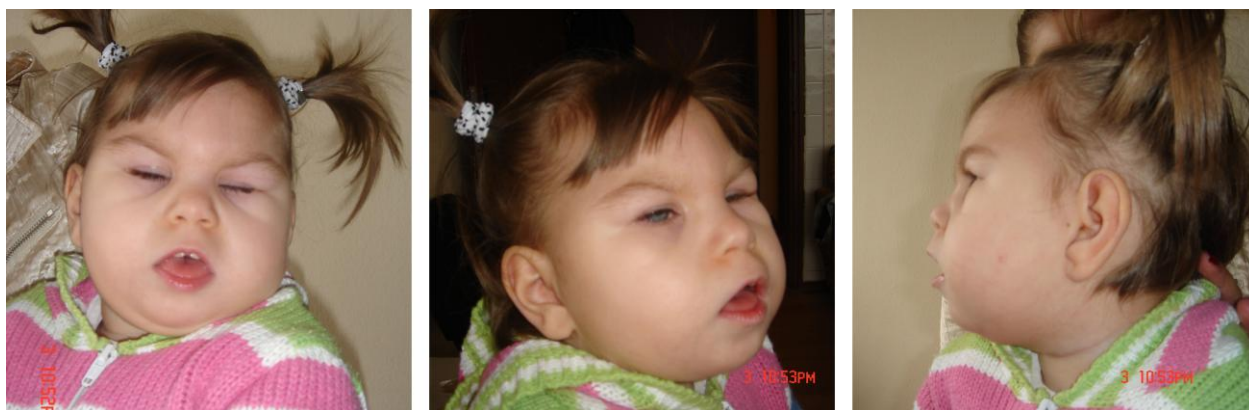
Казус 7 - клиничен фенотип. Пациентът е момиче на 12 години, родено от първа нормално протекла бременност, завършила с раждане на термин по нормален път, с тегло 2800 g и ръст 48 cm. На 4 месечна възраст са забелязани множество малформативни стигми. Чрез трансфонтанелна ехография е установена лека дилатация на латералните вентрикули. От неврологичния статус, проведената ЕЕГ (електроенцефалограма) показва доминиращи тета ритми и оскъдни алфа ритми. Установено е изоставане в нервно-психичното развитие - проговаря на 5-6 год. възраст Изчислен е коефициент на интелигентност $IQ = 50$. Проявява агресия и автоагресия. При пациентката се наблюдават тикове с изместване на главата и отвеждане на очите, съчетани с повдигане на ръцете. Описан е лицев дисморфизъм: широко лице, дълъг проминиращ филтрум, обърнати надолу устни ъгли, хипертелоризъм, ниско разположени латерални очни ъгли, диспластични ниско разположени ушни миди, къса шия. Физикалният преглед на кожата разкрива хиперпигментно петно на предна коремна стена с размери 6 на 2 cm. Дихателната система и ССС са без особености. От опорно-двигателната система е набелязана шийна и по-изразена гръдна кифоза; високо имплантирани палци на ръцете, клинодактилия, къси ахилесови сухожилия.

Казус 8 - клиничен фенотип. Касае за момче на 5 год. и 5 мес. с изоставане в нервно-психичното и физическото развитие, родено от първа нормално протекла бременност, завършила с преждевременно раждане в

32-33 г.с. (гестационна седмица) по нормален път. При раждането си детето е било с тегло 2260 g и ръст от 45 cm. На 1 год. и 4 мес. е поставена диагноза ДЦП (детска церебрална парализа) - тежка форма с двигателен дефицит. На 1 год. и 8 мес. е установена двустранна проводна и невросензорна глухота. Прохожда на 5 години с нестабилна походка. Изговаря единични думи и срички и е определен коефициент на интелигентност IQ=44. Установено е изоставане в костната възраст, отговаряща на 2 год., с дисхармонична структура. Ехографията на щитовидната жлеза показва петниста хипоехогенност. Пациентът проявява признаци на хиперактивност и неспокойство, но проведената ЕЕГ не установява огнищна или пароксизмална активност. При изследване на мтДНК са установени следните полиморфизми: T9070G, T4811G, T5999C, A6047G, A6146G и C7028T. Проведен е FISH анализ за синдрома на Ангелман, който отхвърля наличието на делеция в 15q11 локуса. Установени са следните дисморфични стигми: долихоцефалия с релативна мегацефалия, ретрогнатия, обърнати надолу устни ъгли, микростомия, коси очни цепки, рядко поставени зъби. Крайници - брахидактилия и петопръстна клинодактилия, лошо подредени пръсти на краката, разширени терминални фаланги на горни и долни крайници. Костен скелет с торако-лумбална кифоза. Пикочо-полова система - асансьорен тестис вляво. Дихателна система - без особености, ССС - ритмична сърдечна дейност, сърдечна честота 98/min, ясни тонове, без шумова находка. От неврологичния статус - спастична диплегия, живи сухожилни рефлексии, с разширени рефлексогенни зони на долни крайници, положителен рефлекс на Бабински двустранно, извършва стереотипни движения с ръцете. Въз основа на наблюдаваната симптоматика е поставена работна диагноза синдром на вродени аномалии, свързани с нисък ръст.

Казус 9 - клиничен фенотип. Касае за момиче на 2 год. и 5 мес. възраст, родено от първа патологично протекла бременност (кървене в IV тр.кв., родоразрешена оперативно поради напречно предлежание на плода. Детето е родено 1 месец преждевременно с тегло 2200 g и дължина 42 cm. Още пренатално ехографски е установена вътрешна хидроцефалия. След раждането детето е наддало добре на тегло и ръст. Установени са вродени малформации - микроцефалия, хидроцефалия, агенезия на корпус калозум и дилатация на двата латерални и третия вентрикул с по-изразени промени в областта на окципиталните рога на латералните вентрикули. Детето е с долихоцефална конфигурация на главата с проминиращ фронтален ръб. Описан са дисморфични стигми - коси очни цепки, двустранен епикант,

гладък дълъг филтрум, ниско разположени уши, лошо подредени зъби, високо небце, лошо подредени пръсти на краката - вторият покрива третия, пъп разположен по средата на корема (Фиг. 21). Не са установени патологични промени във вътрешните органи. На базата на мозъчната аномалия детето проявява неврологична симптоматика - получава гърчове и епилептични припадъци. Проведената ЕЕГ показва умерено абнормен запис - дифузно по-бавна основна активност по време на сън, чести сънни вретена с доминиране в лявата хемисфера, в отделни случаи се наблюдават единични остри вълни. Установена е двустранна глухота.



Фигура 21. Клиничен фенотип на Пациент 9.

7. Сравняване възможностите на 2 различни микрочипови платформи - ВАС - чипове срещу олиго - микрочипове

В дисертационния труд са сравнени капацитетите на 2 чипови платформи за откриване на субмикроскопски вариации в броя копия, включващи делеции и дупликации. Сравняването на 2-те платформи е направено с ДНК от 6-ма пациенти (Пациенти 1, 2, 3, 4, 5, и 6), изследвани последователно с ВАС-чипова и олиго-чипова платформа. В почти всички случаи е установено несъвпадение между резултатите от ВАС - и олиго-микрочиповата платформа. С ВАС платформата са детектирани геномни дисбаланси с размери от 2,564,097 bp до 11,410,676 bp, съответно с олиго-платформата от 3,615,123 bp to 22,764,514 bp.

Изследваните пациенти са с установени и валидирани с FISH патологични промени в броя копия. В таблица 7 са обобщени установените от двете платформи патологични вариации в броя копия, като са показани стартовите и крайните им позиции в базови двойки, размерите им и обхванатия цитогенетичен локус.

Таблица 7. Находки от ВАС- и олиго-чиповия анализ при Пациенти 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Пациенти	Чип	Хро-мозома	Тип аберация	Позиция в bp		Размер (bp)	Цитолента	
				Начало	Край		Начало	Край
Пациент 1	ВАС	4	делеция	184667610	188482494	3,814,884	4q35.1	4q35.2
	олиго			184626382	188241505	3,615,123	4q35.1	4q35.2
	ВАС	6	дупликация	150593286	156970321	6,377,035	6q25.1	6q25.3
	олиго			145093143	159086577	13,993,434	6q24.2	6q25.3
Пациент 2	ВАС	17	дупликация	61776322	71359180	9,582,858	17q24.2	17q25.1
	олиго			61609811	72383563	10,773,752	17q24.2	17q25.2
Пациент 3	ВАС	6	делеция	158789992	168077970	9,287,978	6q25.3	6q27
	олиго			157888732	170867418	12,978,687	6q25.3	6q27
	ВАС	10	дупликация	-	-	-	-	-
	олиго			113995737	135356694	21,360,000	10q25.2	10q26.3
Пациент 4	ВАС	6	дупликация	97048939	111752315	14,703,376	6q16.1	6q21
	олиго			92548327	113881461	21,333,134	6q16.1	6q21
	ВАС	18	дупликация	9206676	11770773	2,564,097	18p11.22	18p11.21
	олиго			8698309	14178151	5,479,842	18p11.22	18p11.21
Пациент 5	ВАС	8	дупликация	131718323	143128999	11,410,676	8q24.22	8q24.3
	олиго			123500361	146264874	22,764,514	8q24.13	8q24.3
	ВАС	9	делеция	2216348	9740675	7,524,327	9p24.2	9p23
	олиго			153161	18176777	18,023,616	9p24.3	9p22.2
Пациент 6	ВАС	1	дупликация	233963929	244703825	10,739,896	1q42.3	1q44
	олиго			232841378	247190744	14,349,367	1q42.3	1q44
	ВАС	6	делеция	158789992	166465623	7,675,631	6q25.3	6q27
	олиго			158168855	170753136	12,584,281	6q25.3	6q27

IV. Обсъждане

В настоящия труд чрез прилагането на комбинация от методи: клинично фенотипизиране, цитогенетичен анализ, молекулно-цитогенетични техники са селектирани 52 пациенти с вродени малформации за геномен скрининг за небалансирани микросруктурни геномни преустройства. Това е първото по рода си изследване, проведено върху селектирана група от български пациенти.

1. Обсъждане на резултатите от цитогенетичния анализ

От общата група от 96 изследвани с цитогенетичен анализ лица, при 75 е установен нормален кариотип. От тях две момчета имат полиморфна перичентрична инверсия на хромозома 9 - inv(9)(p11q13), която също се възприема за вариант на нормата. Една пациентка е с видимо балансирана реципрочна транслокация между 13 и 18 хромозома - 46,XX,t(13;18)(q13;q23). При четиринадесет пациента (14,5%) са установени патологични кариотипи - шест случая със синдром на Даун, при трима - допълнителен хромозомен материал с неясен произход и при петима различни мозаични състояния. При шестима пациента FISH анализът със локус специфична сонда за известни микроделеционни синдроми установява делеции, характерни за синдромите на Prader-Willi, Angelman и Williams-Beuren. В последствие те са изключени от микрочиповия анализ. Честотата на ХА сред новородените според различни проучвания варира от 6.27 до около 20 на 1000.

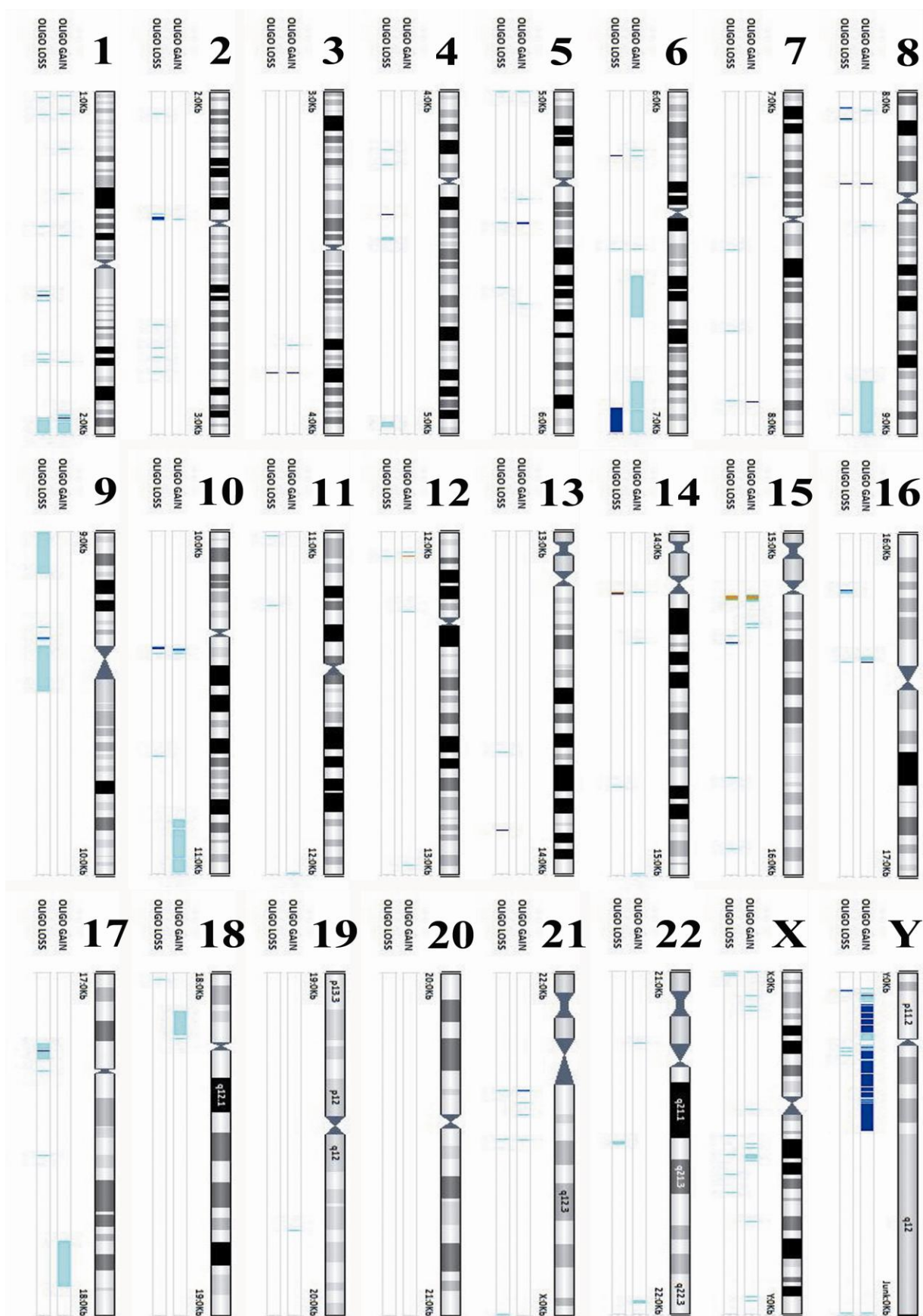
Прави впечатление по-ниският процент на микроскопски установените хромозомни аберации в нашата група. Обяснение за това е, че при първоначалния подбор на пациентите не са прилагани най-строгите критерии за включване, като наличие на множествени аномалии, съчетани или не с поведенчески аномалии и интелектуална недостатъчност. От друга страна след анализа на резултатите от микрочиповото изследване при част от пациентите се откриват аберации с размери, отговарящи на резолюцията на светлинно-микроскопския анализ. Напр. при Пациент 5 се касаеше за комбинирани геномни аберации с размери 22,764,514 bp за дупликацията в (8)(q24.3q24.13) региона и 18,023,616 bp за делецията в (9)(p24.3p22.2) региона. Тези размери би трябвало да са видими при хромозомния анализ, но тъй като са с приблизително еднакви размери, със сходна лентова характеристика, в комбинация с перичентрична инверсия на хромозома 9, е направена некоректна цитогенетична диагноза. Подобна е ситуацията и при Пациент 6, при която се установяват след молекулното кариотипиране терминални геномни дисбаланси с размери 14,349,367 bp за дупликацията в (1)(q42.3q44) региона и 12,584,281 bp за делецията в (6)(q25.3 q27). Пациентката има две нормални хромозоми 1, една нормална хромозома 6 и една дериватна хромозома 6, в чийто терминален край q-рамото се намира допълнителния материал от 1-ва хромозома - 6q25.3::1q42.3→1qter. Сходния размер на фрагментите не позволи идентификацията на геномната

