



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА
РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, Д-Р, ДБН

САВИНА ПЕТРОВА ХАДЖИДЕКОВА

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

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”

Шифър 7.1.

Професионално направление: „Медицина”

Научна специалност: „Генетика”

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

София, 2011 г.

„It is an old experience that through her errors, Nature often grants us insights into her secrets which are otherwise a closed domain.”

„Отдавна се знае, че чрез грешките си, Природата често ни дарява прозрения към тайните си, които иначе са забулени в мистерия.”

A. Loewy and C. Neuberger

(от Über Cystinurie. Hoppe-Seyler's Physiol Chem, 43:338-354, 1904)

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.

Съдържание

Използвани в текста съкращения	vii
I. Въведение	1
II. Литературен обзор	4
1. Честота на вродените аномалии	5
2. Класификация на вродените аномалии	7
2.1. Класификация, базирана на времето на възникване	7
2.2. Хистологична класификация	8
2.3. Клинична класификация	9
2.4. Класификация, базирана на медицинските последици	10
2.5. Етиологична класификация	11
3. Време на възникване на вродените аномалии	12
4. Етиология на вродените аномалии	13
4.1. Генетични причини	14
4.1.1. Промяна на доза-зависимите гени	14
4.1.1.1. Хромозомни аберации	14
4.1.1.2. Микроделеционни и микродупликационни синдроми	15
4.1.1.3. Субтеломерни аберации	15
4.1.2. Други генетични механизми, асоциирани с вродени малформации	17
4.1.2.1. Моногенни дефекти	17
4.1.2.2. Импринтинг	17
4.1.3. Вариации в човешкия геном	18
4.1.3.1. Вариации в броя копия	19
4.1.3.2. Механизми на възникване на вариациите в броя копия	25
4.1.3.3. Популационна честота на вариациите в броя копия	29
4.1.3.4. Влияние на вариациите в броя копия върху фенотипа	31
4.2. Мултифакторни аномалии	34
4.3. Тератогенни фактори	34
4.4. Вродени малформации с неясна етиология	36
5. Подходи за генетична диагностика	38
5.1. Цитогенетичен анализ	38
5.2. Молекулно-генетични методи	40
5.3. Молекулно-цитогенетични методи	41
5.4. Микрочипови ДНК технологии	44
6. Профилактика на вродените аномалии	58
III. Цел и задачи	63
IV. Материали и методи	64
1. Участници в проучването	64
2. Биологични проби	65
3. Използвани методи	65

3.1.	Конвенционален цитогенетичен метод	66
3.2.	Фенол-хлороформна екстракция на високомолекулна ДНК от венозна кръв 69	
3.3.	Хоризонтална гел-електрофореза и спектрофотометрично измерване	71
3.4.	FISH анализ с локус-специфични проби	73
3.5.	Сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове.....	76
3.5.1.	Олигонуклеотидни микрочипове	76
3.5.2.	ВАС - микрочипове	87
V.	Резултати	94
1.	Подбор на пациенти	94
2.	Дизайн на експерименталната работа	94
3.	Цитогенетичен анализ.....	95
4.	Микрочипова СГХ.....	99
4.1.	Патологични вариации в броя копия.....	99
4.2.	Нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение	106
5.	Молекулно-цитогенетичен анализ с FISH	108
6.	Клинични фенотипи на пациентите с установени патологични CNVs.....	121
6.1.	Казус 1 - клиничен фенотип	121
6.2.	Казус 2 - клиничен фенотип	122
6.3.	Казус 3 - клиничен фенотип	123
6.4.	Казус 4 - клиничен фенотип	124
6.5.	Казус 5 - клиничен фенотип	125
6.6.	Казус 6 - клиничен фенотип	126
6.7.	Казус 7 - клиничен фенотип	126
6.8.	Казус 8 - клиничен фенотип	127
6.9.	Казус 9 - клиничен фенотип	128
6.1.1.	Сравняване възможностите на 2 различни микрочипови платформи - ВАС - чипове срещу олиго - микрочипове	129
VI.	Обсъждане	130
1.	Обсъждане на резултатите от цитогенетичния анализ	130
2.	Обсъждане на резултатите от микрочиповата СГХ	132
1.1.	Обсъждане на установените патологични вариации в броя копия.....	134
1.2.	Анализ на генотип/фенотипни корелации при пациентите с патологични вариации в броя копия	134
1.2.1.	arr 4q35.1q35.2(184,626,382-188,241,505)x1, 6q24.2q25.3(145,093,143- 159,086,577)x3.....	135
1.2.2.	arr 17q24.2q25.2(61,609,811-72,383,563)x3.....	137
1.2.3.	arr 6q25.3q27(157,888,732-170,867,418)x1, 10q25.2q26.3(113,995,737- 135,356,694)x3.....	140
1.2.4.	arr 6q16.1q21(92,548,327-113,881,461)x3, 18p11.22p11.21(8,698,309- 14,178,151)x3.....	143
1.2.5.	arr 8q24.13q24.3(123,500,361-146,264,874)x3, 9p24.2p23(153,161- 18,176,777)x1	146

1.2.6.	arr 1q42.3q44(232,841,378-247,190,744)x3, 6q25.3q27(158,168,855-170,753,136)x1	150
1.2.7.	arr 17p11.2(16,450,773-20,372,588)x1	153
1.2.8.	arr 4q21.21q21.22(82,592,957-84,293,873)x1	155
1.2.9.	arr 1q43q44(236,642,045-247,190,744)x1, 6q25.3q27(158,902,925-170,780,979)x3	157
1.3.	Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение	159
1.3.1.	Нормални вариации в броя копия	161
1.3.2.	Вариации с неясно клинично значение	164
3.	Обсъждане на резултатите от FISH анализа	169
4.	Анализ на диагностичните възможности на 2 различни микрочипови платформи - ВАС - чипове срещу олиго - микрочипове	173
VII.	Заклучение.....	179
VIII.	Изводи.....	181
IX.	Приноси	182
X.	Приложения	183
XI.	Литературни източници	200
	Декларация за оригиналност	224

Използвани в текста съкращения

Съкращения на кирилица

ВА	- вродени аномалии
г.с.	- гестационна седмица
ДНК	- дезокси - рибонуклеинова киселина
ДНТ	- дефекти на невралната тръба
ДС	- дихателна система
ЕЕГ	- електроенцефалограма
КдЛС	- синдром на Корнелия де Ланге
МКБ	- Международна Класификация на Болестите
мтДНК	- митохондриална ДНК
ПАК	- персистиращ артериален канал
ПД	- пренатална диагностика
СГХ	- сравнителна геномна хибридизация
СЗО	- Световна Здравна Организация
ССС	- сърдечно-съдова система
ХА	- хромозомна аберация
ЦГА	- цялостен геномен анализ
ЦНС	- централна нервна система

Съкращения на латиница:

array CGH	- array-based Comparative Genomic Hybridization (микрочипова сравнителна геномна хибридизация)
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)
CCD	- <u>C</u> harge- <u>C</u> oupled <u>D</u> evice (прибор със зарядна връзка)
CGH	- <u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization (сравнителна геномна хибридизация)
CHARGE	- <u>C</u> oloboma, <u>H</u> ear Defects, <u>C</u> hoanal <u>A</u> tresia, <u>R</u> etarded Growth and <u>D</u> evelopment, <u>G</u> enital Abnormalities, <u>E</u> ar Anomalies (колобома, сърдечни дефекти, атрезия на хоаните, изоставане в развитие, генитални аномалии, аномалии на ухото)
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- <u>d</u> iamidino-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)
dNTP	- <u>D</u> eoxyribonucleotides <u>T</u> riphosphate (деоксирибонуклеотид трифосфат)
DOP-PCR	- <u>D</u> egenerate <u>O</u> ligonucleotide <u>P</u> rimed <u>P</u> CR (полимеразна верижна реакция с дегенерирали олигонуклеотидни праймери)
dUTP	- <u>D</u> eoxyuridine <u>T</u> riphosphate (деоксиуридин трифосфат)
dCTP	- 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (2'-деоксицитидин 5'-трифосфат)
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 in <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization (флуоресцентна ин ситу хибридизация)
FoSTeS	- <u>F</u> ork <u>S</u> talling And <u>T</u> emplate <u>S</u> witching (инактивиране на репликационната вилка с превключване на матрицата)

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)
LCRs	- <u>L</u> ow <u>C</u> opy-number <u>R</u> epeats (ниско-повторени копия)
Mb	- <u>M</u> egabase (мегабаза)
MDA	- <u>M</u> ultiple <u>D</u> isplacement <u>A</u> mplification (множествена амплификация чрез отместване на пробата)
mFISH	- <u>M</u> ultiplex <u>F</u> ISH (мултиплексна флуоресцентна ин ситу хибридизация)
MLPA	- <u>M</u> ultiplex <u>L</u> igation-dependent <u>P</u> robe <u>A</u> mplification (множествена лигазно медирана амплификация на пробата)
MURCS	- <u>M</u> ullerian Duct <u>A</u> plasia, <u>R</u> enal <u>A</u> plasia, <u>C</u> ervicothoracic <u>S</u> omite <u>D</u> ysplasia (аплазия на Мюлерови канали, бъбречна аплазия, дисплазия на цервикоторакалния сегмент)
NAHR	- <u>N</u> onallelic <u>H</u> omologous <u>R</u> ecombination (не-алелна хомоложна рекомбинация)
NHEJ	- <u>N</u> on- <u>H</u> omologous <u>E</u> nd- <u>J</u> oining (не-хомоложно лигиране на терминални участъци)
OR	- <u>O</u> lfactorial <u>R</u> eceptor (олфакторен рецептор)
PAC	- <u>P</u> 1-plasmid <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome (P1 - плазмидна изкуствена хромозома)
PCR	- <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (полимеразна верижна реакция)
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)
SDS	- <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate (натриев додецил сулфат)
SG	- <u>S</u> pectrum <u>G</u> reen (зелен спектър)
SKY	- <u>S</u> pectral <u>K</u> aryotyping (спектрално кариотипиране)
SNPs	- <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphisms (единичен нуклеотиден полиморфизъм)
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)
STRs	- <u>S</u> hort <u>T</u> andem <u>R</u> epeats (къси тандемни повтори)
UPD	- <u>U</u> niparental <u>D</u> isomy (монородителска дизомия)
VACTERL	- <u>V</u> ertebral, <u>A</u> nal <u>A</u> tresia, <u>C</u> ardiac <u>D</u> efects, <u>T</u> racheoesophageal <u>F</u> istula, <u>R</u> enal <u>A</u> nomalies, <u>L</u> imb <u>A</u> nomalies (гръбначни аномалии, атрезия на ануса, сърдечни дефекти, трахеоезофагеална фистула, бъбречни аномалии, аномалии на крайниците)

Списък на фигурите в текста

Фигура 1. Относителен дял на различни етиологични фактори за появата на вродените аномалии.....	14
Фигура 2. Архитектура на субтеломерните региони.	16
Фигура 3. Вариации в човешкия геном.	19
Фигура 4. Различни класове NAHR.	27
Фигура 5. Схематично представяне на NHEJ.	28
Фигура 6. Схематично представяне на FoSTeS механизма.	29
Фигура 7. Схематично представяне на ефекта на промяната в CNVs върху фенотипа. .	32
Фигура 8. Развитие на технологиите през последните години.	38
Фигура 9. Резолуция на GTG бендинг - техниката при различни степени на хромозомна спирализация.....	40
Фигура 10. Разрешителни възможности на различните видове техники за генетичен анализ.....	42
Фигура 11. Схематично представяне на принципа на микрочиповата CGX.	48
Фигура 12. Електрофоретична оценка на качеството на изолираната ДНК.....	72
Фигура 13. Комбиниране на тестваната и контролната ДНК със сместа за белязване.	79
Фигура 14. Белязване, пречистване, комбинация, хибридизация, промиване и скениране на олиго-микрочиповете.	80
Фигура 15. Хистограма на зелената и червената флуоресценция.	84
Фигура 16. Софтуерен анализ на скенирания чип.....	85
Фигура 17. Пречистване, преципитация, хибридизация и скениране на ВАС микрочиповете.	90
Фигура 18. Алгоритъм при молекулно кариотипиране на пациенти с вродени малформации.....	95
Фигура 19. Кариограми на пациентите с установени отклонения в кариотипа, селектирани за микрочипов анализ.	98
Фигура 20. Разпределение на общия брой установени CNVs.....	99
Фигура 21. Геномни профили на хромозомите с установени патологични CNVs.	105
Фигура 22. Брой пациенти с нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение.	107
Фигура 23. FISH анализ на Пациент 1 и родителите.	110
Фигура 24. FISH анализ на Пациент 2 и родителите.	111
Фигура 25. FISH анализ на Пациент 3.....	112
Фигура 26. FISH анализ на Пациент 4.....	113
Фигура 27. FISH анализ на Пациент 5 и родителите.	115
Фигура 28. Цитогенетичен анализ на сестрата на Пациент 5.	116
Фигура 29. FISH анализ на сестрата на Пациент 5.....	117
Фигура 30. FISH анализ на Пациент 6.	117
Фигура 31. FISH анализ на Пациент 7.....	118
Фигура 32. FISH анализ на Пациент 8.....	119
Фигура 33. FISH анализ на Пациент 9 и родителите.	120
Фигура 34. Клиничен фенотип на Пациент 1.	122
Фигура 35. Клиничен фенотип на Пациент 3.	124
Фигура 36. Клиничен фенотип на Пациент 6.	124
Фигура 37. Клиничен фенотип на Пациент 5.	125
Фигура 38. Клиничен фенотип на Пациент 6.	126
Фигура 39. Клиничен фенотип на Пациент 9.	128