аберация. При Пациент 9 също се касае за две терминални аберации, засягащи 1 и 6 хромозома, но с разменени аберации - терминална дупликация на 6q рамото и терминална делеция на 1q рамото, с размери 10,548,700 за делецията в (1)(q43q44) цитолентата и 11,878,054 bp за дупликацията в (6)(q25.3q27) цитолентата. В случая при пациентката се наблюдават 2 нормални хромозоми 6, една нормална 1-ва хромозома и една дериватна хромозома 1 с делеция на терминалния q-край и дуплицирания сегмент от 6-та хромозома - 1q43::6q25.3→6qter. При Пациент 3 геномните дисбаланси в (6)(q25.3q27) - и (10)(q25.2q26.3) - регионите също са с големи размери, но метафазните хромозоми са с резолюция от около 350 ленти на хаплоиден набор, което не позволява идентификацията на аберацията. При Пациенти 7 и 8 геномните аберации са с размер под 5 Mb, което е под резолюцията на 550 - лентовия GTG анализ (G-banding by Trypsin and Giemsa - G лентуване чрез трипсин и боя на Гимза).

В заключение от общата група от 96 пациента, цитогенетичният анализ спомогна за поставянето на дефинитивна диагноза при 11 (11,4%) пациента. Трима от пациентите, макар да са с патологични кариотипи (Пациент 1 - 46,XX,add(4)(q35), Пациент 2 - 46, XX, add(17)(q25) и Пациент 4 - 46,XY,add(18)(p11.2), остават с неясна диагноза по отношение на произхода на допълнителния хромозомен материал. Като цяло може да се приеме, че цитогенетичният анализ в случаи на небалансирани реципрочни транслокации с минимални размери, е недостатъчно информативен. Това може да доведе до погрешна оценка на риска за повторение в семейството и неадекватна генетична консултация.

2. Обсъждане на резултатите от микрочиповата СГХ

След първоначалното забавяне на приложението на микрочиповия анализ за рутинна диагностика поради известни технически недостатъци, в момента молекулното кариотипиране намира широко приложение в почти всяка молекулно-цитогенетична лаборатория. Растящата резолюция на ДНК - микрочиповете и оптимизирането на техниката позволяват детекция с голяма достоверност както на по-големи (> 1 Mb) аберации, така и на голям брой малки по размер CNVs, чието клинично значение в някои случаи е неясно. В нашето проучване откриваме 247 вариации в броя копия, от които 15 патологични, 124 нормални и 108 с неясно клинично значение. На Фигура 22 е показано геномното разпределение на установените вариации. Вариации са установени във всички хромозоми с изключение на 20 хромозома. Само една вариация се открива в 19 хромозома. Известно е, че и двете хромозоми са с относително висока концентрация на гени.



Фигура 22. Хромозомно разпределение на установените CNVs (патологични, нормални и с неясно клинично значение).

*oligo loss - делеции; oligo gain - дупликации

2.1. Обсъждане на установените патологични вариации в броя копия

Петнадесет патологични геномни аберации са открити при 9 от изследваните пациенти (Табл. 5, стр. 18, раздел III. 4.1.). В нашето проучване клинично значими патологични находки се срещат с честота 17,3%. При различни изследвания микрочиповата СГХ открива количествени геномни нарушения при 10 до 30% от случаите с неясни малформативни синдроми.

При 6-ма от анализирания (Пациенти 1, 3, 4, 5, 6 и 9) се касае за комбинация от две патологични CNVs в различни хромозоми, като пет от комбинациите са установени за първи път:

arr 4q35.1q35.2(184,626,382-188,241,505)x1, 6q24.2q25.3(145,093,143-159,086,577)x3;
arr 6q25.3q27(157,888,732-170,867,418)x1, 10q25.2q26.3(113,995,737-135,356,694)x3;
arr 6q16.1q21(92,548,327-113,881,461)x3, 18p11.22p11.21(8,698,309-14,178,151)x3;
arr 1q42.3q44(232,841,378-247,190,744)x3, 6q25.3q27(158,168,855-170,753,136)x1
arr 1q43q44(236,642,045-247,190,744)x1, 6q25.3q27(158,902,925-170,780,979)x3

За шестата комбинация (Пациент 5 - arr 8q24.13q24.3(123,500,361-146,264,874)x3, 9p24.2p23(153,161-18,176,777)x1) има докладван само още един случай на комбинация от 9p частична монозомия и 8q частична тризомия, но в нашия случай участващата в преустройството 9-та хромозома има в добавка и перичентрична инверсия.

При трима пациенти са доказани редки патологични геномни дисбаланси:

arr 17q24.2q25.2(61,609,811-72,383,563)x3
arr 4q21.1q21.22(82,592,957-84,293,873)x1
arr 17p11.2(16,450,773-20,372,588)x1

2.2. Анализ на генотип/фенотипни корелации при пациентите с патологични вариации в броя копия

За да се оцени клиничното значение на геномните дисбаланси е необходимо да се получи информация за генотип/фенотипните корелации при голям брой пациенти. Това ще позволи определяне на честотата и геномното разпределение на патологичните дисбаланси и ще допринесе за разкриването на механизмите, отговорни за възникването на хромозомните аберации.

2.2.1. arr 4q35.1q35.2(184,626,382-188,241,505)x1, 6q24.2q25.3(145,093,143-159,086,577)x3

Пациентката е с установен при цитогенетичния анализ женски кариотип с допълнителен материал с неизвестен произход на дългото рамо

на 4 хромозома 46,XX,add(4)(q35) и разкрити при микрочиповия ДНК-анализ dup(6)(q25.1q25.3), обхващащ 13,993,434 bp и делеция в дългото рамо на 4 хромозома - del(4)(q35.1q35.2) с размер от 3,615,123 Kb. Изследването на родителите показва, че се касае за де ново възникнали мутации.

Делецията в **(4)(q35.1q35.2)** района е патологична и покрива **28 HGNC гена** и **15 OMIM гена**. Сред делетираните гени е *SLC25A4* (Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier, Adenine Nucleotide Translocator). При “knockout” мишки при мускулна биопсия са установени парцаливи мускулни влакна, ексцесивна митохондриална пролиферация, а при изследването на сърдечния мускул - хипертрофична кардиомиопатия и митохондриална пролиферация. Хаплоинсуфицицията по *SLC25A4*, е добро обяснение за хипертрофичната кардиомиопатия, наблюдавана при нашата пациентка.

Дупликацията в (6)(q24.2q25.3) е патологична и покрива 66 HGNC гена и 38 OMIM гена. Един от дуплицираните гени - *STXBP5* (Syntaxin-Binding Protein 5) специфичен за мозъка syntaxin-1 свързващ протеин и би могъл да обясни интелектуалния дефицит при пациентката. *STXBP5* има централна роля за организацията на везикулите в пресинаптичните мембрани, като взаимодейства с много други компонентни (SNAP25, VAMP, synaptotagmin, alpha-SNAP), което показва, че би могъл да има асоциация с процесите на обучение и паметта. Той е негативен регулатор на освобождаването на невротрансмитерите. Повишената експресия на *STXBP5* при плъши модели редуцира до 50% броя на синаптичните везикули, намалявайки освобождаването на невротрансмитери.

Друг дуплициран ген, който би могъл да има отношение към интелектуалния дефицит при пациентката е *PPP1R14C* (Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C). *PPP1R14*, кодира KEPI протеин, който е негативен регулатор на PP1 (тип-1 Ser/Thr протеин фосфатаза). KEPI е с висока експресия в мозъка, сърцето и скелетните мускули. PP1 е сигнален трансдуктор, който повлиява невронната активност, протеиновата синтеза, мускулните контракции и клетъчното делене. Повишената експресия на *PPP1R14C*, инхибира KEPI и оттам индиректно активността на невроните.

В заключение при Пациент 1 са установени генотип/фенотипни корелации за три гена - *SLC25A4* с хипертрофичната кардиомиопатия, *STXBP5* и *PPP1R14C* и интелектуалния дефицит. Намирането на по-ясни генотип/фенотипни корелации е затруднено поради комбинирането на две различни мутации.

2.2.2. arr 17q24.2q25.2(61,609,811-72,383,563)x3

Пациентката е с установен при цитогенетичния анализ женски кариотип с допълнителен материал на дългото рамо на 17 хромозома 46,XX,add(17)(q25), като при микрочиповия ДНК анализ се разкри, че се

касае за дупликация в (17)(q24.2q25.2) - района с размер 10.773 Mb. Анализът на родителите показва, че се касае за де ново възникнала аберация. Дуплицираният район включваше 128 HGNC гена и 77 OMIM гена.

Сред гените с променена доза е *CER112* (centrosomal protein 112kDa) генът. Той е центрозомален протеин, който участва в организацията на микротубулния цитоскелет и апарата на делителното вретено. Центрозомалните протеини регулират размера на мозъка при хората и мишките, главно чрез регулация на клетъчното делене и ориентация на делителното вретено.

Дупликацията на друг ген от региона *PRKCA* (Protein Kinase C, Alpha) би могла да се свърже с интелектуалната недостатъчност, установена при пациентката. *PRKCA* протеинът участва във вътреклетъчната сигнална мрежа на префронталния кортекс при плъхове и маймуни. PKC показва високи нива на активност в префронталния кортекс и има отношение към оперативната памет. Установено е, че високата активност на *PRKCA* може да доведе до префронтална кортикална дисфункция. *PRKCA* участва в сигнална каскада, включваща седем протеина, важни за човешката памет.

Друг ген с важна роля при процесите на развитието е *EXOC7* (Exocyst Complex Component 7). *EXOC7* протеинът има значение за функцията и трафика на секреторните везикули в специфични домени на клетъчната мембрана. Посредством RT-PCR ELISA е установена висока експресия в мозъка, особено в нуклеус амигдалоидеус. Нарушаването на метаболизма на секреторните везикули в синапсите има критична роля за процесите на запаметяването.

В заключение направена е фенотип/генотипна корелация между *CER112* и микроцефалията и *PRKCA* и *EXOC7* и изоставането в интелектуалното развитие.

2.2.3. arr 6q25.3q27(157,888,732-170,867,418)x1, 10q25.2q26.3(113,995,737-135,356,694)x3

При третата пациентка е установен нормален женски кариотип, а молекулното кариотипиране разкрива частична монозомия по дългото рамо на 6-та хромозома - del(6)(q25.3q27) и дупликация в дългото рамо на 10-та хромозома - dup(10)(q25.2q26.3).

Делециите в 6q25 района често асоциират с микроцефалия, изоставане в развитието, дисморфични белези, глухота и агенезия/хипоплазия на корпус калозум. Това ни насочи към хипотезата, че гените, намиращи се в най-малките райони на препокриване са доза-зависими и хаплоинсуфициенцията им има отношение към абнормното развитие на ЦНС.

Делецията 6q района включва 70 HGNC гена и 43 OMIM гена. Чрез определяне на най-малките региони на препокриване, е стеснен общия регион на случаите със сходна симптоматика върху хромозома 6, лента 6q25.3 между 158.789.992 и 158.876.467 базова двойка, с размер 86,476 bp. В този район се оказва генът *TULP4* (Tubby-like protein 4), кодиращ транскрипционен фактор с неясна функция, с най-висока експресия в мозъчните структури по време на феталното развитие. Хаплоинсуфициентията на гена по време на феталното развитие би могла да доведе до абнормно развитие на ЦНС и изоставане в развитието. Това предположение се базира на разположението на този ген в силно стеснения 6q25.3 регион, делетиран в пациентите с микроцефалия, изоставане в развитието, дисморфични белези, глухота и агенезия/хипоплазия на корпус калозум.

Дупликацията в (10)(q25.2q26.3) региона покрива **137 HGNC гена** и **74 OMIM гена**. Обхванати са OMIM - локуси за неинсулино-зависим захарен диабет (125853); вродена липса на панкреатична липаза (246600); схизоцефалия (269160); скафоцефалия, максиларна ретрузия и интелектуална недостатъчност (609579); лакримоаурикуларен дентодигитален синдром (149730); синдром на кулис гирата на Beare и Stevenson (123790), синдрома на Antley-Bixler (207410); синдрома на Pfeiffer (101600); синдрома на Crouzon (123500); синдрома на Apert (101200); синдрома на Jackson-Weiss (123150); възрастово-зависим дегенерация на макулата (610149); фамилна глиома (137800); 2-метилбутирил-КоА-дехидрогеназен дефицит (610006); орнитин-аминотрансферазен дефицит (258870); конгенитална еритропоетична порфирия (263700); идиопатичен фетален хидропс (236750).

Някои от засегнатите гени участват в пътищата на развитие на нервната, зрителната и други системи. Такива са *KIAA1598* (shootin1 isoform b), *ABLIM1* (actin-binding LIM protein 1), *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2), *VAX1* (ventral anterior homeobox 1), *ADAM12* (ADAM metalloproteinase domain 12 isoform 1), *NKX6-2* (NK6 transcription factor related, locus 2), *GFRA1* (Glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 1), *OAT* (ornithine aminotransferase), *TECTB* (tectonin beta precursor) и др.

KIAA1598 генът е с неизвестна функция, но има най-висока експресия в мозъка по време на феталното и индивидуалното развитие.

Подобно на него висока експресия в мозъка имат и гените *FGFR2* и *NKX6-2*. Протеинът, кодиран от гена *FGFR2* е член на семейството на рецепторите за фибробластния растежен фактор. Тези протеини имат консервативна аминокиселинна последователност. Членовете на *FGFR* семейството се различават един от друг спрямо афинитета си към лиганда и тъканното си разпределение. *FGFR* белтъците взаимодействат с фибробластни растежни фактори, като предизвикват каскада от реакции и

по този начин влияят върху митогенезата и диференциацията. Мутации в този ген са свързани с краниосиностоза, синдромите на Крузон, Пфайфър, Апер, Джаксън-Вайс и др.

NKX6-2 е ген свързан с NK6 транскрипционен фактор в локус 2.

ABLIM1 генът кодира LIM протеин, който се свързва с актинови филаменти. Белтъците, съдържащи LIM домен, играят ключова роля в пътищата на развитие и организацията на цитоскелета.

Генът *ADAM12* кодира член на протеиновото семейство ADAM (дезинтегрини и металопротеази). Участва в множество биологични процеси като развитие на мускулите и невrogenеза.

VAX1 протеинът също участва в морфогенезата и развитието.

В заключение, чрез съпоставяне на общите региони на препокриване на делетираните участъци при пациенти с микроцефалия и агенезия/хипоплазия на корпус калозум е установена генотип/фенотипна корелация с хаплоинсуфициенцията на *TULP4* гена.

2.2.4. arr 6q16.1q21(92,548,327-113,881,461)x3, 18p11.22p11.21(8,698,309-14,178,151)x3

Четвъртият пациент показва патологичен мъжки кариотип след цитогенетичния анализ - 46,XY,add(18)(p11.23). Микрочиповата СГХ разкри, че фенотипът на пациента е резултат от аберации в два различни хромозомни района - dup(6)(q16.1q21) и dup(18)(p11.22p11.21).

Дупликацията в (6)(q16.1q21) района покрива 84 HGNC гена и 46 OMIM гена. Дупликацията в (18)(p24.3p22.2) района покрива 34 HGNC гена и 22 OMIM гена. Обхванати са OMIM локуси за: глюкортикоиден дефицит (202200); дефицит на комплекс I от митохондриялните ензими (252010).

Повечето доклади в литературата изтъкват, че частичната дупликация на късото рамо на 18 хромозома обикновено води до нормален фенотип или до несъществени аномалии. Много често такава дупликация се унаследява от фенотипно нормален родител. Това ни провокира да потърсим по - скоро корелация на клиничната картина с геномния дисбаланс в 6 - та хромозома.

Сред дуплицираните гени е *POU3F2* генът (POU class 3 homeobox 2), който кодира ЦНС - специфичен фактор N-Oct-3. *POU3F2* съдържа CAG повтор в кодиращия си регион. Открити са увеличен брой повтори при пациент с интелектуална недостатъчност и атаксия. Възможно е дупликацията на *POU3F2* да има асоциация с интелектуална недостатъчност на пациента.

SIM1 генът (Homo sapiens single-minded homolog 1 (Drosophila)) е друг ген, чийто увеличен брой може да има отношение към фенотипа на пациента. *SIM1* и *SIM2* гените имат важна роля при развитието на дрозофилата и високи нива на експресия през периода на невrogenезата.

SIM2 е кандидат ген за някои от фенотипните характеристики при синдрома на Даун - лицев дисморфизъм, черепни аномалии, аномалии в развитието на мозъка, интелектуална недостатъчност. Двата гена се експресират в специфични участъци на фронталните дялове на главния мозък и експресионният модел показва региониране на диенцефалона още преди морфологичната му диференциация. Двата гена имат голямо значение за регионирането на тъканите и органите, в които се експресират.

В заключение установена е фенотип/генотипна корелация между увеличената генна доза на *SIM1* и дисморфичния фенотип и интелектуалната недостатъчност при пациента. Изказано е предположение за връзката между дупликацията на *POU3F2* и интелектуалната недостатъчност.

2.2.5. arr 8q24.13q24.3(123,500,361-146,264,874)x3, 9p24.2p23(153,161-18,176,777)x1

Един от най-интересните случаи в нашето проучване е Пациент 5. При него е установена перичентрична инверсия на хромозома 9 - нормален вариант, унаследен от бащата. Микрочиповата СГХ разкрива, че фенотипът на пациента е резултат от аберации в две различни хромозоми - терминална делеция на част от късото рамо на 9 хромозома - del(9)(p24.2p23), обхващаща приблизително 18,023,616 bp и терминална дупликация в дългото рамо на 8 хромозома - dup(8)(q24.13q24.3) с размер от 22,764,514 bp. Делецията в късото рамо на 9-та хромозома показва значителна хетерогенност и може да обхваща различни по размер региони. Съпоставянето на данни от други научни проучвания доведе до стесняване на най-малкия район на препокриване на случаите с общи симптоми до 4.7 Mb интервал в 9p22.2-p23 - региона. Правят се опити за идентифициране критичните райони за тригоноцефалията и интелектуална недостатъчност.

При финото картиране на засегнатия регион от хромозома 9 е установено, че делецията обхваща 61 HGNC гена и 40 OMIM гена, едни от които с неизвестна функция и други, имащи отношение към клиничната картина.

Добър кандидат ген за интелектуалното нарушение на нашия пациент е генът *DOCK8* (dedicator of cytokinesis 8). Този ген е член на *DOCK180* фамилията на гуанин-нуклеотид обменни фактори, които взаимодействат с Rho GTP-азите и са компоненти на вътреклетъчните сигнални мрежи. Той се експресира в мозъка по време на феталното и индивидуалното развитие, като има вариабилна експресия в специфични мозъчни региони. В състояние на хаплоинсуфициенция *DOCK8* би могъл да има значение за интелектуална недостатъчност. Griggs и сътр. докладват за два независими случая на пациенти с интелектуална недостатъчност и увреждане в развитието, асоциирани с хетерозиготна дисрупция на *DOCK8* гена чрез

делеция и съответно транслокация, с места на разкъсване в локуса на гена.

Интересен кандидат ген за интелектуална недостатъчност е *KANK1* генът (kn motif and ankyrin repeat domains 1). Генът кодира протеин, съдържащ анкиринов повтор в С-края си. Вероятно хемизиготността на гена е свързана с квадриплегия и интелектуална недостатъчност. При изследването на 9 деца с делеция на 9p24.3 в бащината хромозома с клинични прояви на квадриплегия и интелектуална недостатъчност. Техните бащи, които имат същата делеция, показват нормална генна експресия, което предполага, че *KANK1* може да бъде майчино импринтиран ген, който се експресира само от бащиния алел. Същата ситуация е наблюдавана при Пациент 5 - той има един майчино импринтиран алел. Хаплоинсуфициенцията по *DOCK8* и *KANK1* би могла да обясни изоставането в нервно-психичното развитие, установено при пациента.

Сред делетираните гени е и *DMRT1* - генът (doublesex and mab-3 related transcription factor 1). *DMRT1* кодира специфичен за мъжкия пол транскрипционен регулатор с консервативен ДНК-свързващ домен от типа zinc finger и участва в диференциацията на мъжкия пол при гръбначните, мухите и нематодите. Генът показва гонадна специфичност и в хемизиготно състояние може да доведе до нарушения в развитието на тестисите и XY - феминизация. Хаплоинсуфициенцията по *DMRT1* би могла да обясни хипоспадията, съчетана с крипторхизъм и хипопластичен скротум, наблюдавани при пациента.

Дисталната частична монозомия 9p често се съпровожда от други хромозомни аберации, което затруднява клиничното характеризиране на фенотипната изява. В нашия случай фенотипът на пациента се модулира от втора аберация - частична тризомия 8q. В литературата има съобщения и за други случаи, съчетаващи едновременно частична монозомия 9p и други микроаберации, разкрити с геномно скриниране, но за момента има докладван само още един случай на комбинация от 9p частична монозомия и 8q частична тризомия. Нашият случай е уникален с това, че участващата в преустройството 9-та хромозома има в добавка и перичентрична инверсия.

Картирането на q24.13q24.3 - дуплицирания район в 8 хромозома разкри, че са обхванати 153 HGNC гена и 84 OMIM гена.

В заключение направени са фенотип/генотипни корелации между хаплоинсуфициенцията на *DOCK8*, *KANK1* и интелектуална недостатъчност, между *DMRT1* и половата диференциация. В допълнение този казус илюстрира, че за предоставяне на точна диагноза понякога не е достатъчен един молекулно - цитогенетичен метод, въпреки че някои от тях (напр. микрочиповата СГХ) са с висока разделителна способност. Комбинираното приложение на молекулно кариотипиране и молекулно - цитогенетично изследване (FISH анализ) при този пациент демонстрира възможността да

се предложи адекватна генетична консултация и пренатална диагностика в семейства с неясни хромозомни преустройства.

**2.2.6. arr 1q42.3q44(232,841,378-247,190,744)x3,
6q25.3q27(158,168,855-170,753,136)x1**

Пациентката е с установен при цитогенетичния анализ нормален женски кариотип и разкрити dup(1)(q42.3;q44) и del(6)(6q25.3;6q27) при високорезолутивния геномен скрининг. Финото картиране на дуплицирания регион в 1-ва хромозома показва, че там се намират 41 HGNC гена и 23 OMIM гена. В нашия случай фенотипът на пациентката се модулира и от присъствието на допълнителна аберация в 6 хромозома - частична делеция del(6)(q25.3q27). Делецията в (6)(q25.3q27) - района е патологична и покрива 28 HGNC гена и 16 OMIM ген.

Делециите в 6q често асоциират с агенезия/хипоплазия на корпус калозум. Това предполага наличието в този район на гени, чиято хаплоинсуфициенция нарушава нормалното му развитие. Тъй като пациентката имаше препокриващ се симптом - хипоплазия на корпус калозум - с пациентите с интерстициална 6q25.2-q25.3 - делеция, ние потърсихме в геномната база данни потенциални кандидат гени за този симптом. Делецията на 6q25 варира в различните проучвания в района 6q25.2-q25.3. Чрез определяне на най-малките региони на препокриване, е стеснен общия регион на случаите с агенезия/хипоплазия на корпус калозум върху хромозома 6, лента 6q25.3 между 158.789.992 и 160.900.000 базова двойка, с размер 2,11 Mb. В този регион намерихме гени от генната SLC - фамилия, *SOD2* (superoxide dismutase 2), гени, кодиращи Ca - свързващи протеини, *LPAL2* (lipoprotein, Lp(a)-like 2); *ACAT2* (acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2); гени, кодиращи транскрипционни фактори. Сред делетираните гени се оказа *TULP4* (Tubby-like protein 4), ген, кодиращ транскрипционен фактор с неясна функция, с най - висока експресия в мозъчните структури, най-вече в корпус калозум, по време на феталното развитие. Хаплоинсуфициенцията на гена по време на феталното развитие би могла да доведе до абнормно развитие на корпус калозум.

В заключение ние потвърждаваме възможността *TULP4* да е ключов кандидат-ген за хипоплазията на корпус калозум. Това предположение се базира както на нашия резултат за разположението на този ген в силно стеснения 6q25.3 регион, така и на резултатите на други автори за делеция на този ген в пациентите с агенезия/хипоплазия на корпус калозум заедно с другите признаци на частична делеция на 6q25 синдрома.

2.2.7. arr 17p11.2(16,450,773-20,372,588)x1

Пациентката е с установен нормален женски кариотип. Молекулното кариотипиране разкри делеция 17p11.2 региона с размер 3,921,815 bp.

Делецията в (17)(p11.2p11.2) - района е патологична и покрива 70 HGNC гена и 30 OMIM гена. При пациентката е поставена диагноза синдром на Smith-Magenis. Това е известен микроделеционен синдром от групата на редките болести. *RAI1* (retinoic acid induced 1) е единственият известен ген, отговорен за по-голямата част от фенотипната изява при синдрома Smith-Magenis. При 70% от пациентите със SMS се открива делеция на около 3.5 Mb в 17p11.2 района, включваща *RAI1* гена. В останалите случаи се установяват различни мутации, като до момента са идентифицирани най-малко 12 мутации в *RAI1*. *RAI1* генът кодира информация за синтез на протеин със значение за регулацията на транскрипцията в невроните на мозъка и има висока експресия във нервните тъкани. Въпреки, че функцията на протеина не е напълно изяснена, смята се, че има роля в развитието на нервната система. Вероятно вътреклетъчно участва във формирането на протеинов комплекс, контролиращ активността на определени гени. При делеционните форми загубата на едно копие на гена води до хаплоинсуфициенцията на *RAI1* и е причината за изява на болестта. При недеletionните форми мутациите се изявяват като доминантни и са свързани със загуба на функцията или с намалено количество на протеина. За момента няма информация по какъв механизъм загубата на генна функция води до характерните за заболяването белези и симптоми.

При някои пациенти, макар и с известни синдроми, клиничната картина не е достатъчна характерна, което поставя проблем в диагностично отношение. В тези случаи микрочиповото изследване е единствения метод, чрез който може да се направи цялостен геномен скрининг с достатъчно голяма резолюция. Нашата пациентка не беше с достатъчно характерна симптоматика за синдрома Smith-Magenis, но благодарение на молекулното кариотипиране при нея беше изяснена диагнозата, което още веднъж подчертава мощта на микрочиповата CGX при генетичното диагностициране на пациенти с неясна симптоматика.

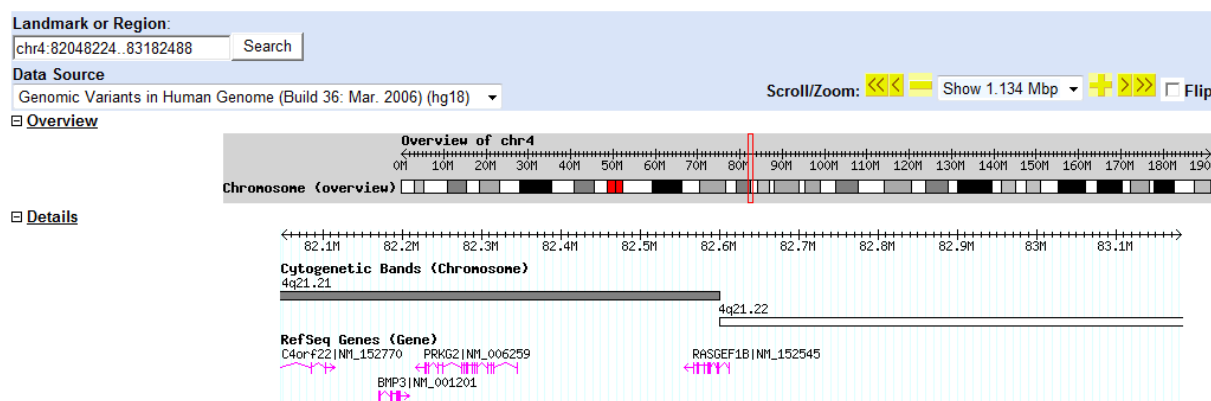
2.2.8. arr 4q21.21q21.22(82,592,957-84,293,873)x1

Делецията в (4)(q21.21q21.22) - района е патологична и покрива 12 HGNC гена и 5 OMIM гена. 1% от региона е покрит от полиморфизми от тип делеция (DGV: 8%, Emory: 0%). Допълнително в 4q21.21 локуса при пациента беше установена делеция с неясно клинично значение с размер 383,073 bp - arr 4q21.21(82,048,224 -8,431,297)x1. Делецията обхващаше 3 HGNC гена и 2 OMIM гена.