Фигура 40. Хромозомно разпределение на установените CNVs (патологични, нормални и с неясно клинично значение).	133
Фигура 41. Карта на делетирания регион в (4)(q21.21q21.22) (DGV, human genome build 36).	156
Фигура 42. Честота на установените CNVs, разпределени по размер и вариант.	161
Фигура 43. Честота на различните нормални CNVs в изследваната група.	162
Фигура 44. Нормални вариации в броя копия, установени при над 10% от изследваните пациенти.	163
Фигура 45. Вариации с неясно клинично значение, установени при над 5% от пациентите.	165
Фигура 46. Цитогенетичен и FISH анализ на участващите в геномното преустройство хромозоми в семейството на Пациент 5.	171
Фигура 47. Сравнение на геномните профили на патологичните региони, установени от ВАС - и олиго - микрочиповия анализ.	177

Списък на таблиците в текста

Таблица 1. Честота на вродени аномалии на 10 000 новородени за гр. София за периода 1980 - 2001 год.	5
Таблица 2. Време на поява на различни малформации.	13
Таблица 3. Честота на генетично-детерминирани болести.	14
Таблица 4. По-често срещани тератогени при човека.	35
Таблица 5. Необходими реактиви за белязане на 16 реакции за олиго-микрочипов анализ.	78
Таблица 6. Необходими разтвори за промиването на олиго-микрочиповете.	83
Таблица 7. Необходими реактиви за белязане на 16 реакции за ВАС-микрочипов анализ.	89
Таблица 8. Необходими разтвори за промиването на хибридизиралите ВАС-микрочипове.	92
Таблица 9. Пациенти с установени цитогенетични находки.	97
Таблица 10. Обобщени резултати с патологични находки, установени след микрочиповата СГХ.	100
Таблица 11. Брой и размери на установените нормални CNVs и CNVs неясно клинично значение.	107
Таблица 12. Находки от ВАС- и олиго-чиповия анализ при Пациенти 1, 2, 3, 4, 5, 6. ...	129
Таблица 13. Вариации с неясно клинично значение, съдържащи OMIM гени.	166

Списък на приложенията в текста

Приложение 1. Информация за пациента.	183
Приложение 2. Информирано съгласие за пациента.	184
Приложение 3. Информирано съгласие за родителите.	186
Приложение 4. Установени CNVs с нормален характер и неясно клинично значение (Таблица 14).	188

I. 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 [Minino et al., 2007; Petrini et al., 2002]. 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 [Cunniff et al., 1995; Czeizel & Sankaranarayanan, 1984].

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) [Findlay et al., 1998; Pergament et al., 2000; Thein et al., 2000] 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 резолюция. 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 [Vermeesch & Rauch, 2006].

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 [Димитрова, 2009; Калайджиева, 1998; Калайджиева et al., 2000; Ковачева, 2009; Мумджиев, 1994; Симеонов, 1989; Симеонов, 1991; Симеонов, 1993; Тинчева и сътр., 2006; Tinceva, 2006], но не са провеждани системни молекулно-генетични изследвания на целия геном. В литературата има съобщения за цялостен геномен анализ, но предимно на спорадични случаи [Dimova et al., 2008].

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.

II. Литературен обзор

Вродените дефекти, съгласно доклада на Световната Здравна Организация (СЗО) от 01.04.2010 год., представляват структурни или функционални дефекти, вкл. и вродените грешки на обмяната (ВГО), които присъстват при раждането, независимо че могат да се проявят и по-късно [Czeizel, 2005]. СЗО препоръчва термините вроден дефект (birth defect) и вродено разстройство (congenital disorder) да се използват като синоними [Castillo, 2007]. Между различните групи дефекти групата на структурните дефекти е най-голяма (60%) [Czeizel, 2005]. Десетата ревизия на Международната Класификация на Болестите (МКБ 10) включва вродените дефекти в Глава XVII “Вродени малформации, деформации и хромозомни аномалии”. Другите вродени разстройства като ВГО и наследствени болести на кръвта са класифицирани в други глави.

Съгласно доклад на СЗО от 2006 год. вродените аномалии са видими при раждането макроскопски морфологични (структурни) аномалии [WHO, 2006]. Те представляват първичен дефект на определена част от тялото, който води до промяна на структурата или конфигурацията на съседни или ембриологично свързани с нея други части на организма [Cohen, 1982]. В тази група не се включват несиндромните разстройства (интелектуални, зрителни, слухови), епилепсия, чести моногенни болести като хемоглобинопатиите, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназната недостатъчност, муковисцидозата, окулокутанния албинизъм, спиналната мускулна атрофия и вродените грешки на обмяната. Също така се изключват някои чести тератоген-индуцирани вродени дефекти, като вроден сифилис, вродена рубеола и вроден хипотиреоидизъм. В процес на подготовка е МКБ-11, която ще допринесе за по-ясно дефиниране на използваните термини. Към структурните аномалии спадат малформациите, деформациите, дисрупциите и хистологичните дефекти (аплазия, хипоплазия, хиперплазия, дисплазия), които са разгледани в текста на стр. 7, раздел II.2. Много често погрешно в практиката терминът малформация се използва като синоним на понятието вродена аномалия.

Голямата част от множествените малформации се съчетават и с умствена недостатъчност. Понастоящем е прието вместо доскоро употребяваният термин „умствена недостатъчност” да се използва „интелектуална недостатъчност” [Schalock et al., 2007].

1. Честота на вродените аномалии

Вродените аномалии могат да засегнат различни органи - ЦНС (централна нервна система), ССС (сърдечно-съдова система), ДС (дихателна система), ОДС (опорно-двигателна система), ГИТ (гастро-интестинални тракт). По данни на EUROCAT за периода 1980-2001 год. честотата на всички аномалии за град София е била 187.94/1000 (Табл. 1) [EUROCAT]. Според Европейската асоциация по перинатална медицина от 3% до 5% от новородените в България се раждат с вродени аномалии (2500-3500 новородени годишно при настоящата раждаемост от 70 000). Честотата на ВА при мъртвородените деца е още по-висока (около 15-20%) [Bauld et al., 1974; Vojtassak et al., 1999].

Таблица 1. Честота на вродени аномалии на 10 000 новородени за гр. София за периода 1980 - 2001 год.

ВА	ЖР ¹ (брой)	ФС ² (брой)	ПБ ³ (брой)	ЖР+ФС+ПБ (брой)	ЖР+ФС+ПБ (1/10 000)
Всички аномалии	640	40	39	719	187.94
ЦНС	86	32	24	142	37.12
Око	43	3	2	48	12.55
Ухо, лице и шия	78	3	3	84	21.96
ВСМ ⁴	250	3	2	255	66.65
Дихателна система	29	3	0	32	8.36
Цепки на устната и небцето	38	2	1	41	10.72
Храносмилателна система	182	3	4	189	49.40
Дефекти на коремната стена	18	2	3	23	6.01
Отделителна система	30	1	2	33	8.63
Полови органи	33	0	0	33	8.63
Крайници	81	7	3	91	23.79

продължена

ВА	ЖР ¹ (брой)	ФС ² (брой)	ПБ ³ (брой)	ЖР+ФС+ПБ (брой)	ЖР+ФС+ПБ (1/10 000)
Костно-мускулна система	106	3	2	111	29.01
Други аномалии	68	5	3	76	19.87
Генетични синдроми + микроделеции	3	1	1	5	1.31
ХА ⁵ , неклаифицирани другаде	55	1	5	61	15.94

¹ЖР=живородени; ²ФС = фетална смъртност; мъртвораждания след 20 г.с. (гестационна седмица); ³ПБ = прекъсване на бременността; ⁴ВСМ - вродени сърдечни малформации; ⁵ХА - хромозомни аберации

ВА, засягащи нервната система представляват най-голямата група с честота 10/1000 новородени, в сравнение с ВА на сърцето (8/10 000), отделителна система (4/1000) и на крайниците (1/1000). Останалите групи ВА общо имат честота 6/1000. Водеща роля (28%) за детската смъртност имат ВСМ (28%), последвани от аномалиите на ЦНС (15%) и аномалиите на ДС (12%) [CDC; EUROCAT].

Проучване на Sakić и Sofradzija сред контингент от общо 47 980 новородени деца в региона на Сараево за периода 1990-1999, установява честота 286/10,000 с тенденция на нарастване на честотата на ВА с годините [Sakic & Sofradzija, 2002].

В популационно базирано проучване в региона на Северна Италия за 1999 год. се установява честота на ВА - 204.9/10 000 [Tagliabue et al., 2007]. Според данни на Harper P. 2-3% от новородените в Канада се раждат с тежка ВА

В Турция Tuncbilek и сътр. определят за периода юли 1993-юли 1994 обща честота на вродени малформации 36.5/1000 [Tuncbilek et al., 1999].

По данни на Czeizel и сътр. за 1980 год. в Унгария е установена честота на ВА 66.83/1000, между които честотата на тежките малформации е била 27.01/1000 [Czeizel, 2002; Czeizel et al., 1993]

Проучване на da Silva Costa и сътр. в Рио де Жанейро регистрира обща честота на ВА 1,7% с преобладаване на дефектите на невралната тръба [Costa et al., 2006].

По данни на Симеонов и сътр. при проучване на 25 752 новородени в София, Варна и Велико Търново, ВА се установяват при 1,56%. При мъртвородените е намерена честота 27,2%, а при живородените 1,30% [Симеонов, 1991].

В Плевенски регион при проучване на Ковачева за периода 1988-2006 год. са установени ВА при 2-3% от всички раждания, като най-честите аномалии са на ССС (4 до 6/1000), на ЦНС (3/1000) и крайниците (2/1000). Сред множествените аномалии при 26% са установени хромозомни и моногенни дефекти, като 39% са останали с неясна етиология [Ковачева, 2009].

В заключение след анализ на докладваните честоти от различните проучвания се смята, че 3-5% от всички раждания са с големи ВА и генетични заболявания като те имат водеща роля за детската смъртност в развитите страни [Minino et al., 2007; Petrini et al., 2002; Rosano et al., 2000].

2. Класификация на вродените аномалии

Въпреки че всички вродени аномалии са резултат на абнормно структурно развитие, подлежащата причина/механизъм, тежестта на аномалията и рискът от повторение са вариабилни. Вродените аномалии могат да бъдат класифицирани от гледна точка на времето на поява, хистологичната характеристика, клиничното и социалното им значение и етиологията им [Burton & Praveen, 2007].

2.1. Класификация, базирана на времето на възникване

Малформация

Малформациите представляват морфологичен дефект на орган, част от орган или част на тялото, дължащ се на първично нарушение на развитието. Те възникват обикновено в резултат на абнормен процес по време на ембриогенезата. Изключение правят някои аномалии на мозъка, на гениталиите и на зъбите, които могат да настъпят и през феталния период.

Дисрупция

Дисрупцията е морфологичен дефект на една или повече части на тялото, при която е налице деструкция на нормално формирани структури, в резултат на външна за ембриона причина. Например в резултат на срастване между амниона и фетални части се образуват на амниотични върви, които се прикрепят към различни части на тялото и пряко или чрез нарушаване на кръвообръщението могат да променят нормалния растеж

на тъканите и доведат до масивни увреждания, ампутации, тежки дефекти на коремната стена или черепа. Дисрупцията никога не се унаследява, но наследствени фактори предразполагат за нейното развитие.

Деформация

Деформацията е аномалия във формата или положението на част от тялото, причинена от механични въздействия. Тези аномалии възникват след органогенезата, във феталния период и са резултат на вторични механични причини, които могат да бъдат външни или вътрешни. Обикновено се засяга опорно-двигателния апарат, поради ограничаване на нормалните фетални движения. Чести външни причини за поява на деформации са олигохидрамнион, многоплодна бременност, миоми, анатомични дефекти като двурога матка и др. Вътрешни причини от страна на фетуса могат да бъдат различни неврологични заболявания или миопатии. Деформациите могат да претърпят спонтанна корекция след раждането.

2.2. Хистологична класификация

Някои аномалии имат характерни промени на клетъчно и тъканно ниво и могат да бъдат определени с хистологичен анализ.

Аплазия

Аплазията е липса на клетъчна пролиферация, водеща до липса на орган или морфологична структура, напр. бъбречна агенезия.

Хипоплазия

Хипоплазията е намалена пролиферация на клетки, водеща до недоразвитие на орган или морфологична структура, напр. белодробна хипоплазия.

Хиперплазия

Хиперплазия е висока пролиферация на клетки, водеща до свръхрастеж на орган или морфологична структура.

Дисплазия

Дисплазията се характеризира с абнормна клетъчна организация на определена тъкан в цялото тяло, напр. синдрома на Марфан, конгениталната ектодермална дисплазия, скелетни дисплазии. Повечето дисплазии имат генетична природа.

2.3. Клинична класификация

2.3.1. Изолирани дефекти

Изолираните дефекти съставят най-голямата група от вродените дефекти и засягат само една система или регион на тялото, напр. цепки на устната/небцето, вроден сърдечен дефект. Тези аномалии обикновено имат мултифакторна етиология и рискът за повторение е нисък.