В научната литература има съобщения, описващи нтерстициалната делеция в 4q21 региона. 4q21 микроделеционният синдром е новоописан синдром с характерен фенотип.

Понастоящем усилията на учените са съсредоточени в определяне на критичните за синдрома гени. Делецията в (4)(q21.1q22.2) региона варира при различните проучвания от 3,2 до 15,1 Mb. Чрез анализ на най-малкия

регион на препокриване, ние стеснихме общия регион при всички случаи до 1.134 Mb, в геномна позиция от 82,048,224 до 83,182,488 bp (Фиг. 23).



Фигура 23. Карта на делетирания регион в (4)(q21.21q21.22) (DGV, human genome build 36).

В този регион се намират RefSeq гените *RASGEF1B* (Homo sapiens RasGEF domain family, member 1B, mRNA) и *PRKG2* (Protein kinase, cGMP-dependent, type II). Възможно е и други гени, обхванати при по-големите делеции, да допринасят за вродените малформации, описани при тези индивиди. Най-малкият регион на препокриване при 4q21 делеционния синдром, включва *RASGEF1B* и *PRKG2* и ние се фокусирахме върху тяхната функция.

RASGEF1B - генът е високо-консервативен гуанин-нуклеотид обменен фактор за Ras фамилията протеини. Ras суперфамилията протеини има роля при фундаментални събития като сигналната трансдукция и интрацелуларния транспорт. *RASGEF1B* показва високо ниво на експресия в ЦНС и от тази гледна точка е добър кандидат за симптоматиката от страна на ЦНС. Растящ брой гени, свързани с интелектуална недостатъчност, участват в Rho-GTPase сигналните пътища. Между тях са *ARHGEF6* и *FGD1*, които кодират гуанин-нуклеотид обменни фактори и регулират *Rac* и *Cdc42*, членове на Rho - фамилията на малките GTP - ази. Те са ключови регулатори на актина и микротубулните взаимодействия по време на дендритното развитие.

PRKG2 кодира cGMP-dependent protein kinase type II (cGKII - протеин), която е мембранно-свързана киназа, активираща се от вътреклетъчен cGMP и е с висока експресия в интерстициалната мукоза, бъбреците, белите дробове, мозъка и хрущялите. При животински модели е установено, че нулевите мутации водят до тежко постнатално изоставане в растежа поради дефект на ендохондралната осификация и дефектна хондроцитна хипертрофия. Това може да обясни изоставането в растежа и при докладваните пациенти. В допълнение cGKII фосфорилира GluR1 в мозъка, което води до повишаване на нивото на GluR1 и увеличена експресия на AMPA рецепторите в извънсинаптичните пространства. Този механизъм има значение за функцията на хипокампаалните неврони, паметта и

възможностите за обучение. Следователно хаплоинсуфицията на *PRKG2* гена може има значение за интелектуалните възможности на пациентите.

В заключение стеснен е критичния регион при случаите с 4q21 микроделеционен синдром до 1.134 Mb, в геномна позиция от 82,048,224 до 83,182,488 bp и е потвърдено, че *PRKG2* и *RASGEF1B* са най-обещаващите кандидат гени, асоциирани с клиничните симптоми при пациентите.

2.2.9. arr 1q43q44(236,642,045-247,190,744)x1, 6q25.3q27(158,902,925-170,780,979)x3

Делецията в (1)(q43q44) - района е патологична и покрива 94 HGNC гена и 19 OMIM гена.

В делетирия регион се намират *PLD5*, *CEP170*, *SDCCAG8*, *AKT*, и *ZNF238* гените. Някои от тях са силни кандидат гени за определяне размерите на мозъка.

CEP170 генът (centrosomal protein 170kDa) *CEP170*, кодира центрозомален протеин, който е фосфорилиран по време на митозата. Генният продукт на *SDCCAG8* (serologically defined colon cancer antigen 8) също е асоцииран към центрозомите. Известно е, че центрозомалните протеини регулират размера на мозъка при хората и мишките, главно чрез регулация на клетъчното делене и ориентация на делителното вретено.

AKT3 - генът (akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma), кодира *AKT3* - протеин, който е член на фамилия серин-треонин кинази, участващи в контрола на клетъчните и органните размери при мухи, мишки и хора. Установено е, че при *AKT3* "knockout" мишки, размерите на мозъка и на корпус калозум са значително редуцирани, което го прави силен кандидат ген за човешката микроцефалия и хипоплазия на корпус калозум.

Друг силен кандидат за агенезията/хипоплазията на корпус калозум е *HNRPU* (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A). Миши ембриони с инактивирани два алела, показват аномалията още на много ранен етап и загиват.

Възможни са две обяснения за двустранната глухота, установена при пациентката. В делетирия участък е картиран автозомно-рецесивен ген за глухота *DFNB45*. Делецията на нормалния алел може да доведе до изява на рецесивна наследствена мутация поради загубата на хетерозиготност. В този район е картиран и локус, асоцииран с автозомно-доминантна глухота.

Дупликацията в (6)(q25.3q27) - района е патологична и покрива 64 HGNC гена и 40 OMIM гена.

В заключение, установени са генотип/фенотип корелации между *CEP170*, *SDCCAG8*, *AKT3*, *HNRPU* и микроцефалията и хипоплазията на корпус калозум.

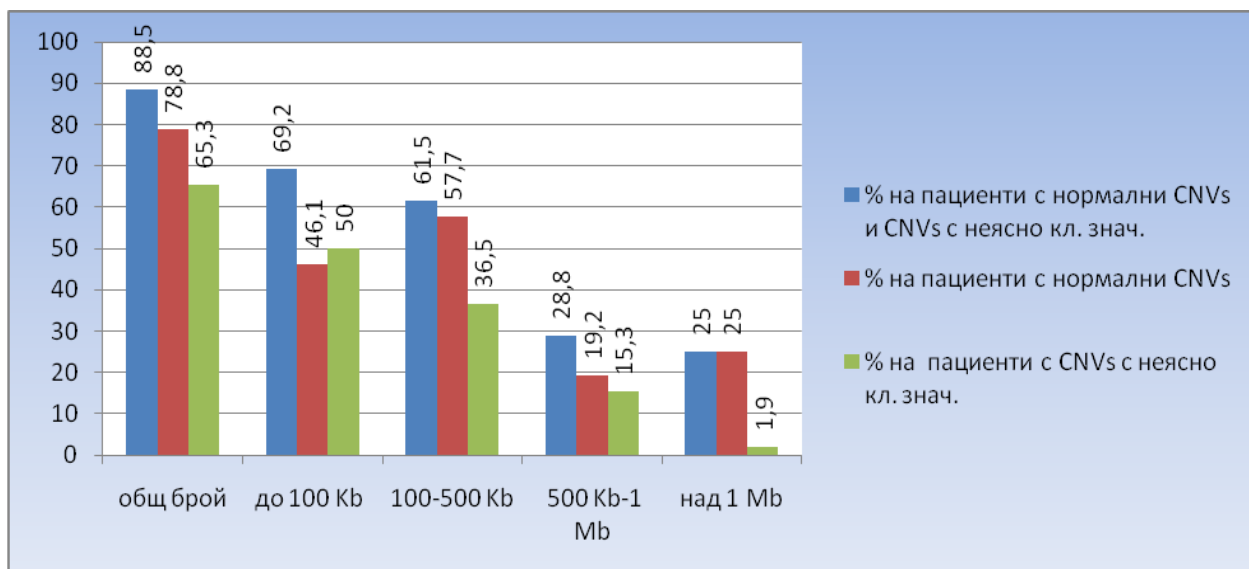
2.3. Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение

Все още познанията ни относно значението на структурните полиморфизми са недостатъчни, което затруднява клиничната интерпретация на вариациите и откриването на ясни генотип-фенотипни корелации. За да се разбере ролята на CNVs за заболяванията при човека, първоначално трябва да се проучи честота на структурните варианти в общата популация. Необходимо е да се изследва голяма контролна популация, за да се характеризира структурата, честотата, разпределението и неравновесната скаченост на всеки вариант. Вече е известно, че някои CNVs, асоциират с определени фенотипи, включително редки генетични и Менделови болести. Натрупани са достатъчно данни, сочещи, че CNVs са един от факторите, допринасящи за нормалните генетични разлики между хората. Според последните публикации повече от половината вариации между човешките геноми се дължат на вариации в броя копия (CNVs). В допълнение има основание да се подозира, че ако дадено заболяване има доказано генетично предразположение, то CNVs могат да имат дял в етиологията му (въз основа на факта, че CNVs са генетични варианти). Разкриването на природата и разпределението на CNVs в общата популация ще допринесе не само за изясняването на биологичното значение на де ново възникналите и редките наследствени варианти, асоциирани с редките и менделовите болести, но и за установяването на варианти, увеличаващи риска за някои мултифакторни болести.

Развитието на микрочиповите технологии за скриниране на целия геном разкрива неочаквано голям брой делеции и дупликации в човешкия геном. Това налага щателно изследване на CNVs в здрави популации и болни индивиди. Редица авторски колективи от различни страни вече докладваха резултати от големи популационни проучвания при здрави и болни индивиди. За съжаление в това отношение България изостава от останалите европейски народи.

В нашето проучване, при молекулното кариотипиране на 52 пациенти с вродени малформации, са установени нормални вариации в броя копия при 41 пациента и вариации с неясно клинично значение при 34 пациента. Сумата надхвърля 52, тъй като по-голямата част от пациентите са с повече от една аберация. Общият брой установени нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение, наброява 232, от които 130 са делеции, а 102 дупликации, което прави средно по 4,5 вариации на пациент.

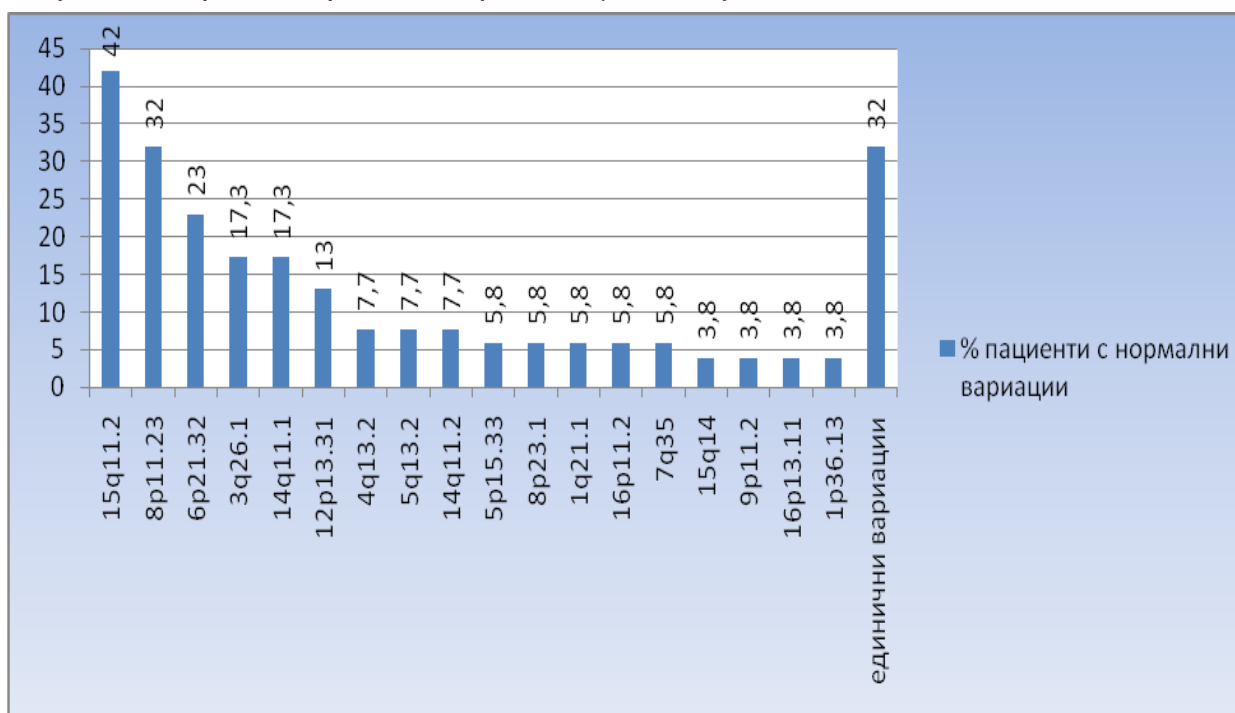
Нашите резултати показват следното разпределение при изследваните лица: при 69,2% (36 пациента) се установяват CNVs с размер до 100 Kb, при 61,5% (32 пациента) - с размер 100 - 500 Kb, при 28,8% (15 пациента) - с размер 500 Kb - 1 Mb и при 25% (13 пациента) - с размер над 1 Mb. Сумата на процентите надхвърля 100, тъй като при голяма част от пациентите се срещат повече от една CNVs с различни размери (Фиг. 24). Прави впечатление, че в нашата извадка се срещат с по-голяма честота вариантите с размери над 500 Mb.



Фигура 24. Честота на установените CNVs, разпределени по размер и вариант.

2.3.1. Нормални вариации в броя копия

От общия брой (232) намерени вариации с нормална природа са 124, които се срещат при 41 от пациентите. При повече от един пациент са установени нормални вариации в следните цитогенетични локуси: 8p11.23, 15q11.2, 4q13.2, 5p15.33, 6p21.32, 8p23.1, 5q13.2, 1q21.1, 3q26.1, 12p13.31, 15q14, 14q11.1, 16p11.2, 9p11.2, 16p13.11, 1p36.13, 14q11.2, 7q35. При 13 пациента са намерени 17 единични вариации в следните локуси: 1q21.1, 15q11.2, 17q21.32, 21p11.2, 6p21.33, 14q32.33, 9p11.1, Xq11.1, 12p11.21, 19q13.31, 1q31.3, 8q24.23, 16p13.11 (Фиг. 25).



Фигура 25. Честота на различните нормални CNVs в изследваната група.

Най-честите нормални вариации в нашето проучване са 15q11.2, 8p11.23, 6p21.32, 3q26.1, 14q11.1 и 12p13.31, които се срещат при над 10% от изследваните пациенти (Фиг. 26). Прави впечатление, че при част от изследваните се касае за делетиран материал, а при други за дуплициран, което показва, че тези райони са със значителни вариации. Необходимо е да се проведе геномно скриниране на по-голяма група пациенти, за да се установи реалната честота на откритите от нас единични нормални варианти.



Фигура 26. Нормални вариации в броя копия, установени при над 10% от изследваните пациенти. Червените региони, отговарят на делетиран генетичен материал, а зелените на дуплициран генетичен материал.

Макар и нашите изследвания да са проведени върху група пациенти с вродени малформации и изоставане в развитието, това са първите по рода си данни даващи информация за разпределение на нормални CNVs в българска популация.

2.3.2. Вариации с неясно клинично значение

Вариантите с неясно клинично значение наброяват 108, със следното разпределение по размер: 57 (52,7%) с размер под 100 Kb; 40 (37%) с размер 100-500 Kb; 10 (9,2%) с размер 500 Kb-1 Mb; 1 (0,9%) с размер над 1 Mb. От тях 68 бяха делеции и 40 дупликации.

При интерпретацията на CNVs с неясно значение клиничните лаборатории, освен на обществено достъпни бази данни (DGV, UCSC и др.), могат да се основават и на собствени бази данни с нормални CNVs, получени при валидирането на дадена СГХ платформа, преди въвеждането ѝ в рутинната практика.

В идеалния случай валидирането се прави с група от здрави индивиди. Понякога е възможно да се използват и данни, получени от анализа на пациенти, като се изхожда от презумпцията, че наличието на голяма патологична вариация в най-голяма степен е причината за генетичната болест, а установяването на други по-малки по размер дисбаланси е по-малко вероятно да има отношение към заболяването.

За съжаление до момента в България няма проведено мащабно изследване върху структурата, честотата и разпределението на CNVs в българската популация. Това наложи при интерпретацията на резултатите да се базираме на данни за други популации.

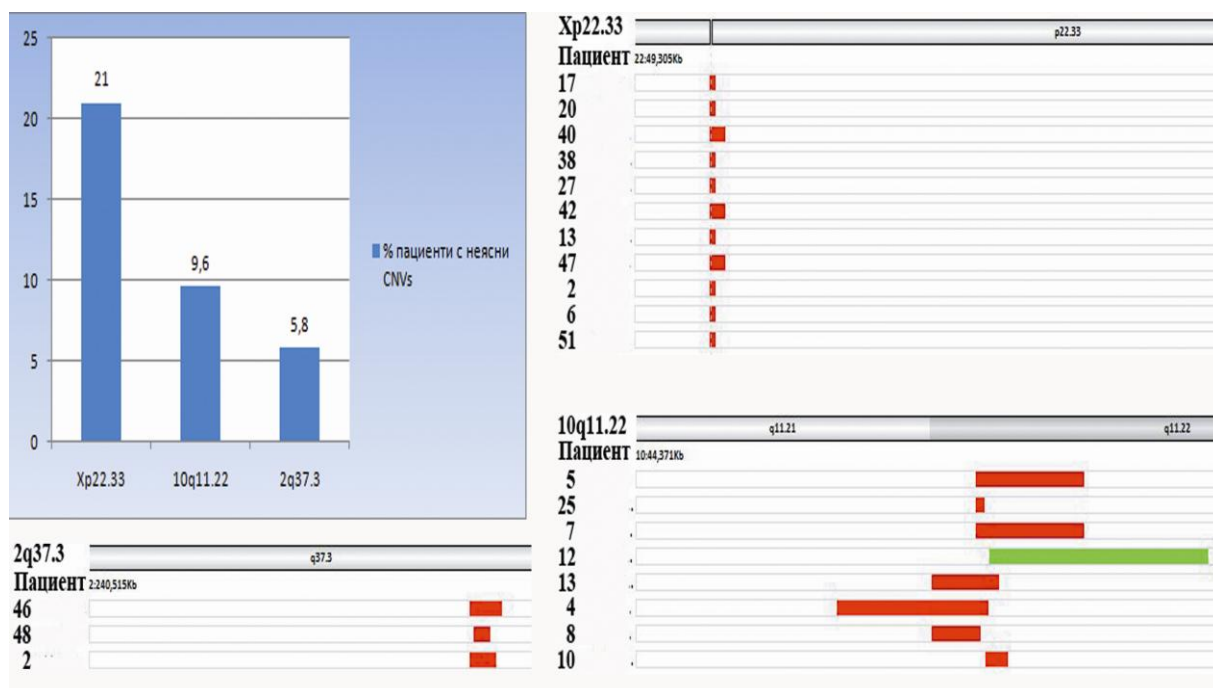
От установените 108 вариации с неясно клинично значение при повече от един пациент се срещат вариации в следните цитогенетични локуси: Xq23, 2q37.3, Xp22.33, 22q11.23, Xq21.1, 10q11.22, 8p23.1, 1q43, Xq23, 2p11.2, 1q44, 12p13.31, 22q11.21, Xq26.3, 1q21.3, 6q14.1, 1q31.3. При 26 пациента се намериха общо 57 единични вариации. Те засягаха 55 локуса: Xq28, 10q11.21, 15q13.3, 18p11.21, 21q22.3, Xq21.2, 1p34.2, 1p31.1, 1p21.1, 4q21.21, 15q26.2, Xp22.2, 10q23.2, 5q21.2, 9p13.1, 9p11.1, 21q21.2, 1q31.2, Xp22.11, 17q11.1, 2q31.3, 2q33.1, 11p14.1, 18p11.32, Xq13.3, 1p36.32, 14q31.1, 7p14.1, Xp22.31, 5q11.2, 8q12.1, Xp11.4, 2q32.1, Xq22.3, Xp22.13, 3q24, 12q24.33, 1p21.3, 4p15.1, 11q25, 15q13.1, 15q13.1, 1p36.33, 14q13.2, 2q24.3, 3q26.1, 7q31.1, 5q13.2, 13q22.1, 4p13, 15q24.1, Xq21.31, Xq22.1, 16p13.11, Xq26.3, 12p13.31.

Прави впечатление, че при нашата извадка се установява висок процент на CNVs с неясно клинично значение. Твърде вероятно е част от тези варианти да са нормални за българската популация и да не се срещат в проучените чужди популации. Добре известен факт е, че българският народ се отличава с голяма генетична хетерогенност. Съвременният български генофонд е резултат от промяната на алелните честоти в хода на еволюцията, която настъпвала под влиянието на редица природни и демографски събития. Територията на България се намира на ключова географска позиция и е входната врата, откъдето хората са проникнали в

Европа през палеолита. Тя е била вход на миграционните потоци от Близкия Изток и пътя на разпространение им към Централна и Западна Европа.

Поради липсата на достатъчно данни за българската популация се наложи да се прави индивидуална оценка на всеки отделен вариант. Интерпретацията на вариациите с неясно клинично значение се прави въз основа на размера им, природата (делеции или дупликации), съдържанието на гени и произхода им (де ново или унаследени).

В нашето проучване три типа неясни вариации в хромозомни локуси 2q37.3, 10q11.22, Хр22.33 (общо 19 вариации) се срещат при по-голям процент (над 5%) от пациентите, което ни даде основание да предположим, че те най-вероятно нямат патологичен характер (Фиг. 27).



Фигура 27. Вариации с неясно клинично значение, установени при над 5% от пациентите. Червените региони, отговарят на делеции, зелените на дупликации. При вариацията в 10q11.22 локуса при пациенти 12, 4 и 8 регистрираната вариация е с нормална природа.

Двадесет и пет от вариациите, срещащи се в локуси 2q37.3, Хр28, 10q11.21, 15q13.3, 18p11.21, 21q22.3, Хр21.2, 1p34.2, 1p31.1, 1p21.1, 15q26.2, 16p13.11, Хр22.2, 10q23.2, Хр23, 22q11.23, Хр21.1, 10q11.22, 8p23.1, 1q43, 2p11.2 са намерени при пациенти с установени големи патологични аберации, свързани със специфичният им фенотип. Би могло да се приеме, че е слабо вероятно, установените по-малки по размер допълнителни дисбаланси да имат отношение към заболяването, в случай, че пациентите са с голяма ясна патологична находка. Поради тази причина приехме, че е възможно тези двадесет и пет варианта да нямат патологичен характер. При Пациент 8 е установена делеция с неясно клинично значение в 4q21.21 региона. Делецията съдържа 3 HGNC гена (*C4orf22*, *BMP3*, *PRKG2*) и 2

OMIM гена (112263, 601591). *PRKG2*-генът е обсъждан като потенциален кандидат ген, асоцииран със симптомите при новоописания 4q21.21 микроделеционен синдром, поради което не може да бъде отхвърлен потенциалният патологичен характер.

Тридесет и пет от останалите вариации не съдържат OMIM гени, така че като потенциално патологични остават да се разглеждат 29 вариации. От тях 18 съдържат по един ген, 9 - 2 гена, 1 - 3 гена, 1 - 5 гена, като само 5 от OMIM гените са свързани с OMIM заболявания (Табл. 8).

Таблица 8. Вариации с неясно клинично значение, съдържащи OMIM гени.

Па-циент	Локус	Брой OMIM гени	Размер	Тип аберация	OMIM заболявания
22	1p36.32	2 (OMIM 601990, 601883)	886,175	дупликация	
41	1p21.3	1 (OMIM 274270),	60,977	делеция	дихидропиримидин-дехидрогеназен дефицит (OMIM 274270)
45	1q31.3	2 (OMIM 134371, 605337)	84,096	дупликация	
48	1q31.3	2 (OMIM 605336, 134371)	101,856	делеция	
17	1q43	1 (OMIM 180902)	110,704	делеция	полиморфна катехоламинергична вентрикулна тахикардия (OMIM 604772), фамилна аритмогенна десностранна вентрикулна дисплазия (OMIM 600996), фамилна вентрикулна тахикардия (OMIM 192605)
51	2p11.2	1 (OMIM 173340)	666,238	делеция	
34	2q32.1	2 (OMIM 114190, 152310)	85,584	делеция	
52	4p13	1 (OMIM 604604)	99,545	делеция	
51	5q13.2	5 (OMIM 603011, 600354, 601627, 600355, 601748)	957,476	делеция	мускулна атрофия II тип (OMIM 253550), спинална мускулна атрофия IV тип (OMIM 271150), спинална мускулна атрофия I тип (OMIM 253300), спинална мускулна атрофия III тип (OMIM 253400)
26	7p14.1	1 (OMIM 603309)	45,75	дупликация	
50	7q31.1	1 (OMIM 605977)	35,762	делеция	
10	9p13.1	1 (OMIM 610517)	104,834	делеция	

Па-циент	Локус	Брой OMIM гени	Размер	Тип аберация	OMIM заболявания
10	10q11.2 2	1 (OMIM 601790)	136,905	делеция	
10	10q11.2 2	2 (OMIM 610630, 610631)	466,265	делеция	
13	10q11.2 2	3 (OMIM 608081, 611240, 601790)	404,978	делеция	
25	10q11.2 2	2 (OMIM 608081, 611240)	60,352	делеция	
50	10q11.2 2	2 (OMIM 610630, 610631)	527,093	дупликация	
50	12p13.3 1	2 (OMIM 611039, 138170)	114,563	дупликация	
40	12q24.3 3	1 (OMIM 611257)	54,372	дупликация	
45	14q13.2	1 (OMIM 605680)	87,634	дупликация	
44	15q13.1	2 (OMIM 602712, 608243)	715,018	дупликация	
44	15q13.1	1 (OMIM 601009)	171,664	дупликация	
16	17q11.1	1 610091	36,63	делеция	
38	22q11.2 1	1 (OMIM 601279)	155,585	дупликация	
39	Xp22.13	1 (OMIM 300208)	100,922	дупликация	
17	Xq13.3	1 (OMIM 300135)	73,685	делеция	сидеробластна анемия, спиноцеребеларна атаксия (OMIM 301310)
52	Xq21.1	1 (OMIM 603121)	63,337	делеция	
52	Xq22.1	1 (OMIM 300642)	47,438	делеция	билатерална полимикрогирия (OMIM 3003881), епилепсия, интелектуална недостатъчност и диспраксия (OMIM 300643)
52	Xq21.31	1 (OMIM 603121)	85,753	делеция	

Всички геномни аберации, свързани с OMIM заболявания са от делеционен тип. От тях само аберацията при Пациент 52 може директно да бъде свързана с клиничния му фенотип - 14 годишно момче с интелектуална недостатъчност, епилепсия и изоставане в развитието. Това ни даде основание да приемем делецията в Xq22.1 като потенциално патологична.

Останалите OMIM заболявания са с автозомно - рецесивно унаследяване (дихидропиримидин-дехидрогеназен дефицит, мускулна атрофия II тип, спинална мускулна атрофия IV тип, спинална мускулна атрофия I тип, спинална мускулна атрофия III тип, псевдоксантома еластикум, полиморфна катехоламинергична вентрикулна тахикардия), Х-свързано унаследяване (сидеробластна анемия, спиноцеребеларна атаксия) или автозомно-доминантно с непълна пенетрантност (фамилна аритмогенна десностранна вентрикулна дисплазия, фамилна вентрикулна тахикардия, фамилна аневризма на торакалната аорта).

Необходими са допълнителни проучвания върху функцията на останалите гени и възможната им асоциация с клиничните симптоми на пациентите. Основен извод от интерпретацията на вариациите с неясно клинично значение е, че всеки вариант трябва да се разглежда поотделно, като се вземе предвид комбинация от критерии (размер, тип на аберацията, съдържание на гени, произход). За съжаление поради високата цена на експериментите нямаше възможност да изследваме по-голямата част от родителите.

Очевидна е нуждата от обширни популационни проучвания и създаването на подробни карти на вариациите в българската популация. Това би улеснило изключително много прецизната интерпретация на геномни дисбаланси с неясен характер в клиничен аспект и би помогнало на широкото въвеждане на микрочиповата диагностика в практиката не само за постнатална диагностика на индивиди с изоставане в развитието и дисморфизъм, но също така и за пренатална генетична диагностика.

В заключение молекулярното кариотипиране се очертава като изключително подходящ метод за генетичното диагностициране на пациенти с неясни дисморфични синдроми. Той може успешно да замести цитогенетичното изследване и да се прилага като пръв метод на избор. Разбира се в случаи на типична клинична картина (напр. синдром на Даун, на Търнър и др.) хромозомният анализ има своето приложение като по-евтин и по-бърз метод.

3. Обсъждане на резултатите от FISH анализа

При шестима от нашите пациенти диагнозата е поставена само с FISH анализ с локус специфични сонди за известни микроделеционни синдроми. Те са с добре дефинирани клинични фенотипи (съмнение за синдрома на Prader-Willi, на Angelman, на Williams-Beuren). Типичната клинична картина и адекватната диференциална диагноза позволяват изясняването на етиологията само чрез FISH анализ. Това показва, че прилагането на FISH

анализ при добре дефинирана клинична симптоматика може да замени микрочиповото изследване, тъй като е по-евтино, по-лесно за изпълнение и по-бързо.

В нашето проучване е приложен FISH анализ като втори метод за валидиране на патологичните находки. Изследванията, базирани на FISH заслужават внимание, тъй като предоставят информация, която не може да бъде установена с другите молекулно-базирани тестове относно хромозомната позиция. По този начин е възможно уточняването на важни аспекти за риска от повторяемост при следваща бременност, който е налице при балансираните реципрочни микроаберации.