2.3.2. Множествени аномалии

2.3.2.1. Малформативни синдроми

Синдромът представлява повтаряща се комбинация от вродени аномалии, засягащи две или повече ембриологично различни части на тялото, които се проявяват заедно по определен модел. Обикновено етиологията е ясна, има сходна клинична картина и уточнен риск за повторение. Въпреки това е възможно при различни пациенти с един и същ синдром да има изразена клинична хетерогенност и етиологията да остане неясна в много случаи.

2.3.2.2. Асоциация

Асоциацията е комбинация от 2 или повече вродени малформации, засягащи различни части на тялото, които често се проявяват заедно по-често от очакваното, но им липсва достатъчно постоянство на съвместна проява, за да бъдат смятани за синдром и нямат добре дефинирана етиология. Патогенетичната връзка между тези аномалии не е ясна като при синдрома. Красноречив пример за асоциация е т.нар. VACTERL - асоциацията, комбинация от (Vertebral- вертебрални аномалии, Anal atresia –атрезия на ануса, Cardiac defects - сърдечни дефекти, Tracheoesophageal fistula - трахеоезофагеална фистула, Renal anomalies - бъбречни аномалии, Limb anomalies - аномалии на крайниците). Това състояние обикновено има нисък риск за повторение и прогнозата зависи от броя и тежестта на малформациите. Друга известна асоциация е

MURCS (Mullerian Duct Aplasia, Renal Aplasia, Cervicothoracic Somite Dysplasia) - аплазия на Мюлерови канали, бъбречна аплазия, дисплазия на цервико-торакалния сегмент.

2.3.2.3. Секвенция (Последователност)

Секвенцията е резултат от една първична аномалия или механичен фактор, което води до появата на няколко малформации или деформации, които се развиват последователно. Чест пример е Потър - секвенцията, при която първична бъбречна агенезия води до олигохидрамнион, деформитети на крайниците, плоско лице и белодробна хипоплазия. Подлежащата причина при повечето секвенции е неясна и рискът за повторение обикновено е нисък.

2.3.2.4. Политопни зонови дефекти

Това са дефекти, които засягат определени сомити на развиващия се ембрион. Те обхващат определени части на тялото, както и всички органи, които се развиват от засегнатият сомит.

2.3.2.5. Адитивни дисморфични синдроми

Адитивно-дисморфичните синдроми са случайна комбинация от една голяма и няколко малки аномалии, несвързани етиологично помежду си. Най - често се касае за съчетание на многофакторно обусловени дисморфични черти, които детето може да унаследи от свои родители [Симеонов, 1989].

2.4. Класификация, базирана на медицинските последствия

2.4.1. Големите аномалии

Големите малформации са анатомични дефекти, които са несъвместими с живота или водят до тежки функционални отклонения, напр. дефекти на невралната тръба (ДНТ), бъбречна агенезия, холопрозенцефалия и др. Те могат да бъдат подразделени на 2 категории: **летални** - в случай, че в половината от случаите водят до мъртво раждане или смърт до едногодишна възраст; **тежки** - аномалии, които без медицинска намеса са животозастрашаващи.

2.4.2. Малки аномалии

Малките вродени аномалии обикновено са козметични дефекти, които не изискват лечение и нямат лоша прогноза. Разграничаването на малките аномалии от нормалните варианти често е спорно и се базира на популационната честота. Нормалният вариант се среща при 4% или повече процента от хората, а малките аномалии имат популационна честота под 4%. Малките аномалии могат да имат и съществено медицинско значение, тъй като наличието им може да бъде индикация за съпътстващи големи аномалии, както и диагностично значение, насочвайки сигурно към определен специфичен комплекс от аномалии.

2.5. Етиологична класификация

През 2005 год. Wellesey и колектив предлагат много практична етиологична класификация на вродените аномалии за епидемиологични проучвания [Dolk et al., 2010; Halliday et al., 2010; Rankin, 2005; Wellesley et al., 2005].

- Хромозомни (Chromosome - C) - за микроскопски видими небалансирани хромозомни аномалии, напр. тризомии;
- Микроделеционни (Microdeletion - MD) - за всички субмикроскопски хромозомни аномалии, включващи микроделеции, монородителска дизомия и импринтинг мутации, напр. синдрома на Прадър-Вили или на Енджелман;
- Тератогени (Teratogens - T) - за известни тератогенни фактори и пренатални инфекции, напр. фетален алкохолен синдром, вродена цитомегаловирусна инфекция;
- Де ново възникващи доминантни мутации (New Dominant - ND), напр. синдрома на Аперт, ахондроплазия;
- Наследствени болести, неклассифицирани като de novo доминантни мутации (Familial - F), напр. туберозна склероза, синдрома на чупливата X хромозома;
- Синдроми (Syndrome - S) - разпознаваеми ненаследствени, не-хромозомни синдроми, напр. синдрома на Кабуки;

- Изолирани аномалии (Isolated - I) - за изолирани аномалии като гастросхизис, цепка на устната/небцето;
- Множествени аномалии (Multiple anomalies - M) - за множествени аномалии, засягащи повече от една система, без патогенетична връзка помежду им и с неясна етиология, напр. VACTERL - и MURCS - асоциациите.

3. Време на възникване на вродените аномалии

Познаването на нормалната ембриогенеза и причините за отклоненията в развитието на ембриона и фетуса са от изключително важно значение за медицинската практика и планирането на адекватни мерки за профилактика. Пренаталното развитие може да се раздели на три етапа:

- Преембрионален период (имплантационен етап) - обхваща периода от оплождането до края на втората седмица от бременността. Този етап започва при оплождането и формирането на зиготата, която се превръща в бластоцист в края на първата седмица. Характерно е наличието на плурипотентни и бързо делящи се клетки. Имплантирането на бластоциста завършва в края на втората седмица. Наличието на плурипотентни клетки е предпоставка за възникването на патологични изменения в този период. Въздействието на вредни фактори през този период може да доведе до оцеляване без неблагоприятни последици или до загиване на зародиша.

- Ембрионален период - от началото на третата седмица до края на осмата седмица от бременността. Ембрионалният етап е период на първичната тъканна диференциация и органогенеза. През третата седмица от бременността започва формирането на нотохорда и трите слоя на ембриона и развитието на органите. По време на следващите пет седмици (от четвъртата до осмата седмица от бременността) всички главни органи и системи на тялото се формират от трите зародишни пласта и заемат своето крайно местоположение. В края на този етап зародишът видимо придобива човешка форма. Поради формирането на всички основни външни и вътрешни структури през този период, това е най-критичният и уязвим период на развитие. Болшинството от тежките ВА са резултат от изменение на нормалното развитие през този период.

- Фетален период (период на развитие на плода) - от деветата седмица на бременността до раждането. Следва период на растеж, който се характеризира с бързо развитие на тялото, диференциация на тъканите и на органните системи. През този период фетусът е по-малко уязвим на действието на тератогенни агенти, но тези фактори могат да нарушат растежа и развитието на органите, като например мозъка и очите.

Въпреки, че малформациите най-често се формират през ембрионалния, респ. феталния период, това невинаги е така. Някои малформации, като цепка на мекото небце и хипоспадия, се появяват през феталния период, а други, като например персистиращия артериален канал (ПАК) - след раждането (Табл. 2) [Симеонов, 1993].

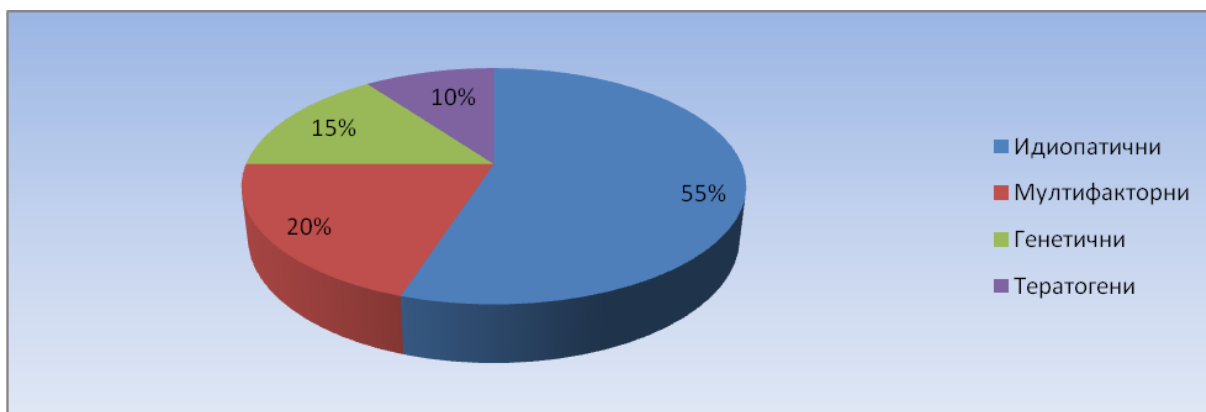
Таблица 2. Време на поява на различни малформации.

Период	Вид малформация
Ембрионален	Аненцефалия, полидактилия, цепка на твърдото небце
Фетален	Цепка на мекото небце
Перинатален	ПАК, крипторхизъм

Когато се говори за момент на настъпване на определена малформация, винаги се има предвид най-късния възможен срок на нейното развитие. До нейната поява могат да доведат различни увреждащи агенти при условие, че проявяват действието си не по-късно от определен момент на развитието [Симеонов, 1993].

4. Етиология на вродените аномалии

Причината за около 40-60% от физическите аномалии при хората е неизвестна. За около 20-25% се предполага мултифакторна генеза в резултат на взаимодействие между генетични и екзогенни фактори. Други 10-13% от дефектите се дължат изцяло на факторите на средата (инфекциозни и други заболявания или употреба на лекарства с тератогенен ефект по време на бременността). Само при 12-25% от аномалиите причините са чисто генетични причини. От тях най-голяма е групата на ХА (Фиг. 1) [Burton & Praveen, 2007; Kalter & Warkany, 1983a; Kalter & Warkany, 1983b; Nelson & Holmes, 1989].



Фигура 1. Относителен дял на различни етиологични фактори за появата на вродените аномалии.

4.1. Генетични причини

Генетичните фактори са отговорни за по-голямата част от вродените аномалии с изяснена етиология. Най-често се срещат промени в броя на половите хромозоми (30%), 25% са автозомните анеуплоидии, а останалите аберации са структурни хромозомни изменения [Burton & Praveen, 2007]. На Таблица 3 е представена честотата на генетично-детерминирани болести [Passarge, 2007].

Таблица 3. Честота на генетично-детерминирани болести.

Категория болести	Честота на 1000 индивида
Хромозомни аберации	5-7
Моногенни болести общо	5 - 17
Автозомно-доминантни	2 - 10
Автозомно-рецесивни	2-5
X - свързани	1 - 2

4.1.1. Промяна на доза-зависимите гени

Аберациите, водещи до промяна в генната доза, са честа причина за поява на вродени аномалии.

4.1.1.1. Хромозомни аберации

Хромозомните аберации могат да бъдат бройни или структурни, засягащи автозомите или половите хромозоми. Честотата на ХА сред новородените според

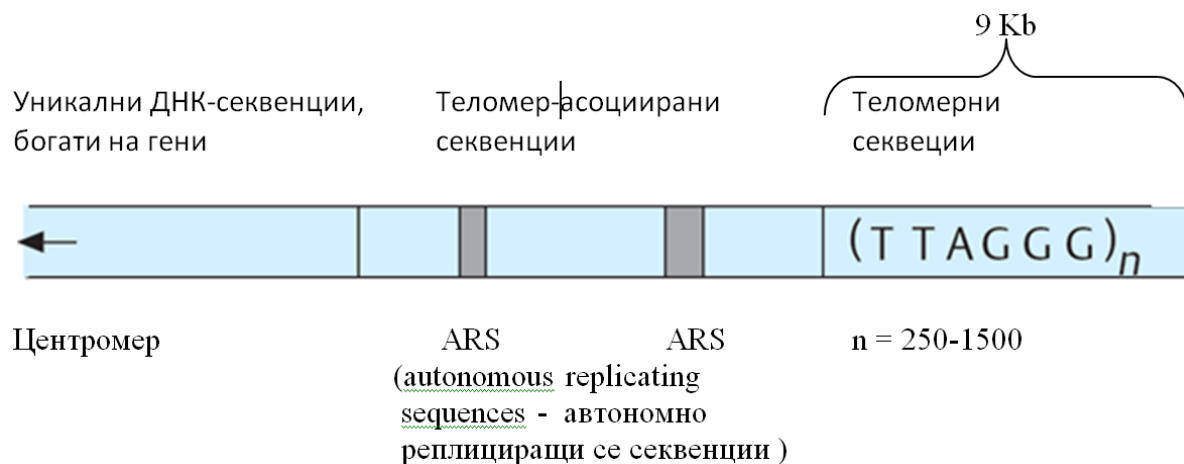
различни проучвания варира от 6.27 до около 20 на 1000 [Hansteen et al., 1982; J. L. Hamerton, 1975; Jacobs, 1974; Maeda et al., 1991]. При деца с т. нар. „хромозомен фенотип” (множествени вродени аномалии и интелектуална недостатъчност) се установяват ХА в много по-висок процент. Kenue и сътр. установяват абнормен кариотип при 41% [Kenue et al., 1995], а Mohamed M. Mokhtar при 38,7% от изследваните деца с множествени аномалии [Mokhtar, 1997]. Голяма част от по-често срещаните хромозомни синдроми, бройни и структурни, показват тясна взаимовръзка между фенотип и генотип и са лесно разпознаваеми клинично, напр. болестта на Даун, синдрома на Едуардс, синдрома на Патау, синдрома на Волф-Хиршхорн, синдрома на „котешкия плач”, синдрома на Търнър и др.

4.1.1.2. Микроделеционни и микродупликационни синдроми

Известна част от ХА остават неразкрити поради наличие на минимални хромозомни нарушения, които са под разрешителната способност на конвенционалните цитогенетични методи. Това се демонстрира при групата на т. нар. „микроделеционни/микродупликационни синдроми”. Микроаберациите могат да бъдат интерстициални или терминални, като размерите им са под 5 Mb и не се детектират при рутинен цитогенетичен анализ. Примери за микроделеционни/дупликационни синдроми са синдромите на Прадер-Вили, Ангелман, Ди Джорджи, Уилямс, Смит-Магенис, Милер-Дикер, WAGR, 17p11.2 дупликация, синдром на котешкото око, дицентрична 15 хромозома.

4.1.1.3. Субтеломерни аберации

В човешките теломери се намира особен вид теломерна минисателитна ДНК от тандемно повторени 6 нуклеотида (TTAGGG)_n, която е високо консервативна във всички гръбначни. Теломерите предпазват хромозомните краища от деградация и рекомбинация. Близко до теломерите се намира и друга фамилия, хипервариабилна минисателитна ДНК. Тези субтеломерни повтори не са консервативни при еукариотите и функцията им е неясна (Фиг. 2).



Фигура 2. Архитектура на субтеломерните региони.

Субтеломерните региони са относително богати на гени и често участват в хромозомни преустройства [Saccone et al., 1992]. В последните години се натрупа голям брой доказателства за участието на скрити субтеломерните ХА в етиологията на интелектуалната недостатъчност и вродените малформации. Субтеломерните райони са предилекционни места за възникване на нехомоложен кросинговър поради следните причини: 1) богати са на псевдогени и повторени секвенции и споделят висока хомоложност помежду си [Brown et al., 1990; Flint et al., 1997; Flint et al., 1996]; 2) в ранната профaza на мейозата хромозомите инициират сдвояването си от теломерите [Barlow & Hulten, 1996; Scherthan et al., 1996]; 3) при теломерите е установена по-висока честота на рекомбинация [Blouin et al., 1995].

Хромозомните краища не се багрят добре с боя на Гимза и се виждат като светли ленти при GTG-лентовото оцветяване (G-banding by Trypsin and Giemsa). Поради това малки преустройства в субтеломерните райони могат да останат незабелязани при рутинен хромозомен анализ.

Набор от субтеломерни FISH проби е представен през 1996 год. и допълнен през 2000 год. [Knight & Flint, 2000]. Докладвани са много проучвания върху субтеломерните аберации при пациенти с вродени малформации и интелектуална недостатъчност. По данни на Mariluce Riegel и сътр. субтеломерни аберации са открити при 5,1% от 254 деца с интелектуална недостатъчност, дисморфизъм и малформации [Riegel et al., 2001]. При проучване на Laura Rodriguez и сътр. върху кохорта от 71 новородени с вродени малформации субтеломерният скрининг намира при 9,86%

скрити субтеломерни преустройства [Rodriguez et al., 2008]. Подобни са данните и на Elga Belligni и сътр.- 13,16% [Belligni et al., 2009]. По-нисък процент (1,1%) на субтеломерни аберации е открит при изследване на 95 корейски пациенти с вродени малформации и интелектуална недостатъчност [Park et al., 2008].

4.1.2. Други генетични механизми, асоциирани с вродени малформации

4.1.2.1. Моногенни дефекти

Моногенните дефекти се срещат при новородени с честота 5-17‰. До момента при човека са известни повече от 3000 генетични болести, дължащи се на дефекти в един ген. За около 1900 болести е известен и молекулния дефект. Тези гени могат да бъдат доминантни или рецесивни, да са разположени на автозомни или полови хромозоми. Установено е, че честотата на автозомно-доминантните болести е 2-10‰, на автозомно –рецесивните 2-5‰, а на X-свързаните 1-2‰. Моногенните болести са каталогизирани в „Mendelian Inheritance of Man” (McKusick, 1998), достъпен онлайн (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim). При справка в OMIM (април, 2011) се реферират 646 моногенни болести с различни вродени малформации [NCBI]. Описани са различни видове патологични мутации като nonsense, missence, frameshift, splice, амплификация на тринуклеотидни повтори, причиняващи молекулни болести. Мутации, разрушаващи или променящи функцията на гени с основна роля по време на ранното ембрионално развитие, нарушават развитието на различни тъкани и органи и се проявяват като множествени вродени малформации.

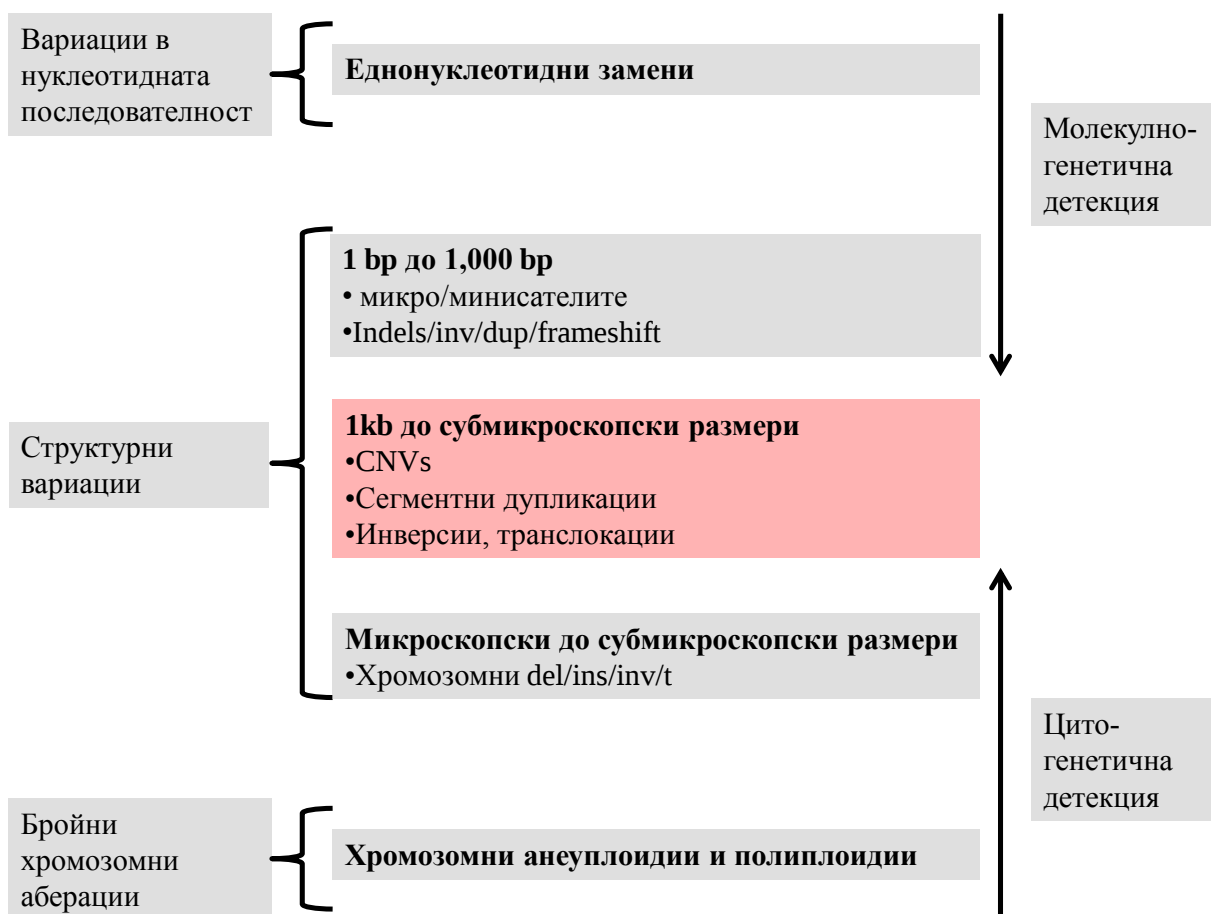
4.1.2.2. Импринтинг

Геномният импринтинг е епигенетично явление, уникално за бозайниците и е причина за отклонения от менделиращия тип на унаследяване. Представата от класическата генетика, че алелите на двамата родители се предават и експресират с еднаква вероятност в децата от двата пола, претърпява съществена корекция. Засега в човешкия геном са известни малък брой импринтирани гени, които се експресират в зависимост от родителския им произход. Генът получава печат за родителски произход при преминаване през герминативните клетки по време на мейозата. Дори когато нуклеотидната последователност на гена не е променена при унаследяване на два импринтирани алела възникват нарушения в генната функция. Импринтирани гени

могат да се включат в етиологията на заболявания при настъпване на следните изменения: микроделеция на нормално експресиран алел, UPD (Uniparental Disomy - монородителска дизомия), погрешен импринтинг сигнал. При човека са известни няколко заболявания, дължащи се на импринтирани гени като синдрома на Прадер-Вили (PWS, OMIM#176270), на Енджелман (AS, OMIM#105830), на Бекуит-Видеман (BWS, OMIM#130650), на Силвър-Ръсел (SRS, OMIM#180860), UPD на 14 хромозома.

4.1.3. Вариации в човешкия геном

На 14 април 2003 година, 50 години след откриването на структурата на двойната спирала на ДНК, лидерите на шест държави едновременно обявяват, че проектът за разчитането на човешкия геном е успешно приключен. Това заключение се основава на твърдението, че хората са 99,9% идентични в генетично отношение като главните разлики са за сметка на еднуклеотидни замени, представляващи 0,1% от генома. Тази научна догма претърпява съществена корекция, когато при две независими изследвания на група здрави индивиди чрез цялостен геномен скрининг се установяват стотици вариабилни региони [Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004]. Молекулното кариотипиране хвърли нова светлина върху явлението CNVs в човешкия геном, геномната архитектура и рекомбинационните механизми. Важна характеристика на геномната ДНК е, че голям участък от нея (30-60%) съдържа повторени ДНК последователности. Вариации в генома срещат под различни форми, като SNP's (Single Nucleotide Polymorphism - еднуклеотидни полиморфизми), повторени къси ДНК секвенции (микросателити, минисателити, малки (под 1 Kb) микроинсерции-делеции (indels), дупликации, инверсии и мутации променящи рамката на четене (frameshift) [Feuk et al., 2006] (Фиг. 3). Вариантите с размери от 1 до 1000 bp (Base Pairs) са най-разпространените в човешкия геном и заедно с SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) наброяват най-малко 10 милиона [Kruglyak & Nickerson, 2001].



Фигура 3. Вариации в човешкия геном.

4.1.3.1. Вариации в броя копия

В момента голям интерес се проявява към новооткрити вариации, известни като вариации в броя на копията (CNVs), което през 2007 година беше посочено от списание Science като „големия пробив“ [Pennisi, 2007]. Понастоящем CNV се дефинира като сегмент от ДНК, по-дълъг от 1 Kb, повторен вариабилен брой пъти в сравнение с референтен геном.

Интересът към CNVs се провокира и от наблюдението, че: 1) те могат да влияят на транскрипционната активност и транслационните нива на съседно разположени гени [Aldred et al., 2005; Gonzalez et al., 2005; Hollox et al., 2003; Linzmeier & Ganz, 2005; McCarroll et al., 2006; Perry et al., 2007; Stranger et al., 2007]; 2) от асоциацията на определени CNVs с различна предиспозиция към мултифакторни заболявания [Aitman et al., 2006; Fanciulli et al., 2007; Fellermann et al., 2006; Gamazon et al., 2011; Gonzalez et al., 2005; Hollox et al., 2008; Park et al., 2006; Yang et al., 2007]; 3) CNVs варират по

честота и тип между различните популации и могат да бъдат използвани като ценен източник на информация при проучването на генетичните характеристики на народите [Abyzov et al., 2011; Campbell et al., 2011; Fu et al., 2010; Itsara et al., 2009; Pinto et al., 2007]. Изучаването на молекулната природа на CNVs може да допринесе за запълване на празнините в знанията ни за нашето биологично минало, тъй като те са резултат от действието на естествения отбор.