При всички пациенти FISH анализът потвърждава патологичните находки. При Пациенти 1, 2, 5 и 9 имаме възможност да изследваме родителите и да установим произхода на патологичните вариации и хромозомната позиция на дисбалансите. При пациенти 1, 2 и 9 се касае за де ново възникнали аберации. Наличието на терминални аберации насочваше към фамилни преустройства. Изненадващо при Пациенти 1 и 9 не се потвърдиха очакванията ни за фамилна реципрочна транслокация при някой от родителите. Трябва да се има предвид, че и при двата случая не може да се отхвърли вероятността за лъжливо бащинство. При пациент 5 се доказва, че се касае за фамилно преустройство. Проведен се FISH анализ на майката, бащата и сестрата на пробанда. След кариотипирането на контраоцветените с DAPI II метафазни хромозоми със софтуерна програма ISIS (MetaSystems, GER) е установено, че при бащата и сестрата се касае за микроструктурна реципрочна транслокация между 8 хромозома и инвертираната 9 хромозома. Коректната идентификация на хромозомите е направена чрез анализ на инвертирания им DAPI II лентов образ (Фиг. 28).

Прилагането на FISH в семейството на пробанда помогна за изясняване на кариотипа, а именно:

Кариотип на Пациент 5:

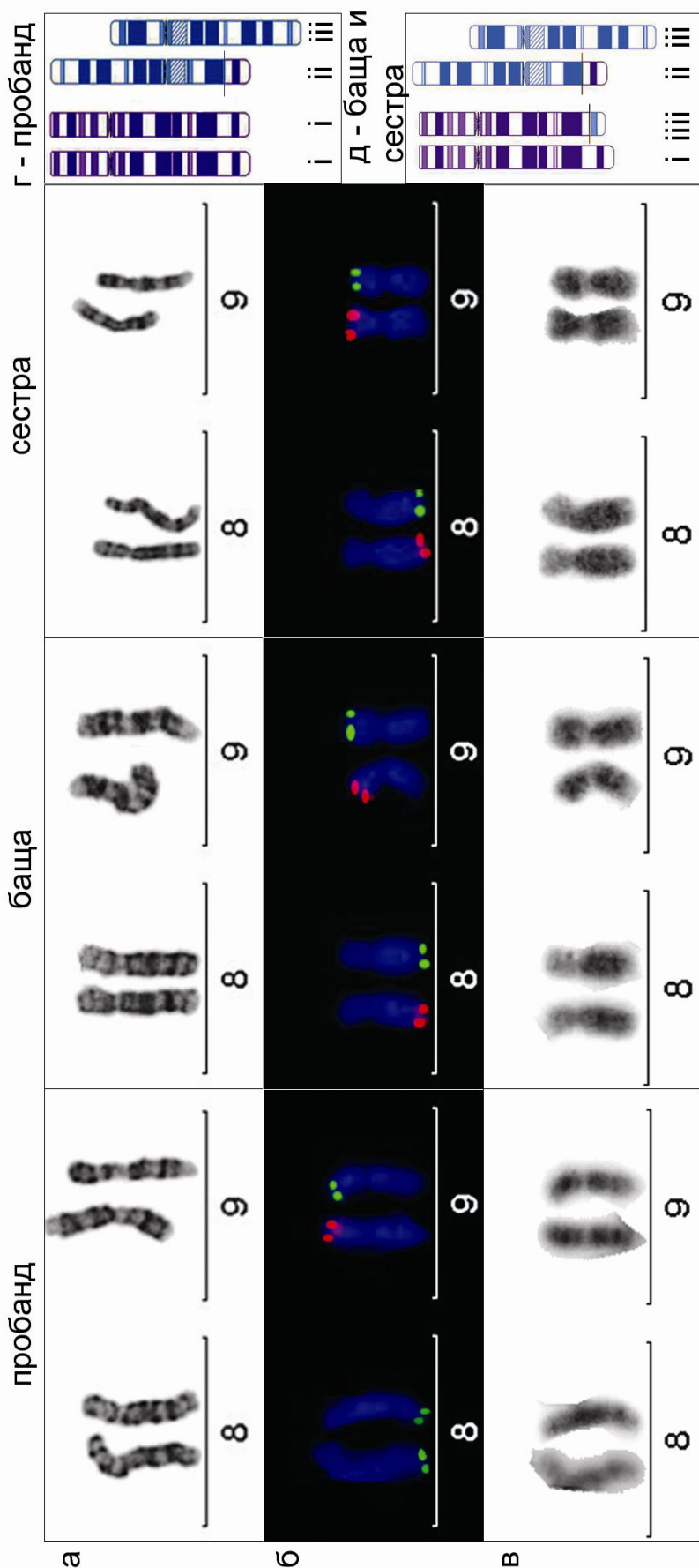
46,XY,der(9)inv(9)(p11q13)t(8;9)(q24.13;p22.2).

Кариотип на бащата:

46,XY,der(9)inv(9)(p11q13)t(8;9)(q24.13;p22.2),der(8)t(8;9)(q24.13;p22.2).

Кариотип на сестрата:

46,XX,der(9)inv(9)(p11q13)t(8;9)(q24.13;p22.2),der(8)t(8;9)(q24.13;p22.2).



Фигура 28. Цитогенетичен и FISH анализ на участващите в геномното преустройство хромозоми в семейството на Пациент 5.

А) GTG - лентов анализ на пробанда, баща му и сестра му. Вижда се полиморфна перичентрична инверсия на първата хромозома 9;

Б) FISH - анализ - пациентът има две нормални хромозоми 8, една нормална хромозома 9 и една дериватна хромозома 9: $\text{der}(9)\text{inv}(9)(\text{p}11\text{q}13)\text{t}(8;9)(\text{q}24.13;\text{p}22.2)$; бащата и сестрата са с балансирана реципрочна транслокация между хромозома 8 и 9;

В) Коректната идентификация на участващите в преустройството хромозоми беше направена чрез кариотипиране на инвертирания им DAPI - образ;

Г) Идеограми на хромозоми 8 и 9, отразяващи точното хромозомно преустройство в семейството. Позицията на лентите на скъсване е показана с черни линии.

В заключение този случай илюстрира, че само цитогенетичният анализ понякога не е достатъчен, за да се определят реципрочни хромозомни аберации, дори когато те са с големи размери. Наличието на инверсии може допълнително да усложни точното определяне на тези преустройства. Полиморфната инверсия на 9 - та хромозома в нашия случай действително затрудни интерпретацията на кариотипа. Известно е, че най-мощният метод за определяне на патологични дисбаланси при пациенти с множествени вродени аномалии и цитогенетично балансиран кариотип е молекулното кариотипиране. Все пак трябва да се има предвид, че в някои случаи е необходим повече от един молекулно-цитогенетичен метод, за да се разкрият хромозомните преустройства. Първоначалното заключение, че се касае за полиморфна инверсия на хромозома 9 се реинтерпретира, тъй като се установи, че се касае за фамилна реципрочна транслокация между 8 и инвертираната 9 хромозома с бащин произход. Същата транслокация е установена и при сестрата на пробанда. Фенотипът на пробанда е резултат от небалансирана сегрегация тип adjacent 1 по време на първото мейотично делене.

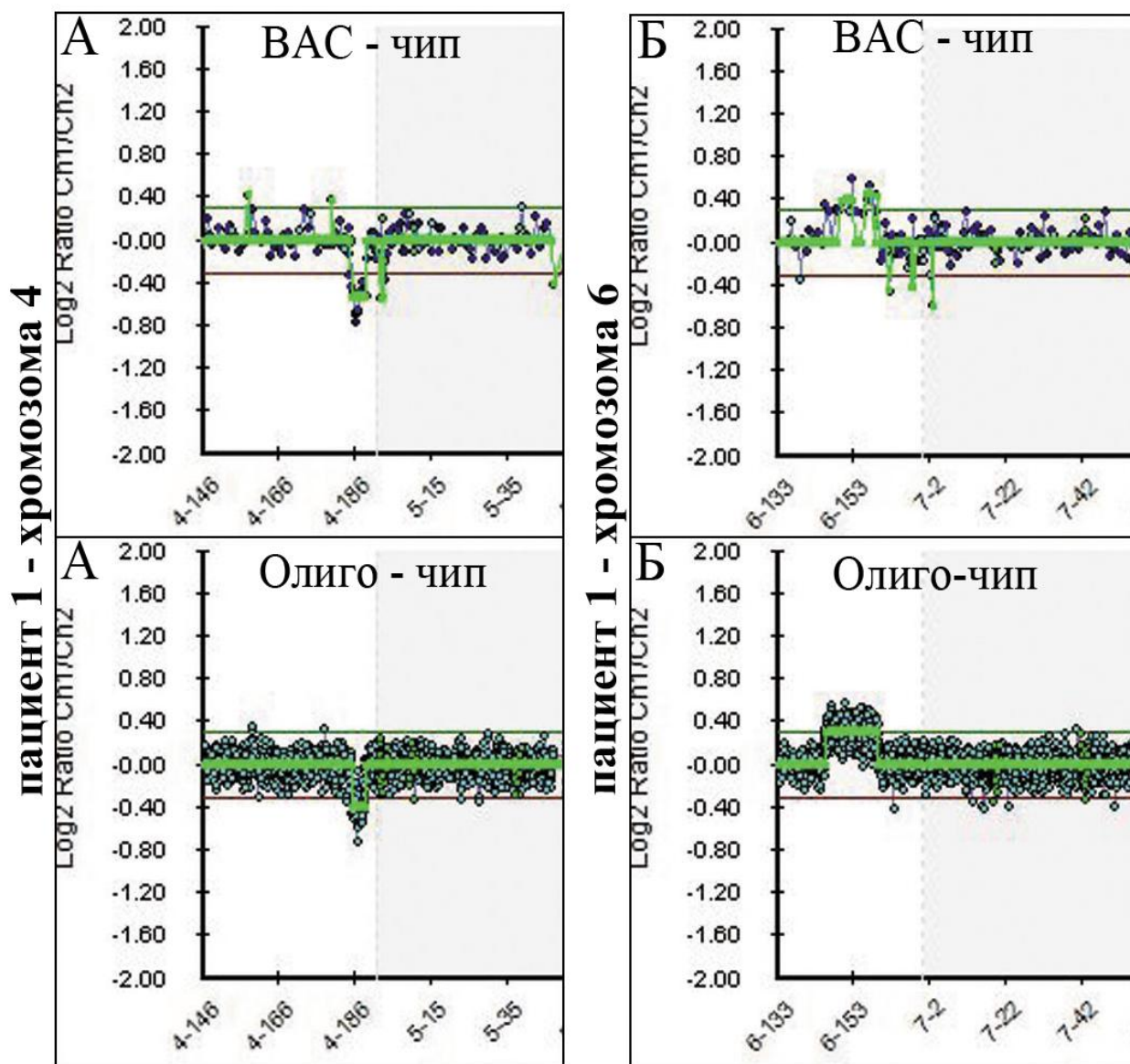
Идентифицирането на подлежащите хромозомни преустройства спомогна за изясняване на диагнозата на пациента и даде възможност да се определи точният репродуктивен риск в това семейство, да се предостави адекватна генетична консултация и евентуална пренатална диагностика за бъдещите бременности в семейството.

4. Анализ на диагностичните възможности на 2 различни микрочипови платформи - BAC - чипове срещу олиго - микрочипове

В нашето проучване 6 пациента са изследвани последователно с BAC - и олиго - микрочипове с цел да се сравнят диагностичните възможности на двете платформи. При почти всички пациенти е установено несъвпадение на резултатите от двата формата. Размерите на детектираните от BAC - анализа геномни дисбаланси варират от 2,564,097 bp до 11,410,676 bp, съответно от олиго - анализа от 3,615,123 bp до 22,764,514 bp (Табл. 7, стр. 44, Раздел III, т.7). Всички патологични региони са валидирани посредством FISH анализ със специфична BAC - сонда. При Пациент 3 BAC - платформата дори пропусна дупликация с размер от 21,360,000 bp. Най-вероятната причина за този пропуск е ниският процент на хибридизация и по-ниската чувствителност на BAC - микрочипа. Началните и крайните позиции на геномните преустройства също се различават при двете техники, което най-вероятно се дължи на по-голямата плътност на олиго-чиповете и по-високото покритие на генома. Единствено при Пациент 1 резултатите от

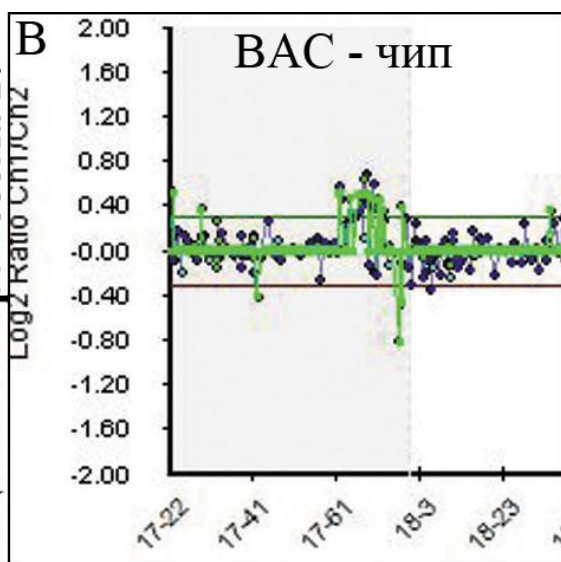
двата анализа са сравними за патологичния регион в 4-та хромозома. По-голямата част от ВАС - чиповете не покриват QC - показателите, поради висок технически шум. Най-вероятно това се дължи на недостатъчно добри условия на хибридизация и промиване. Получени са шумни геномни профили, което затруднява изключително коректната интерпретация на резултатите. На Фигура 29 е показано сравнение на геномните профили на установените патологични CNVs между ВАС и олигочиповата платформа.

При всички случаи олигочиповата платформа показва по-висок процент на хибридизация, по-добро съотношение на интензитета на сигнала (SBR) спрямо фоновия шум, по-ясно определяне на стартовата и крайната позиция на засегнатите региони.