Общоприетото в момента определение за CNV не изяснява клиничното им значение. Освен това може да се получи двусмислие, тъй като в традиционната цитогенетика терминът „вариант” означава промяна, която не е задължително да бъде клинично значима. Хромозомните хетероморфизми при човека, наричани още полиморфни варианти са известни още от първите цитогенетични изследвания и имат съществен принос при проучването на човешкия геном и популациите [Craig-Holmes & Shaw, 1971; Howard et al., 1975; Lubs et al., 1977; Miller, 2001]. Добре познати са вариациите в хетероблоковете на 1qh+,9qh+,16qh+, Yqh+ или Yqh-, общия и редкия тип хромозомна чупливост, сателитният полиморфизъм на акроцентричните хромозоми, както и някои полиморфни инверсии - inv(1)(p13q21), inv(2)(p11.2q13), inv(3)(p11.2q12), inv(3)(p13q12), inv(3)(p13q13), inv(5)(p13q13), inv(9)(p12q13), inv(10)(p11.2q11.2), inv(16)(p11.2q12.1), inv(Y) [Brothman et al., 2006; Miller, 2001]. Хетероморфизмът се обуславя от структурни варианти на хетерохроматина, дължащи се на различни повторени секвенции от сателитна ДНК. В по-широк смисъл полиморфните хромозомни варианти са част от общия генетичен полиморфизъм. В последните години прилагането на различни молекулни техники за геномен скрининг разкри различията в ДНК повторените секвенции, обуславящи хромозомния хетероморфизъм. С натрупването на огромно количество данни от мащабни асоциативни проучвания се изяснява и значението на различни CNVs, установяват се определени фенотип-генотипни корелации. Вследствие на това е възможно CNV, първоначално приемана за нормална, по-късно да се изясни, че повишава предразположението към дадена мултифакторна болест или е причина за генетично заболяване с късно начало или непълна пенетрантност. Поради това CNVs терминът обикновено се използва за описване на вариации в броя на повторите както при пациенти, така и при здрави

контроли, а също и за описване на геномни дисбаланси, причиняващи познати микроделеционни/микродупликационни синдроми.

За избягване на двусмислие CNVs могат да бъдат подразделени на нормални, патологични и варианти с неясно клинично значение [Feuk et al., 2006; Freeman et al., 2006; Lee et al., 2007a; Scherer et al., 2007]. Въпреки че до момента е получена огромна информация за клиничното значение на различни CNVs, все пак един значителен брой от геномните вариации остава с неясно клинично значение и с проблемна интерпретация.

В наши дни изследването на CNVs става много лесно благодарение на въвеждането на ДНК микрочиповите технологии, като се разграничават два формата - чипове за цялостен геномен анализ и таргетни чипове. В исторически план първите създадени чипове са таргетни, съставени от ВАС клонове (Bacterial Artificial Chromosome), покриващи райони с известни микроделеционни/микродупликационни синдроми [Cheung et al., 2005; Shaffer et al., 2006]. След тях се появяват чиповете за цялостен геномен анализ (ЦГА), съдържащи клонове от целия геном на определени интервали [Iafrate et al., 2004; Tyson et al., 2004]. По-късно академичните среди предлагат чипове, покриващи целия геном, но съставени от застъпващи се клонове, т. нар. "tilling" чипове [Erdogan et al., 2007; Tzschach et al., 2007]. Скоро след това се разработва нова високорезолютивна микрочипова платформа, съдържаща едноверижни олигонуклетидни фрагменти вместо ВАС клонове [Barrett et al., 2004; Friedman et al., 2006b; Selzer et al., 2005; Slater et al., 2005]. По-подробен преглед на възможностите на различните микрочипови платформи ще бъде направен по-долу в текста, стр. 50, раздел II. 5.4.2.

Прилагането на микрочиповете в диагностиката предизвиква полемика в научните среди. Оформят се два контрапункта - привърженици на таргетните чипове и привърженици на чиповете за ЦГА. Противниците на ЦГА-формата смятат, че огромното количество информация, което се получава за CNVs при пациент, е объркващо и трудно за интерпретиране в клиничен аспект, тъй като голям брой от CNVs се срещат и при здрави хора и все още са с неясно клинично значение. Поради тази причина те препоръчват приложението на ЦГА-чиповете да се ограничи до научно-изследователските проекти [Shaffer & Bejjani, 2006; Shaffer et al., 2006]. От

друга страна поддръжниците на ЦГА-чиповете смятат, че подходът за цялостен геномен анализ има съществени предимства: 1) подобно на цитогенетичния метод в единична реакция може да се скринира целия геном; 2) позволява изследването на пациенти, чието заболяване не отговаря на критериите на познатите генетични синдроми; 3) удвоява степента на детекция на патологични CNVs в сравнение с таргетните чипове [Veltman & de Vries, 2006]; 4) дава възможност за откриване на нови микроделеционни/микродупликационни синдроми [Ballif et al., 2007; Barber et al., 2008; Brunetti-Pierri et al., 2007; Chabchoub et al., 2008; Eichler & Zimmerman, 2008; Koolen et al., 2006; Rajcan-Separovic et al., 2007]. Като недостатъци могат да се посочат високата цена на експеримента и необходимостта в някои случаи при установяване на CNVs с неясно клинично значение да бъдат изследвани и родителите.

При клиничната интерпретация на установените CNVs трябва да се прецени кои от тях са патологични, нормални или с неясно клинично значение.

Патологични CNVs

CNVs, които обхващат райони на известни микроделеционни/микродупликационни синдроми (или райони с доказано клинично значение като напр. субтеломерните райони) най-вероятно са патологични по природа. Тези геномни дисбаланси най-често впоследствие се валидират с втори молекулен метод. Делеции с размер по-голям от 40 Kb могат да бъдат потвърдени със стандартен метафазен или интерфазен FISH анализ като се използва клон от района на делецията. С FISH на метафази могат да бъдат потвърдени и големи дупликации (повече от 10 Mb), а при по-малки размери информативен може да бъде интерфазния FISH. Дупликации с размери под 40 Kb също е възможно да бъдат доказани с метафазен FISH, но само ако дуплицирания участък се намира върху различни хромозоми [Lee et al., 2007a]. В останалите случаи дисбалансите (делеции или дупликации с размери под 40 Kb) могат да бъдат валидирани с MLPA, количествени PCR (Polymerase Chain Reaction) методи, микросателитно генотипиране или в някои случаи с друга микрочипова CGX платформа [Feuk et al., 2006]. Fiber-FISH методите имат висока информативност, особено при определяне на локализацията на CNVs върху хромозомите, но е технически трудно за изпълнение, времеемко е и извън възможностите на повечето цитогенетични лаборатории.

Нормални CNVs

За нормални CNVs се приемат тези, които се срещат в здрави лица, като известна част от тях са полиморфни и се срещат при повече от 1% от популацията. Понастоящем са достъпни няколко обществени бази данни, които предоставят информация за установени CNVs при хиляди здрави индивиди. Една такава база данни, която каталогизира хиляди CNVs е DGV (Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/>) [DG^V].

CNVs с неясно клинично значение

При установяване на CNVs от тази група първо трябва да се определи произхода на вариацията - де ново или унаследена. За съжаление по една или друга причина не винаги са достъпни проби от родителите. По принцип двамата родители трябва да се тестват със същата CGX платформа. Алтернативен подход е да се валидира находката при пациента с друг молекулен метод (напр. FISH, MLPA или количествен PCR) и впоследствие същия метод да се приложи при родителите. При възможност е добре да се предпочете FISH анализът, тъй като единствен той показва хромозомното разпределение на изследвания участък и дава ценна информация за генетичния риск в семейството. Ако геномните дисбаланси се откриват в засегнат индивид и в здравия му родител, то по-вероятно е да става въпрос за нормален вариант. Подобен критерий за определяне на значението на геномните алтерации от дълго време е стандарт при лентовите цитогенетични техники, но вече успешно се прилага и при изясняването на значението на CNVs [de Vries et al., 2005; Friedman et al., 2006a; Lee et al., 2007a; Shaw-Smith et al., 2004]. Още повече, в научната литература вече са публикувани данни, че установените в здрави индивиди CNVs имат много ниско ниво на мутации [Redon et al., 2006] и се унаследяват в непроменен вид. Ненаследствените или де ново CNVs е необходимо да бъдат сравнени с базите данни, даващи информация за природата на CNVs като DG^V, UCSC (база данни, създадена от Genome Bioinformatics Group към University of California at Santa Cruz - <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) и др [DG^V; UCSC]. За уточняване на клиничното значение на откритите при даден пациент CNVs, могат да се изключат установените CNVs при нормални индивиди съгласно обществените бази данни и оставащите да се обсъждат като потенциално патологични.

В допълнение понастоящем са достъпни бази данни, които предоставят информация за CNVs, установени при пациенти на генетичните клиники. Де ново възникналите CNVs, за които няма данни в DGV трябва да бъдат сравнени с патологични CNVs появяващи се с по-голяма честота при засегнати индивиди. В такива случаи съпадението на CNV при пациенти със сходни или препокриващи се фенотипи увеличава вероятността дадената CNV да е патологична по природа. Сред базите данни, даващи информация за CNVs, установени при пациенти е DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) [DECIPHER]. В нея за всеки индивид са събрани клинични данни с кореспондиращите им хромозомни аберации, като по този начин се улеснява клиничната интерпретация на резултатите от молекулното кариотипиране. Други подобни бази данни са CAD (Chromosome Abnormality Database), MCNdb (Mendelian Cytogenetics Network Online Database), ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations), HSV Database (Human Structural Variation Database), CAC (The Chromosome Anomaly Collection), CNV Project (The Copy Number Variation (CNV) Project Data Index) [CAC; CAD; CNVProject; ECARUCA; HSVDatabase; MCNdb]. В случаи на де ново възникнали CNVs, за които няма налична информация в съществуващите бази данни могат да се приложат следните критерии [Lee et al., 2007a]:

- ***Съдържание на гени.***

Потенциалното клинично значение на дадена CNV нараства с броя на гените, които са обхванати. Това важи особено много, когато са засегнати OMIM гени и/или дозависими гени.

- ***Тип на CNVs.***

Като цяло се приема, че дупликациите са генетични нарушения, които се толерират повече от делециите, т.е. по-вероятно е делеционните CNVs да бъдат патологични. Въпреки това хетерозиготните делеции често могат да бъдат наблюдавани и в здрави индивиди. Понастоящем е установено, че в човешкия геном има не по-малко от 740 Kb ДНК, присъстваща само в едно копие [Conrad et al., 2006]. Има съобщения и за малък брой хомозиготни делеции, установени при здрави индивиди [Conrad et al., 2006; Khaja et al., 2006; McCarroll et al., 2006; Redon et al., 2006]. Трябва да се има

предвид, че повечето хетерозиготни делеции при здрави лица имат среден размер около 15-20 Kb, което означава, че големите делеции се срещат по-често при индивиди с генетични болести и са свързани с по-висок риск, когато имат де ново произход. Понякога не е сигурно да се приеме, че дадена CNV е нормална само, защото е описана при здрави контроли. Наличните в момента микрочипови платформи не са в състояние да откриват много малки или точкови мутации. Това означава, че определена хетерозиготна делеция в здрави индивиди може да бъде оценена като нормална и същевременно същата делеция при индивид, носител на рецесивна мутация, да бъде категоризирана като патологична, ако се делетира здравият алел. Още по-трудна е интерпретацията на CNVs, които се срещат в популациите едновременно като делеции и дупликации.

- **Размер на CNVs.**

При определяне клиничното значение на вариацията, размерът също трябва да се взема предвид. Логично, по-вероятно е големите непрекъснати CNVs да обхващат повече доза-зависими гени. От друга страна са установени и нормални варианти с много големи размери (от 2 до 10 Mb) [Hansson et al., 2007; Redon et al., 2006].

4.1.3.2. Механизми на възникване на вариациите в броя копия

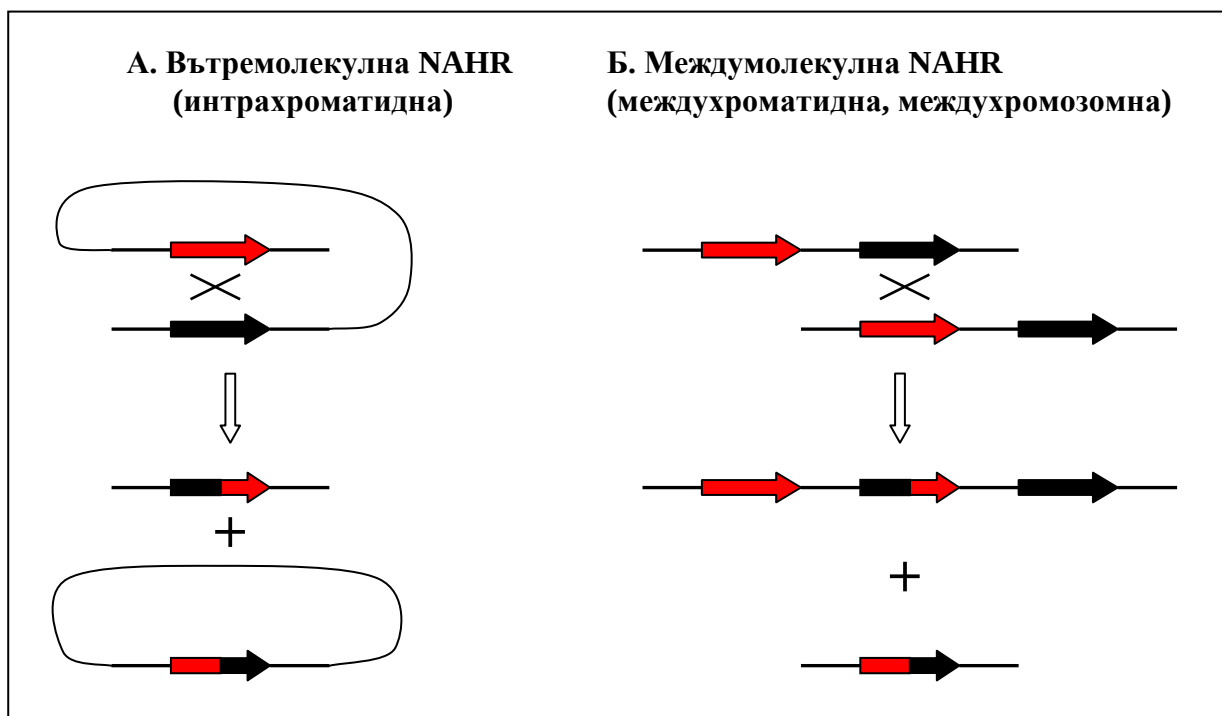
Предложени са три механизма, водещи до появата на вариации в броя копия в човешкия геном [Lupski & Stankiewicz, 2005]: 1) не-алелна хомоложна рекомбинация (NAHR - Nonallelic Homologous Recombination); 2) не-хомоложно лигиране на терминални участъци (NHEJ - Non-Homologous End-Joining) и 3) инактивиране на репликационната вилка с превключване на матрицата (FoSTeS - Fork Stalling And Template Switching) [Lee et al., 2007b]. Тези явления могат да настъпят както в герминативни, така и в соматични клетки. В първия случай те обуславят възникването на генетични болести, а във втория преустройствата могат да причинят появата на различни злокачествени заболявания [Gu et al., 2008]. Ако дадени геномни преустройства споделят еднакви размери и позиции в базови двойки и обуславят сходни клинични симптоми в множество засегнати индивиди, за тях се казва, че са рекурентни. Не-рекурентните преустройства имат различни размери, но споделят общ

регион на препокриване, което може да обясни наличието на сходни симптоми при различните индивиди.

Не-алелна хомоложна рекомбинация

Молекулният механизъм, отговорен за възникването на повечето рекурентни микроделеции и дупликации е не-алелна хомоложна рекомбинация между секвенции с повече от 95% хомоложност. Важна характеристика на генома е съществуването на LCRs (Low Copy Repeats - ниско повторени копия), фланкирани от къси повторени секвенции с повече от 90% хомоложност. LCRs, наречени още сегментни дупликации, са богати на гени, псевдогени и регулаторни елементи и изглежда имат ключова роля в еволюцията на човешкия геном. Високата хомоложност помежду им е причина за възникването на хромозомни преустройства чрез не-алелна хомоложна рекомбинация (NAHR). Сегментните дупликации се срещат сравнително често в генома. Размерите има са от 1 до 200 Kb и могат да се намират на различни места в една молекула (хроматида) - вътрехроматидни или в различни молекули (междухроматидни, междухромозомни), най-често в субтеломерните райони (Фиг. 4) [Turner et al., 2008]. Човешкият геном съдържа 1077 дублицирани блока и при размер 10 или повече Kb, вероятността за нехомоложен кросинговър по време на мейозата нараства. В резултат се образуват на небалансирани гамети с делеции или дупликации, водещи до генетични болести [Chen et al., 2005]. Напр. най-голямата суперфамилия в генома на човека е на олфакторния рецептор и се кодира от генни клъстери, разположени в почти всички хромозоми. Установено е, че генните клъстери на OR в късото рамо на 4 и 8 хромозома са с висока хомоложност и са податливи към геномни преустройства в резултат на нехомоложен кросинговър [Giglio et al., 2001]. Докладвани са по-голям брой микроделеции в сравнение с микродупликации. Обяснение за това е, че загубата на генната функция води до по-тежък клиничен фенотип.

Примери за геномни болести, обусловени от NAHR са болестта на Шарко-Мари-Тут тип 1, синдром на Potocki-Lupski, синдрома на Смит-Магенис, синдрома на Ди Джорджи/VELOкардиофациалния синдром, както и много злокачествени заболявания, дължащи се на соматична NAHR [Gu et al., 2008].



Фигура 4. Различни класове NAHR.

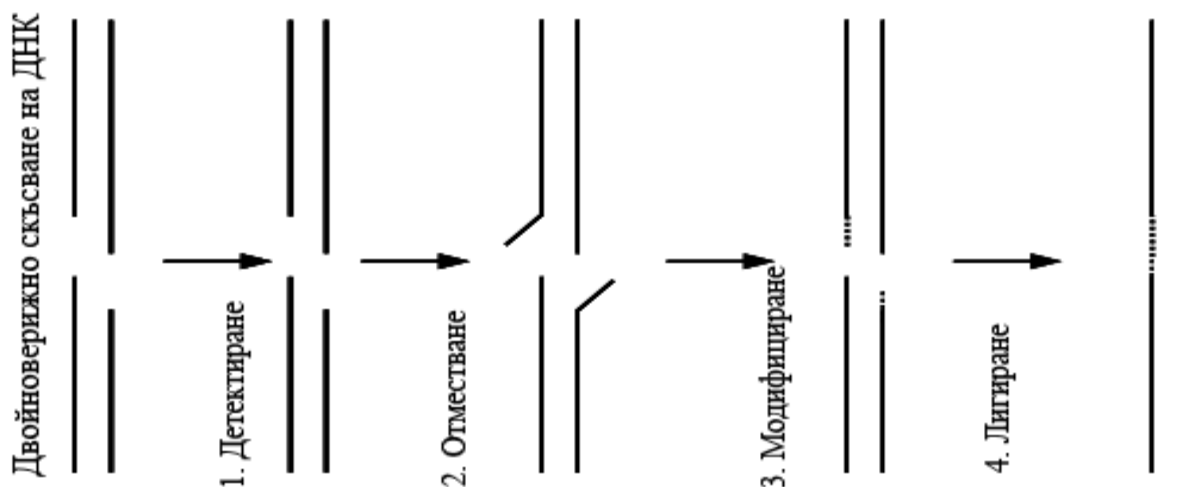
■ — LCRs

— - Геномен регион, обхванат от NAHR

А) Вътрехроматидната NAHR обуславя възникването на делеции и кръгова молекула ДНК; Б) Междухроматидната и междухромозомната NAHR генерира делеции и реципрочни дупликации. Адаптирано по [Turner et al., 2008].

Не-хомоложно лигиране на терминални участъци

NHEJ стои в основата на много не-рекурентни преустройства в човешкия геном [Lupski & Stankiewicz, 2005]. NHEJ е един от механизмите за поправка на двойноверижните нарушения на ДНК, възникнали под действието на йонизираща радиация или кислородни радикали [Lieber et al., 2003; Weterings & van Gent, 2004]. Процесът включва директно съединяване на скъсаната ДНК, при което се изрязват или добавят нуклеотиди в двата края като по този начин се губи информация. Различават се четири основни стъпки при протичането на NHEJ: 1) детектиране на двойноверижните повреди; 2) отстраняване на скъсаните краища; 3) модифициране на краищата, за да станат съвместими (комплементарни) и 4) лигиране на модифицираните краища (Фиг. 5) [Gu et al., 2008; Weterings & van Gent, 2004].



Фигура 5. Схематично представяне на NHEJ.

Адаптирано по [Gu et al., 2008].

За разлика от NAHR при NHEJ няма участие на LCRs. Характерно за NHEJ е, че при модифицирането на ДНК сегментите се създават „информационни дупки” на мястото на съединените краища, което може да доведе до делеция на даден генетичен материал [Gu et al., 2008]. По механизма на NHEJ могат да възникнат дупликации по следния начин: при поява на едноверижно скъсване на ДНК, краят на единият сегмент може да се копира използвайки като матрица сестринската хроматида и впоследствие след приключването на ДНК синтеза да настъпи лигиране на двата края по типа на NHEJ [Lee et al., 2006a].

Инактивиране на репликационната вилка с превключване на матрицата

FoSTeS води до не-рекурентни геномни преустройства и се базира на репликационен механизъм.

По време на репликацията на ДНК активната репликационна вилка може да се инактивира близо до ДНК лезия или до регион с LCRs. Изоставащата верига се дисоциира от водещата и поради наличие на сходна ДНК последователност може да се включи друга репликационна вилка и да се иницира нов ДНК-синтез. Новата вилка може да се генерира близо до старата, но също и на по-отдалечени места. Резултатът от това превключване може да бъде съединяване на различни ДНК секвенции от различни геномни позиции. При образуване на репликационна бримка в 3' направление

(downstream) крайният резултат е делеция, съотв. при превключване в 5' направление (upstream) се генерират дупликации (Фиг. 6).



Фигура 6. Схематично представяне на FoSTeS механизма.
Адаптирано по [Branzei & Foiani, 2007].

Lee и сътр. предполагат, че именно този механизъм стои в основата на комплексни геномни преустройства, асоциирани с демиелинизация на ЦНС [Lee et al., 2007b]. Също така се смята, че дупликациите на *APP* (генът за амилоид прекурсорния протеин), за който се знае, че е асоцииран с болестта на Алцхеймер, могат да са резултат от FoSTeS механизма. В допълнение е изказана хипотеза, че произходът на дупликациите в човешкия геном и разпространението на LCRs се дължат на FoSTeS явлението [Gu et al., 2008].

4.1.3.3. Популационна честота на вариациите в броя копия

„Всеки човешки геном се отличава с допълнителни и понякога липсващи ДНК-последователности, които съществено могат да повлияят всичко - от развитието до болестния процес” [Cohen, 2007].

Развитието на микрочиповите технологии за скриниране на целия геном разкри неочаквано голям брой делеции и дупликации в човешкия геном. Това налага щателно изследване на CNVs в здрави популации и болни индивиди.

През 2004 две големи проучвания предоставят данни от анализа на CNVs в здрави популации. Те установяват, че средно в генома на всеки човек има по 12 CNVs [Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004]. Като се вземе предвид общия брой на нуклеотидите, обхванати от CNVs, това прави приносът на CNVs за вариациите между

два човешки генома, съизмерим с този на еднуклеотидните замени. Друго проучване показва, че 12% (около 360 Mb) от човешкия геном е обхванат CNVs, като те се откриват най-вече в LCRs районите и обхващат поне около 2900 гена (10% от известните до момента) [Redon et al., 2006].

Данни от секвенирането на човешкия геном сочат, че инсерциите и делециите като абсолютна стойност са отговорни за 22% от вариациите, но като количество обхванати нуклеотиди те покриват 74% [Levy et al., 2007]. По-нови данни на Venter разкриват, че геномите на двама индивида се различават помежду си между 1% и 3% [Venter, 2010].

Itsara и сътр. изследват 2500 индивида с чипове на Illumina и откриват при 65-80% от индивидите наличие на CNVs > 100 Kb, при 5-10% CNVs > 500 Kb и при 1-2% CNVs > 1 Mb. Те намират среден брой CNVs на един човек между 3 и 7 варианта [Itsara et al., 2009]. Също така установяват, че по-голямата част от геномните вариации се срещат с честота 0,02 - 1% и обхващат 6% от генома, докато полиморфните засягат 0,09% от генома. Подобни данни съобщават и Pinto и сътр., които при изследването на здрави контролни популации наблюдават около 5%-но обхващане на генома от CNVs (~160 Mb). При това 96% от разкритите CNVs са били с ниска честота < 2%, а останалите са били полиморфни [Pinto et al., 2007].

Понастоящем е известно, че CNVs са повсеместно разпространени в генома. Те могат да бъдат полиморфни (честота > 1%) или редки (честота < 1%), наследствени или де ново, биалелни или мултиалелни [Alaerts & Del-Favero, 2009]. Установена е негативна корелация по отношение на размера на CNVs и честотата им - колкото по-малки са размерите, толкова по-голяма е честотата им [Estivill & Armengol, 2007].

Подобно на други мутации се предполага, че CNVs са механизъм, който допринася за пластичността на човешкия геном и без съмнение има роля за еволюцията му. В този смисъл не е изненадващо, че CNVs често засягат гени, които имат роля за сензорните възприятия и имунния отговор [Alaerts & Del-Favero, 2009; Cooper et al., 2007]. Смята се, че високата концентрация на CNVs в клъстерите на OR и гените на имунитета са белег за адаптивно преимущество на увеличената генна доза [Nguyen et al., 2006]. В подкрепа на това твърдение е установената вариация в броя копия, обхващаща *CCL3L1* гена (human immunodeficiency virus-1-suppressive chemokine and

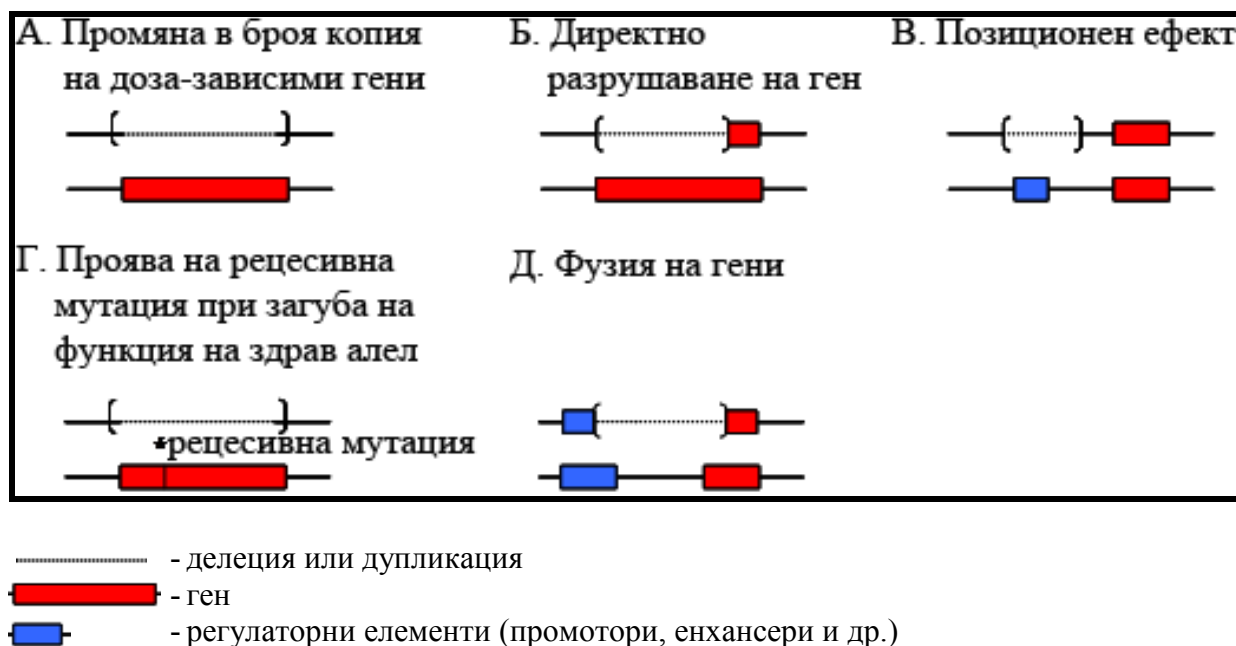
ligand for the HIV coreceptor CCR5). Интересно е, че по-малкия брой копия на *CCL3L1*-гена (в сравнение с популационната честота), асоциира с по-голяма чувствителност към HIV [Gonzalez et al., 2005]. В колкото повече копия е представен *CCL3L1*, толкова по-голяма е резистентността към HIV. Генът кодира протеин, който се свързва към рецептор, използван от вируса при пенетрацията му в белите кръвни клетки. Съответно колкото повече протеин се експресира, толкова по-малко рецептори са достъпни за прикрепването на вируса.