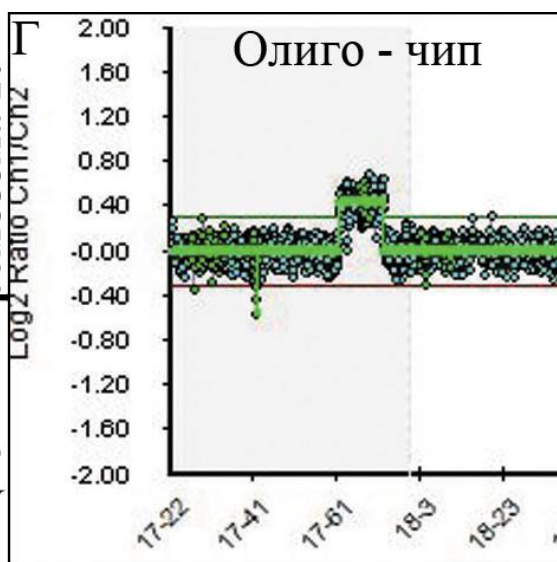


продължена

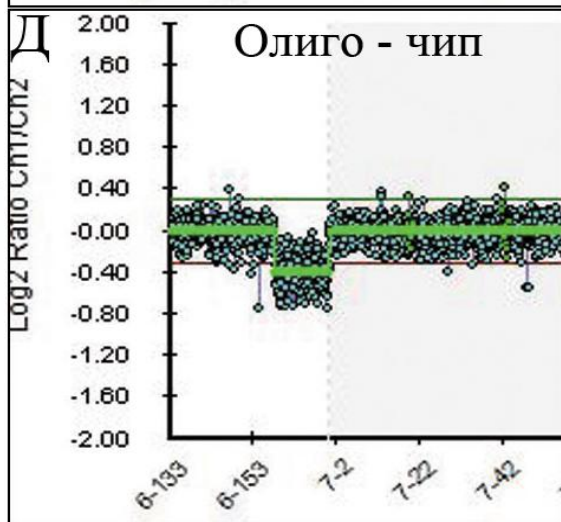
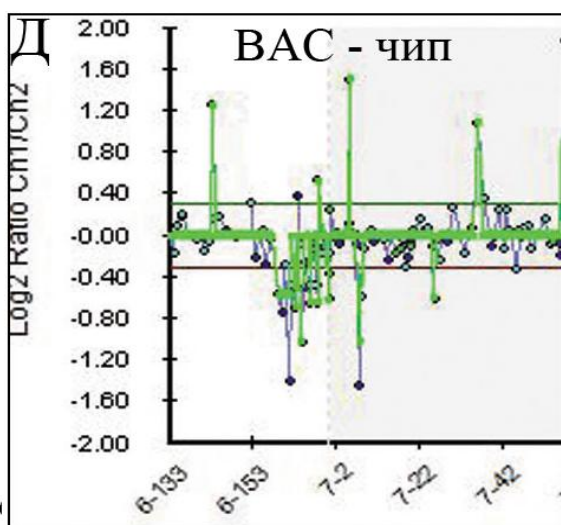
пациент 2 - хромосома 17



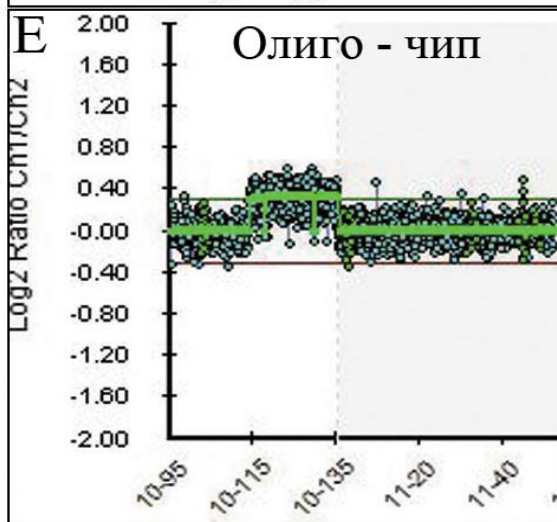
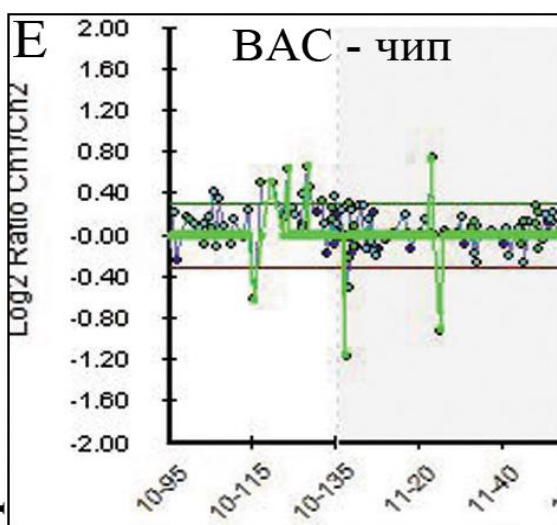
пациент 2 - хромосома 17



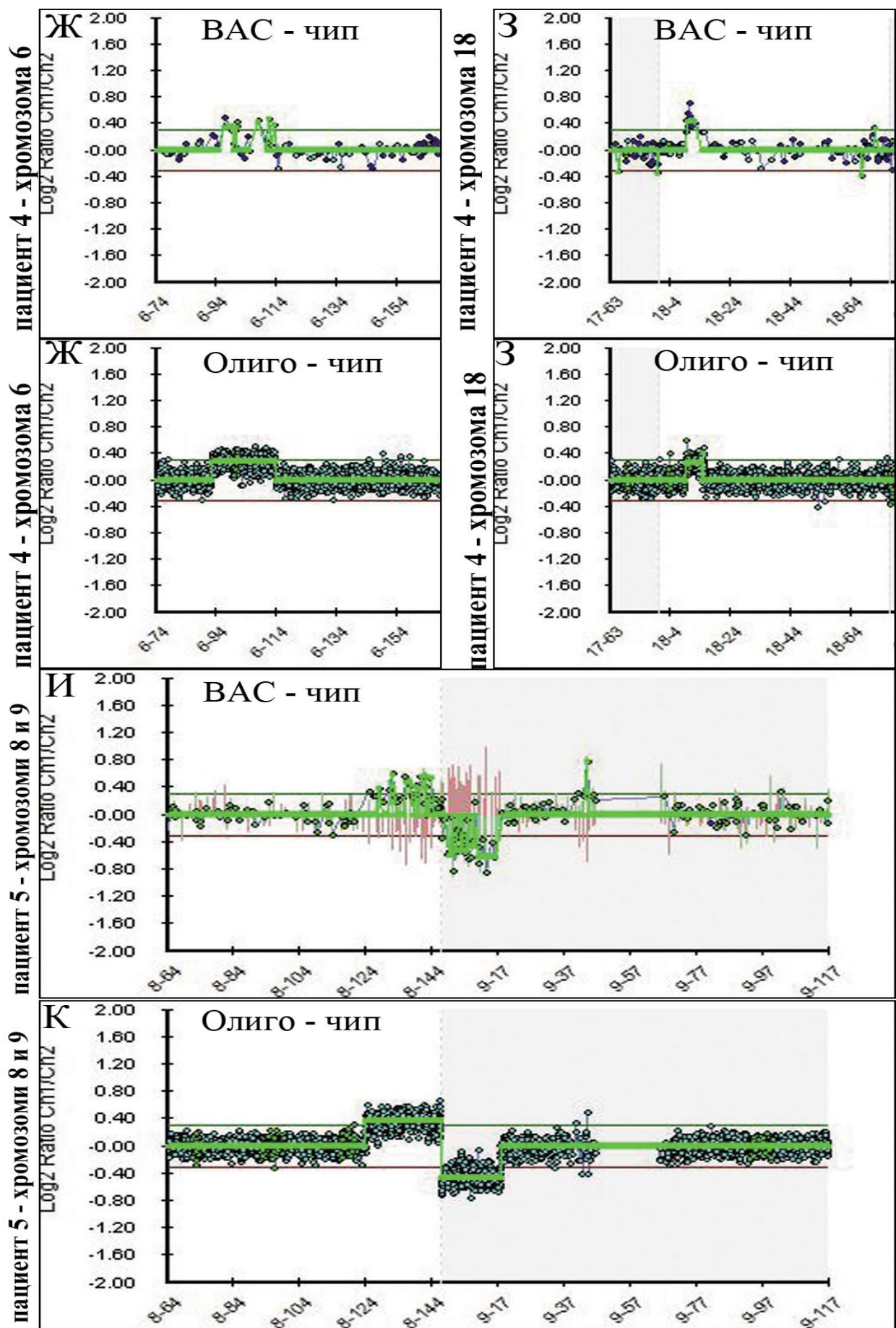
пациент 3 - хромосома 6



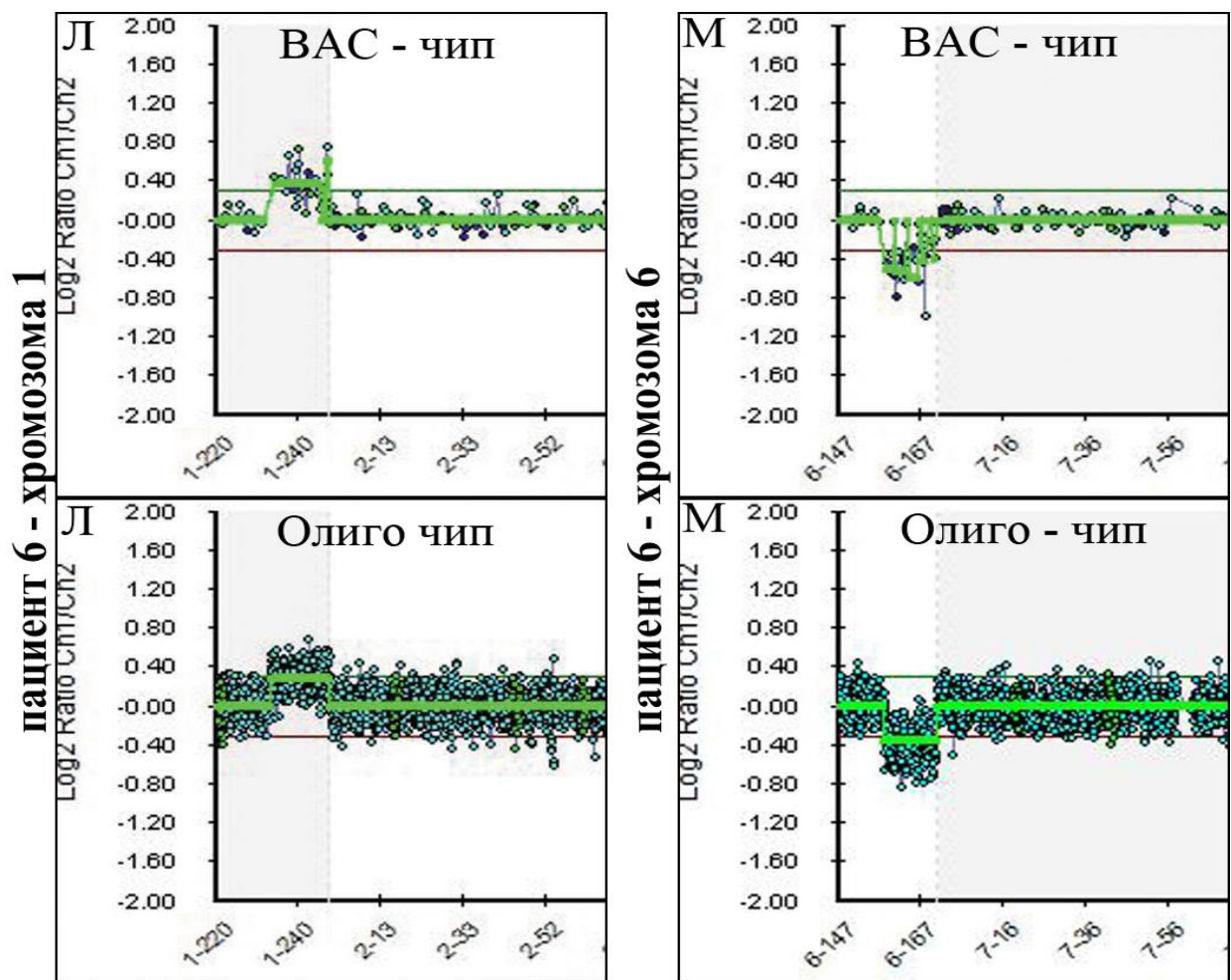
пациент 3 - хромосома 10



продължена



продължена



Фигура 29. Сравнение на геномните профили на патологичните региони, установени от ВАС - и олиго - микрочиповия анализ. Пациент 1: А). Показан е геномният профил на засегнатите региони от в 4-та хромозома от ВАС и олиго-микрочиповия анализ; Б) Геномни профили на 6-та хромозома от двете платформи. Ясно се вижда разликата в стартовата и крайната позиция на патологичните региони. **Пациент 2:** Геномен профил за патологичния вариант в 17-та хромозома от двете платформи. И двете платформи отчетоха дупликация в дългото рамо на 17 хромозома, но засегнатия район в 17 хромозома след анализа на олиго-чипа се оказа с по-големи размери. В) ВАС - чип; Г) Олиго - чип. **Пациент 3:** Д) Геномен профил за патологичните варианти в 6-та от двата вида анализ; Е) Геномен профил за патологичния вариант в 10-та хромозома. Поради силният фонов шум и ниския процент на хибридизация ВАС чипът не регистрира дупликацията в 10 хромозома. **Пациент 4:** Ж) Геномен профил от ВАС - чипа за 6-та хромозома от двете платформи - силният фонов шум доведе до погрешна интерпретация на размера на патологичните варианти; З) Геномен профил за патологичния вариант в 18-та хромозома от двете платформи - стартовата и крайната позиция, установени от олиго анализа се различаваха от определените с ВАС анализа. **Пациент 5:** И) Геномен профил за патологичните варианти в 8 и 9 хромозома от ВАС анализа - фоновият шум възпрепятства определянето на точния размер на установените патологични CNVs; К) Геномен профил на хромозоми 8 и 9 от олиго чипа. **Пациент 6:** Данните от двете платформи имаха най-голямо съвпадение при Пациент 6. Резултатите от ВАС анализа покриваха QC параметрите, така че геномните профили бяха с добро качество и лесни за интерпретиране. Л) Геномен профил на патологичните региони от ВАС и олиго - анализа на 1-ва хромозома; М) Геномен профил на патологичния регион в 6 хромозома от двата вида анализа.

Понастоящем се натрупват все повече доказателства, че олиго - чиповете представляват по-добра алтернатива на ВАС - чиповете. В момента олиго - платформите предлагат най-високата резолюция и превъзхождат ВАС - чиповете при геномния скрининг за CNVs в медицинската генетика. Днес микрочиповите технологии вървят в посока на олиго - чиповете, макар че ВАС - чиповете все още ще намират приложение при метилационните проучвания.

В обобщение нашите данни показват, че олиго-базираните чипове не само представляват добра алтернатива на ВАС - микрочиповете, но и имат значителни предимства - по-висок процент на хибридизация (100% във всички случаи), по-добра възпроизводимост, по-голяма чувствителност и резолюция, позволяваща детекцията на минимални региони с полиморфни и патологични промени. Преминването към олиго - микрочипов анализ ще осигури по-голяма резолюция, позволяваща детекцията на по-малки геномни дисбаланси и ще подобри качеството на молекулното кариотипиране за целите на клиничното му приложение.

V. Заключение

Проблемът с вродените дефекти на развитието е особено актуален, като се има предвид високата честота на вродените дефекти на развитието (3-5%), високия им относителен дял (33%) в неонаталната детска смъртност, значителната им етиологична хетерогенност и затруднена диагноза. При около 40% от случаите етиологията остава неизяснена. Смята се, че голяма част от тези случаи се дължат на все още неидентифицирани генетични дефекти.