Друг пример, подкрепящ тезата, че CNVs са резултат от действието на естествения отбор, обуславящо генетичните различия между индивидите и популациите, е дупликацията на гена за слюнчената амилаза (*AMY1*). *AMY1* - генният продукт участва в смилането на скорбялата от храната. При отделните индивиди броят на копията му може да варира от 1 до 10 със съответни кореспондиращи нива на амилазата в слюнката [Perry et al., 2007]. Налице е отчетлива разлика между броя генни копия в различните популации в зависимост от съдържанието на скорбяла в диетата, съотв. по-голям брой копия при популации с основна консумация на високо-скорбялна храна [Perry et al., 2007]. Това е пример за позитивната селекция, която води до подобро смилане на скорбялата и вероятно предпазва от развитието на стомашно-чревни заболявания.

В заключение натрупани са достатъчно данни, сочещи, че CNVs са един от факторите, допринасящи за нормалните генетични разлики между хората. 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).

4.1.3.4. Влияние на вариациите в броя копия върху фенотипа

CNVs могат да повлияят фенотипа по няколко механизма. Логично е да се предположи, че промените в CNVs могат да окажат ефект върху фенотипа чрез промяна нивата на генната експресия [Henrichsen et al., 2009a]. На Фигура 7 са представени механизмите, по които промените в CNVs могат да окажат ефект върху фенотипа.



Фигура 7. Схематично представяне на ефекта на промяната в CNVs върху фенотипа.

Адаптирано по [Feuk et al., 2006; Lupski & Stankiewicz, 2005]. Обясненията са дадени по-долу в текста.

А. Промяна в броя копия на доза-зависими-гени.

Промяната на генната доза може да доведе до промяна в нивата на иРНК, което да се отрази на количеството на синтезирания протеин. За определени гени и биохимични процеси, за които количеството на дадения протеин е критично, това може да доведе до болестен процес [Shianna & Willard, 2006]. Пример за такъв ефект е дупликацията на *PMP22* - гена (peripheral myelin protein-22). Увеличената генна доза се проявява в дезинтеграция на миелина на нервните клетки и нарушава провеждането на нервните импулси от мозъка към крайниците [Cohen, 2007]. Клинично това отклонение се характеризира като болест на Шарко-Мари-Тут 1 тип. Трябва да се отбележи, че делецията на същия локус причинява друга невропатия - наследствена невропатия с предразположение към тензионни парализи.

Б. Директно разрушаване на ген

Гени, които попадат в зона на CNVs могат да бъдат директно разкъсани, с последваща загуба на функцията и намалена експресия на протеини, кодирани от доза-зависими гени [Feuk et al., 2006].

В. Позиционен ефект

Промяната на генната експресия, може да се дължи както на делеции, така и на дубликации [Kleinjan & van Heyningen, 1998; Lee et al., 2006b]. Известно е, че регулаторните елементи могат да отстояват на милиони бази разстояние от гените, които регулират. От тук следва, че дори при липса на директно засягане на даден ген, промяната в броя копия индиректно може да повлияе генната експресия чрез засягане на регулаторните елементи. При изследването на пациенти със синдрома на Уилямс-Бойрън, Merla и сътр. установяват, че делецията на локуса корелира с намалени експресионни нива не само на делетираните гени, но се и открива понижена експресия на гени, отстоящи на няколко мегабази от геномното преустройство [Merla et al., 2006].

Г. Проява на рецесивна мутация при загуба на функция на здрав алел

При доза-зависимите гени делецията на един алел може да доведе до болестен фенотип, в случай, че оставащия върху хомоложната хромозома алел е с рецесивна патологична мутация [Feuk et al., 2006].

Д. Фузия на гени

Промяна на броя копия, при която местата на скъсване съвпадат с даден ген, може да е причина за формиране на нови транскрипти посредством генна фузия или разместване на екзони [Feuk et al., 2006]. Stranger и сътр. анализират експресионните нива на около 14 000 гена при индивиди, участници в НарМар проекта и правят оценка на асоциацията на експресионните нива с CNVs. Те констатираат, че CNVs отговарят за ~ 20% от установените генетични варианти, като останалата част се дължи на SNPs [Stranger et al., 2007]. Доказателство за фенотипния ефект на CNVs идва също и от експериментални животински модели. Henrichsen и сътр. обобщават данните от анализа на цялостна геномна експресия в шест главни органи на мишки и плъхове. Те установяват променена експресия не само на гените, директно обхванати от CNVs, но също така и на гени, отдалечени на до 500 килобази от конкретната вариация [Henrichsen et al., 2009b]. Това изследване е едно от първите, които разкриват директното влияние на CNVs върху тъканните транскриптоми и потвърждават тезата на Merla и сътр., описана по-горе.

До момента не са проведени много изследвания, насочени към изясняване на функционалното влияние на CNVs на клетъчно и организмено ниво. Необходими са допълнителни проучвания за оценка на общото влияние на CNVs върху генната експресия, фенотипните варианти и корелацията с болестните процеси.

4.2. Мултифакторни аномалии

Мултифакторните аномалии включват повечето често срещани вродени аномалии, каквито са по-голяма част от дефектите на невралната тръба, цепките на устната и небцето, сърдечните аномалии, пилорната стеноза, вродената луксация на тазобедрената става др. Основна концепция за етиологията на тези аномалии е, че предразположението към тях е свързано с наличието на много гени (полигенен комплекс) с малък ефект, комбинирано с въздействието на фактори на околната среда. Рискът за повторение при мултифакторните заболявания за разлика от моногенните е променлив. Той се изчислява емпирично и зависи от степента на родство, от броя на родените болни деца, от тежестта на клиниката, от популационната честота на заболяването и от ефекта на Картър [ААТончева et al., 1999].

4.3. Тератогенни фактори

Около 10% от всички вродени аномалии са резултат от тератогенна експозиция по време на бременността [O'Rahilly, 2001]. Тератологията (на гръцки τέρας - чудовище и λόγος - наука) е клон от медицината, който изучава аномалиите, възникващи по време на вътреутробното развитие на зародиша под въздействието на инфекциозни, химически или физически агенти. Изучаването на болестите от тази група започва през 1941 год. с описанието на рубеолната ембриопатия от сър Норман Маккалистър Грег [Gregg, 1941]. През 1959 год. Джим Уилсън описва в монографията си „Environment and Birth Defects” шестте принципа на тератологията, които са валидни и до днес [Wilson, 1973]:

1. Чувствителността на зародиша към тератогени зависи от генотипа му и начина на взаимодействие на генотипа с факторите на околната среда;
2. Чувствителността на зародиша към тератогени варира в зависимост от стадия на развитие по време на експозицията;

3. Тератогените действат по специфичен механизъм на развиващите се клетки и тъкани като предизвикват поредица от аномалии в развитието;
4. Ефектът на тератогена зависи от природата му;
5. Отклоненията в развитието водят до летален изход, аномалии, изоставане в растежа и функционални дефекти;
6. С увеличаване на дозата на тератогена нарастват честотата и степента на отклоненията (от липса на ефект до летален ефект).

На Таблица 4 са представени някои тератогенни агенти при човека [Burton & Praveen, 2007].

Таблица 4. По-често срещани тератогени при човека.

Тератогени	Период на уязвимост	Асоциирани вродени аномалии
Йонизираща радиация		
	0-7 ден ¹	Смърт
	2-7 г.с.	Микроцефалия, изоставане във ВУР ² , рак
	8 - 40 г.с.	Микроцефалия, изоставане във ВУР, рак, интелектуална недостатъчност
Тератогенни лекарства		
Антихипертензивни ACE ³ инхибитори	13 - 40 г.с.	Аномалии на черепа, бъбречна недостатъчност, белодробна хипоплазия, смърт
Phenytoin	18 - 60 ден	Цепки на устните/небцето, вроден сърдечен дефект, хипоплазия на ноктите
Валпроева киселина	18 - 60 ден	Хипертелоризъм, задебелени нокти, синдром на Morsier, цепки на устните/небцето, дефекти на крайниците, микроцефалия
Ретиноиди	18 - 60 ден	Дефекти на ЦНС/ушите, цепки на устните/небцето, сърдечни дефекти, очни аномалии
Антикоагуланти Warfarin	6 - 9 г.с.	Назална хипоплазия, очни аномалии, хипопластични фаланги
Андрогени	2 - 24 г.с.	Генитални аномалии
Инфекции		

продължена

Тератогени	Период на уязвимост	Асоциирани вродени аномалии
Рубеола	Първи триместър	Катаракта, микроцефалия, микрофтальмия, сърдечни дефекти
Варицела зостер	8 - 20 г.с.	Микроцефалия, хипоплазия на крайници, кожни цикатрикси
Метаболитни нарушения при бременната жена		
Диабет	Първи триместър	Дефекти на невралната тръба, сърдечни дефекти, хипоплазия на дисталния отдел на гръбначния стълб и долните крайници
Фенилкетонурия	Главно първи триместър	Изооставане във ВУР, микроцефалия, лицев дисморфизъм, максиларна и мандибуларна хипоплазия, сърдечни дефекти, цепки на устните/небцето
Смесени тератогени		
Алкохол	Първите 3 месеца	Микроцефалия, максиларна хипоплазия, сърдечни дефекти, интелектуална недостатъчност

¹предимплантационен период; ²ВУР - изоставане във вътреутробното развитие; ³АСЕ - инхибитор (angiotensin converting enzyme - ангиотензин конвертиращ ензим)

4.4. Вродени малформации с неясна етиология

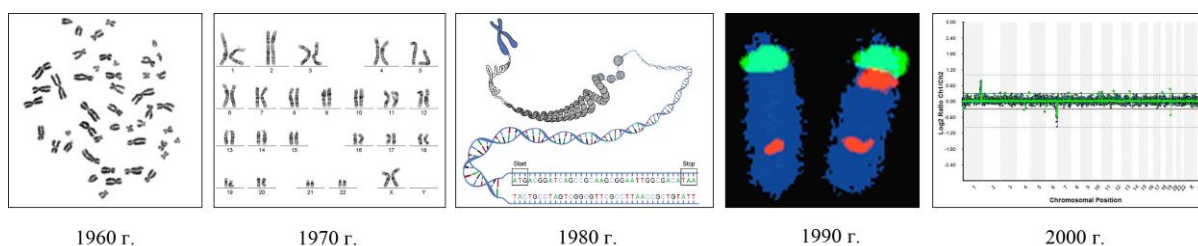
Нерядко в практиката се срещат спорадични дисморфични синдроми с неясна етиология, които не се дължат на хромозомни аберации и не показват моногенен тип на унаследяване. Това позволява да се постави клинична диагноза с относителна степен на сигурност, тъй като болестите от тази група показват широка клинична вариабилност. При голям брой спорадични дисморфични синдроми с неясна етиология диагнозата се поставя само въз основа на клиниката, тъй като все още не известен молекулярния им дефект. Единственото, което се знае за тях, е повече или по-малко характерния фенотип. Типичен пример за болестите от тази група са синдрома на Kabuki, на Proteus, на Tebbi, на Cumming. Тези синдроми с неясна етиология показват „хромозомен“ фенотип, което предполага, че нарушения в различни гени са причина за заболяването. Интерес представляват две заболявания с множествени малформации с наскоро изяснена етиология - синдрома на Корнелия де Ланге (КдЛС) и CHARGE - синдрома (Coloboma - колобома, Heart defects - сърдечни дефекти, choanal Atresia - хоанална атрезия, Retarded growth и development - изоставане в растежа и развитието, Genital abnormalities - аномалии на половите органи, и Ear anomalies - аномалии на ушите). И при двата синдрома са описани пациенти с различни ХА, без да се посочва подходящ

кандидат хромозомен район. Изключение прави 3q26-27 региона описан при няколко пациента с КдЛС с по-лека клинична картина. Този район е детайлно изследван при пациент с класическа форма на синдрома и де ново възникнала балансирана транслокация между 3 и 17 хромозома - t(3;17)(q26.3;q23.1) [Ireland et al., 1991], но не се стига до идентификация на кандидат хромозомен район или ген/гени с директно участие в патогенезата на синдрома [Tonkin et al., 2004a]. Поради комплексния фенотип на тези синдроми като вероятна причина за възникването им са обсъждани микроделеции/микродупликации, включващи повече от един ген. През 2004 година независимо един от друг Krantz и Tonkin след геномен анализ съобщават, че мутации в *NIPBL*-гена причиняват КдЛС [Krantz et al., 2004; Tonkin et al., 2004b]. Идентифицирани са мутации от различен тип: missense, nonsense, splice и frameshift. Тежки мутации, водещи до скъсяване на генния продукт, вероятно водят до хаплоинсуфициенция на *NIPBL*-протеина. В обширно проучване на кохорта от 120 пациента с КдЛС Lynette Gillis и колектив намират мутации в *NIPBL*-гена при 47% от изследваните лица и установяват сигнификантни генотип-фенотипни корелации [Gillis et al., 2004].