В постгеномната ера включването на нови методични подходи е обещаващо за по-доброто разбиране на тази група вродена патология. Един от най-съвременните методи за скриниране на небалансирани количествени промени в генома е сравнителната геномна хибридизация (СГХ) върху микрочипове. Тази технология е доказала високата си чувствителност при идентифициране на кандидат-гени за много от туморните заболявания при човека. През последните години тенденцията е да се прилага за откриване на кандидат-гени при човешки заболявания с неясна етиология. Информацията, която се набира от тези проучвания ще даде силен тласък върху изследванията на процесите на ембриогенезата.

В настоящото проучване предварителната група включваше общо 98 деца от двата пола, селектирани в клинична обстановка след щателен подбор за изключване на етиологично разпознати дефекти на развитието. При генетичното изследване на пациентите се приложи комбинация от методи - цитогенетичен анализ, молекулно-цитогенетичен анализ с FISH метод, ДНК микрочипов анализ с олигонуклеотидни и BAC - чипове.

От предварителната група, след цитогенетичен анализ, при 11 пациента установихме хромозомна болест. При 6 пациента с FISH анализ се доказва микроделеционен синдром. От останалите 81 пациента след прилагането на строги критерии (съчетание на вродени малформации, дисморфични стигми и поведенчески нарушения, както и на пациенти с множествени аномалии и наличие на поне една голяма аномалия) за микрочипов ДНК анализ се селектираха 52 пациента. Шестима от пациентите са изследвани последователно с BAC - и олиго - микрочипове с оглед сравняване на диагностичните възможности на двете платформи.

Резултатите от микрочиповия анализ разкриха категорично етиологията при 9 от 52-мата изследвани пациенти, при които се намериха 15 патологични аберации. Всички патологични находки са валидирани с FISH анализ. Потвърдени са различни генотип/фенотипни корелации при отделните пациенти. В допълнение при мнозинството от изследваните (41 пациента) открихме нормални вариации в броя копия и вариации с неясно клинично значение (34 пациента). Направен е анализ на типа и

разпределението на различните варианти и е обсъдено клиничното значение на вариантите с неясен характер.

Молекулното кариотипиране се очертава като изключително подходящ метод за генетичното диагностициране на пациенти с неясни дисморфични синдроми и интелектуална недостатъчност. То може успешно да замести цитогенетичното изследване и да се прилага като пръв метод на избор.

Бъдещи насоки

Нашите резултати показват предимствата на високорезолютивните чипове при клиничната диагностика на пациенти с интелектуална недостатъчност и вродени малформации, но също така подчертават нуждата от задълбочени популационни проучвания върху разкриването на молекулната природа и клиничното значение на различни CNVs и от създаването на подробни карти на вариациите в българската популация. Това би улеснило изключително много прецизната интерпретация на специфични геномни дисбаланси в клиничен аспект и би улеснило широкото въвеждане на микрочиповата диагностика в практиката не само за постнатална диагностика на индивиди с изоставане в развитието и дисморфизъм, но също така и за пренатална генетична диагностика.

VI. Изводи

1. Установена е 17,3% честота на патологични микроструктурни аберации чрез молекулно кариотипиране на пациенти с неясни малформативни синдроми, съчетани с интелектуална недостатъчност.
2. Открити са за първи път пет комбинирани микроструктурни делеции и дупликации:

arr 4q35.1q35.2(184,626,382-188,241,505)x1, 6q24.2q25.3(145,093,143-159,086,577)x3;
arr 6q25.3q27(157,888,732-170,867,418)x1, 10q25.2q26.3(113,995,737-135,356,694)x3;
arr 6q16.1q21(92,548,327-113,881,461)x3, 18p11.22p11.21(8,698,309-14,178,151)x3;
arr 1q42.3q44(232,841,378-247,190,744)x3, 6q25.3q27(158,168,855-170,753,136)x1;
arr 1q43q44(236,642,045-247,190,744)x1, 6q25.3q27(158,902,925-170,780,979)x3.
3. Доказани са три редки патологични варианти:

arr 17q24.2q25.2(61,609,811-72,383,563)x3;
arr 4q21.1q21.22(82,592,957-84,293,873)x1;
arr 17p11.2(16,450,773-20,372,588)x1.
4. В селектирана група от български пациенти с вродени малформации са доказани 232 CNVs - 124 нормални CNVs и 108 CNVs с неясно клинично значение (среден брой CNVs на пациент - 4.5).
5. Установени са генотип/фенотипни корелации между SLC25A4 и хипертрофичната кардиомиопатия, DMRT1 и половата диференциация; TULP4, CEP112, CEP170, SDCCAG8, AKT3, HNRPU и хипоплазията на корпус калозум и микроцефалията; DOCK8, KANK1, RASGEF1, PRKG2, STXBP5, PPP1R14C, PRKC, EXOC7, POU3F2, SIM1 и интелектуалната недостатъчност, PRKG2 и изоставането в растежа.
6. Стеснен е критичния регион за 4q21 микроделеционния синдром до 1.134 Mb, в геномна позиция от 82,048,224 до 83,182,488 bp.
7. Микрочиповият анализ може да замести конвенционалното кариотипиране и да се прилага самостоятелно без предварителен цитогенетичен анализ.
8. Установено е, че с олиго-базираните чипове се постига по-висок процент на хибридизация (100% при всички изследвани проби), по-добра чувствителност и по-точно определяне на микроструктурните вариации в сравнение с ВАС – микрочиповете.

VII. Приноси

Приноси с научен характер

1. Открити са нови микроструктурни изменения участващи в етиологията на вродените малформации.
2. Установени са честотата и типа на нормални вариации и варианти с неясно клинично значение при селектирана група български пациенти с вродени малформации.

Приноси с приложен характер

1. Оптимизиран е методът на олиго-базирания микрочипов ДНК скрининг и е въведен за диагностика за първи път при селектирана група от български пациенти с вродени малформации.
2. Прилагането на комбинация от молекулно кариотипиране и FISH анализ осигурява правилна оценка на репродуктивния риск и профилактика при дисморфични синдроми.
3. Създадена е ДНК банка от пациенти с вродени малформации и част от техните родители, която е добра база за бъдещи изследвания със следваща генерация секвениране.
4. Направена е препоръка към Програмата „Редки болести” на МЗ за прилагането на микрочиповия ДНК анализ като първи метод на избор при диагностиката на пациенти с вродени малформации и интелектуална недостатъчност.

VIII. Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд

Научни публикации във връзка с дисертационния труд

1. **С. П. Хаджидекова**, Д. М. Авджиева – Тзавелла, И. И. Димова, Б. Б. Рукова, Д. В. Нешева, Р. С. Тинчева, В. С. Божинова, Д. И. Тончева. Частична тризомия (1)(q42.3q44) и монозомия (6)(q25.3q27), разкрити с микрочипова геномна хибридизация при дете с неясен малформативен синдром. Педиатрия. 2010;1:30-32.
2. **Hadjidekova S** and Toncheva D. Array-based comparative genomic hybridization application for revealing genomic micro-imbalances in congenital malformations. BJMG. 2009;12 (1):3-8.
3. **Hadjidekova SP**, Rukova BB, Avdjieva DM, Nesheva DV, Tincheva RY, Toncheva DI. Comparison of two microarray CGH platform for genome-wide Copy Number Profilings: oligo-based arrays versus bacterial artificial chromosomes arrays. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 2011; 25(3): 2499-2504.
4. **Hadjidekova SP**, Rukova BB, Avdjieva DM, Nesheva DV, Hadjidekov GV, Tincheva RY, Toncheva DI. Partial 9p monosomy and partial 8q trisomy by adjacent 1 segregation of balanced paternal translocation revealed by molecular karyotyping. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. In press.
5. Hadjidekov G., Kirova G., Minkov M., **Hadjidekova S.**, Vlassov V. L'apport de l'imagerie dans le bilan diagnostique chez un nourrisson de 3 mois avec hermaphrodisme vrai. J Radiol. 2007; 88 (1): 80-83.
6. **Хаджидекова С**, Тончева Д. Синдроми при дефекти на съседни генни – микроделеционни и микродупликационни синдроми. В. Геномна медицина. Медицинска генетика в постгеномната ера. П/Р Д. Тончева, 2010, с. 509-538.
7. Д. Авджиева, Р. Тинчева, **С. Хаджидекова**, Б. Б. Рукова, Г. Попова. Нешева, Р. С. Тинчева, В. С. Божинова, Д. И. Тончева. Ранна диагноза при дете със синдром на Angelman. Педиатрия. 2008;1:28-30.
8. **Хаджидекова С**, Тончева Д. Генетични методи за постнатална диагноза на хромозомни болести. В. Геномна медицина. Медицинска генетика в постгеномната ера. П/Р Д. Тончева, 2010, с. 318-332.
9. **Хаджидекова С**, Тончева Д. Пренатална диагностика (ПНД) на моногенни и хромозомни болести В. Геномна медицина. Медицинска генетика в постгеномната ера. П/Р Д. Тончева, 2010, с. 745-763.

Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд.

1. **Hadjidekova SP**, Avdjieva DM, Dimova IS., Betcheva ET, Rukova BB, Nesheva DV, Tincheva RY, Toncheva DI. Poster presentation: Genome-wide array-CGH screening in a patient with severe developmental delay and congenital abnormalities. Bulgarian-Japanese Symposium. Genomics and Proteomics in Personalized Medicine 2009; Sofia, Bulgaria, March 19-20, page 39, P1.16.
2. **Hadjidekova SP**, Avdjieva DM, Dimova IS., Betcheva ET, Rukova BB, Nesheva DV, Tincheva RY, Lalchev SG, Toncheva DI. Poster presentation: Detection of pathologic cryptic chromosomal imbalances by array- CGH in two patients with developmental delay and congenital malformation. 8th Balkan Meeting on Human Genetics 2009; Cavtat - Dubrovnik, Croatia, May 14-17, page 84, P141-GP.
3. **Hadjidekova SP** and Avdjieva DM, Dimova IS., Rukova BB, Nesheva DV, Tincheva RY, Toncheva DI. Poster presentation: Array CGH identified rare chromosomal micro-imbalances in three patients with congenital malformations and mental retardation. 4th Eastern European Conference for Rare Diseases and Orphan Drugs "Together for Integrative Approach to Rare Diseases" 2009; Plovdiv, Bulgaria, 13-14 June, page 150, P7.
4. **Hadjidekova SP**, Avdjieva DM, Dimova IS., Rukova BB, Nesheva DV, Tincheva RY, Toncheva DI. Poster presentation: Molecular karyotyping provides etiological diagnosis in two malformative patients with blurred chromosomal aberrations. European Human Genetics Conference 2010; Gothenburg, Sweden, 12-15 June, p.70: P02.051.
5. **Hadjidekova SP**, Avdjieva DM, Rukova BB, Nesheva DV, Dimova IS, Tincheva RY, Toncheva DI. Poster presentation: Molecular karyotyping identified pathogenic CNVs in 3 patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies. European Human Genetics Conference 2011; Amsterdam, Netherlands, 28-31 May, p136: P03.025.

IX. Благодарности

Благодаря сърдечно:

- на научния си ръководител професор д-р Драга Тончева за помощта при изработването, написването и оформянето на настоящата дисертация, за възможността да работя в база с най-съвременни технологии в почти всички области на геномиката и молекулярната биология, за подкрепата и доверието в мен през последните 10 години,
- на колегите ми от Катедрата по Медицинска генетика за моралната подкрепа, приятелската атмосфера и помощ в лабораторната работа,
- на Блага Рукова за ценните съвети и безрезервната подкрепа, надхвърлящи професионалните задължения,
- на д-р Даниела Авджиева-Тзавелла за помощта при набирането на пациентите,
- на всички пациенти и техните родители за съдействието при реализирането на този научен труд,
- на семейството ми - Георги, Васко, майка ми, баща ми, сестра ми Ася, на родителите на съпруга ми, на баба ми и дядо ми, на дядо Борис - за любовта, за компромисите, за подкрепата във всички начинания и за това, че винаги са до мен.

X. Summary

Microstructural genomic imbalances in patients with congenital malformations

The problem of congenital malformations is a particularly topical issue, given the high frequency of congenital defects of development (3-5%), their high average share (33%) in neonatal infant mortality, the significant etiological heterogeneity and their difficult diagnosis. Approximately in 40% of the cases the aetiology remains unclear. It is believed that many of these cases are due to yet unidentified genetic defects.

The inclusion of new methodological approaches holds promise for better understanding of this congenital abnormality group in the post genomic era. One of the most modern methods for screening unbalanced quantitative changes in the genome is the microarray comparative genomic hybridization (array CGH). This technology has proven its high sensitivity in identifying candidate genes for many human tumors. The recent years trend is to use this technology for the detection of candidate genes for human diseases of unknown etiology.

In the current study, the preliminary group included 98 children of both sexes, selected in a genetic clinic after a rigorous sampling was performed to exclude recognized etiological development defects. In our genetic study of patients with congenital malformations a combination of methods was applied - cytogenetic analysis, molecular cytogenetic analysis by FISH method, DNA microarrays analysis of oligonucleotides and BAC - arrays.

After cytogenetic analysis in 11 patients from the preliminary group chromosomal disorders were found. In 6 patients microdeletion syndrome was proved with FISH analysis. 52 patients out of the remaining 81 patients were selected for array CGH analysis after implementing stringent criteria (a combination of congenital malformations, dysmorphic features and behavioral disorders, and patients with multiple abnormalities and the presence of at least one major anomaly). Six patients were examined consecutively with BAC - and oligo - microarrays to compare the diagnostic capabilities of both platforms.

The results of analysis of microarrays revealed definite etiology in 9 out of 52 patients tested. 15 pathological aberrations were found in them. All pathological findings were validated by FISH analysis. Different genotype / phenotypic correlations between different patients were confirmed. In addition, the majority of the patients tested (41 patients) showed normal variations in the number of copies and variations of unknown clinical significance (34 patients). Analyses of the type and distribution of the different variations was performed and the clinical significance of variants of unknown nature was discussed.

Molecular karyotyping is coming up as an extremely suitable method for genetic diagnosis of patients with unclear dysmorphic syndromes and intellectual

disability. It could successfully replace the cytogenetic study and be applied as a first method of choice.

Future development. Our results show the advantages of high resolution microarrays for clinical diagnosis of patients with intellectual disability and congenital malformations, but also highlight the need for extensive population studies revealing the molecular nature and clinical significance of different CNVs and the creation of detailed maps of variations in the Bulgarian population. This would facilitate greatly the precise interpretation of specific genomic imbalances in clinical aspect and would ease the widespread introduction of microarrays in diagnostic practice not only for postnatal diagnosis of individuals with developmental delay and dysmorphism, but also for prenatal genetic diagnosis.