Друг синдром с наскоро изяснена молекулна основа е CHARGE - синдромът. При геномен скрининг с микрочипова СГХ на 17 пациента е намерена делеция в 8q12 регион при един от пациентите. Това откритие в крайна сметка води до идентификацията на кандидат ген *CHD7* за заболяването, при който са открити мутации в половината от изследваните пациенти [Vissers et al., 2003]. Идентифицирането на кандидат гени при тези два синдрома демонстрира, че увреждането на един единствен ген с ключова роля в ранното ембрионално развитие може да доведе до комплексен фенотип, засягащ различни тъкани. Посочените примери илюстрират мощта на микрочиповата СГХ като метод за идентифициране на кандидат гени, участващи в развитието на малформации и интелектуални дисфункции. Молекулното кариотипиране дава големи надежди за изясняването на молекулната природа на повече идиопатични малформативни синдроми.

5. Подходи за генетична диагностика

През последните две десетилетия диагностичните и научно-изследователските възможности в областта на дисморфологията се обогатяват извънредно много в методологично отношение. Този прогрес е тясно свързан с напредъка в биохимичната и молекулната генетика (Фиг. 8).



Фигура 8. Развитие на технологиите през последните години.

Анализ на хомогенно оцветени хромозоми с боя на Гимза през 60-те години на миналия век; идентификация на хромозомите чрез GTG- лентова техника през 70-те; развитие на молекулно-генетични техники като секвениране и PCR през 80-те; приложение на FISH метода през 90-те и изобретяването на молекулното кариотипиране чрез ДНК-микрочипова сравнителна геномна хибридизация през последните години.

5.1. Цитогенетичен анализ

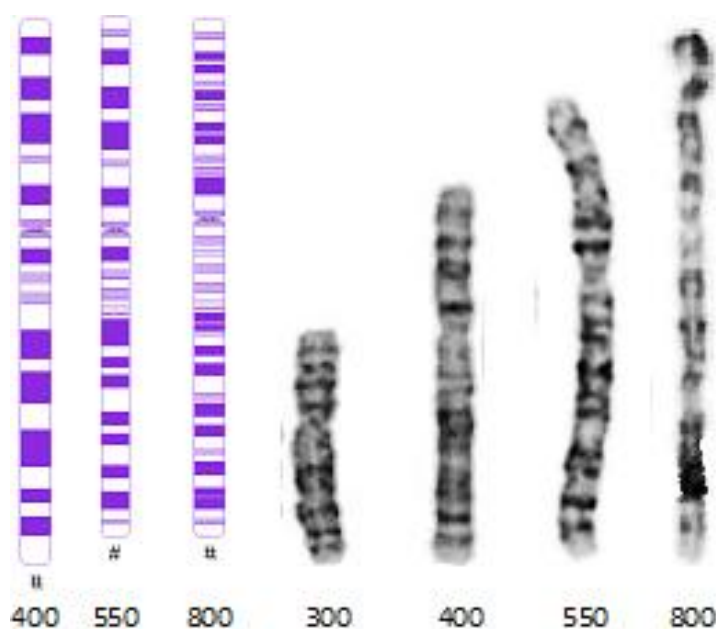
Няколко години след откриването на човешките хромозоми през 1882 от Флеминг, се изказва предположението, че хромозомите са материалната основа на наследствеността. Думата „хромозома” има гръцки корен $\chi\rho\omicron\mu\alpha$ (chroma - цвят) and $\sigma\mu\alpha$ (soma - тяло) и означава цветно телце, поради свойството на хромозомите да се багрят силно от определени бои. През 1956 год. Tjio и Levan установяват, че нормалната човешка клетка съдържа 46 хромозоми [Tjio & Levan, 1956]. Това откритие позволява изследването на хромозомните дефекти и болести и се „ражда” науката „цитогенетика”. Въпреки, че не е възможно детайлно изследване на хромозомите, въз основа на размера им и разположението на центромера, те са разделени на 8 различни групи (A-G и половите хромозоми). Тази класификация позволява установяването главно на бройни ХА. Едва след разработването на лентовите техники за оцветяване от Caspersson et al. през 1968 год. [Caspersson et al., 1968] и приложението им през 1970 год. [Caspersson et al., 1970] върху човешки хромозоми става възможно не само идентифицирането на отделните хромозоми, но и разкриването на структурни аберации като транслокации, инверсии, делеции и дупликации. В наши дни конвенционалния

хромозомен анализ, в комбинация най-често с GTG оцветяване е рутинна процедура във всички цитогенетични лаборатории. Стандартният цитогенетичен анализ се основава на изследването на дялящи се клетки. При постнатална цитогенетична диагностика най-използваният източник са лимфоцити от периферна кръв. При култивиране на лимфоцити от периферна кръв стимулирането на клетките е необходимо условие, за да се индуцира делене. При стимулираните култури, дялящите се клетки могат да бъдат блокирани в метафаза от митотичния цикъл, когато хромозомите имат най-добра морфология за анализ. Въпреки, че е широко използван, методът има редица ограничения: ниска резолюция, времеемък, трудоемък, изисква квалифицирани умения и е труден за автоматизиране. Разрешителните възможности на метода зависят от качеството на получените метафази, като рутинно са налице около 400-500 ленти на хаплоиден набор и съответно 5-15 Mb резолюция. Качество на хромозомите и диференциалното оцветяване се оценяват в 4 нива според броя на лентите на хаплоиден хромозомен набор: без ленти; до 150 ленти; до 400 ленти; до 550 ленти. При оцветяване на прометафазни хромозоми се достигат около 1000 ленти, но високорезолютивният прометафазен анализ не е подходящ за рутинно приложение (Фиг. 9). Пълният анализ на хромозомите от 5 метафазни клетки плюс преброяването на хромозомите в други 5 метафазни клетки е достатъчно в рутинната практика. При краткосрочни култури това дава 95% вероятност за откриване на 26-процентен мозаицизъм (при 11 метафазни клетки със същата вероятност се открива 25-процентен мозаицизъм). За изключване на по-малък процент мозаицизъм е необходимо анализирането (преброяването) на:

- 14 клетки - за 20% мозаицизъм
- 19 клетки - за 15% мозаицизъм
- 29 клетки - за 10% мозаицизъм
- 59 клетки - за 5% мозаицизъм

Хромозомните мутации, засягащи структурата или броя на хромозомите водят до различни симптоми като интелектуална недостатъчност, множествени вродени малформации и рак. Скоро след установяването на точния хромозомен набор при човека са докладвани някои бройни хромозомни аберации - 1959 год. Lejeune et al.- тризомия 21, причиняваща синдрома на Даун [Lejeune et al., 1959]; 1959 год. Ford et al.-

монозомия X, водеща до синдрома на Търнър [Ford et al., 1959]; 1959 год. Jacobs and Strong- 47, XXY- синдрома на Клайнфелтър [Jacobs & Strong, 1959]; 1960 год. Edwards et al.- тризомия 18 или синдрома на Едуардс [Edwards et al., 1960]; 1960 год. Patau et al.- тризомия 13 или синдрома на Патау [Patau et al., 1960]. През 1960 год. Nowell и Hungerford докладват първата структурна аномалия - „Филаделфийската хромозома”, открита в костномозъчни клетки на болен от хронична миелоидна левкоза [Nowell & Hungerford, 1960]. Все пак минават много години преди да стане ясно, че не става въпрос за делеция на 22 хромозома, а за реципрочна транслокация между 22 и 9 хромозома.



Фигура 9. Резолюция на GTG бендинг - техниката при различни степени на хромозомна спирализация.

Демонстрирани са различни степени на спирализация на хромозома 2 при GTG - лентуване и кореспондиращите ѝ идеограми с ленти, субленти и субсубленти, съответно с 400, 550 и 800 ленти на хаплоиден набор.

През 80-те години на миналия век молекулно-генетичните техники получават силен тласък в развитието си. PCR-техниката (полимеразна верижна реакция) прави възможен анализа на ДНК-секвенции на ниво единична базова двойка и заема основно място в диагностиката на моногенните болести.

5.2. Молекулно-генетични методи

Методична основа на ДНК диагностиката е полимеразната верижна реакция за синтез на ДНК.

MLPA (множествена лигазно-медирана амплификация на пробата). MLPA е метод, който детектира промени в броя копия едновременно в до 45 различни ДНК-

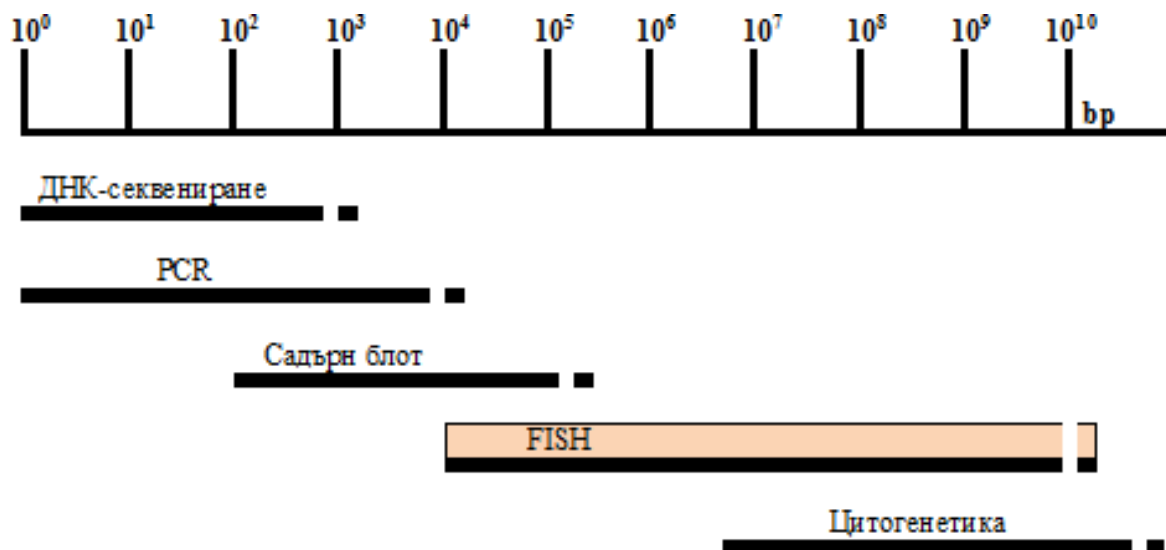
секвенции. Техниката се основава на PCR- реакцията и включва 4 основни стъпки: денатурация, хибридизация, лигиране и амплификация. Всяка MLPA - проба се състои от 2 олигонуклеотида, които имат еднакви секвенции на края си, като отделните проби се различават по т.нар. „стърчаща” (stuffer) секвенция. Тази секвенция не хибридизира и при отделните проби има различна дължина и нуклеотидна последователност, което позволява електрофоретичното разделяне на получените продукти. За всяка проба съществува специфична таргетна секвенция, като двата олигонуклеотида са подбрани така, че да хибридизират към две съседни секвенции. Те се лигират само ако е налице специфична хибридизация. Следва PCR - амплификация с флуоресцентно белязан праймер. Дължината на амплификационните продукти е с размер между 130 и 480 бр. Следващата стъпка е разделяне и количествено определяне на PCR - продуктите чрез капиларна електрофореза. Пикът на всеки амплификационен продукт се сравнява с контрола, което показва относителния брой копия в таргетната секвенция [Schouten et al., 2002]. MLPA е бърз, чувствителен, относително евтин и лесен метод, но има и редица недостатъци: сложен дизайн на проби; създаване, пречистване и рестрикция на M13 векторен клон; лесно контаминиране, неспособност за детекция на нови мутации, тъй като пробата трябва да бъде подбрана спрямо известна нуклеотидна последователност.

QF-PCR (количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция). QF-PCR включва амплификация на микросателитни ДНК - секвенции, състоящи се от тандемни повтори, известни като STRs (Short Tandem Repeats - къси тандемни повтори). STRs представляват ди-, три- или тетрануклеотиди, повторени вариабилен брой пъти при различните индивиди. Използват се флуоресцентни праймери и автоматичен ДНК - секвенатор, което позволява визуализация и количествено определяне на PCR - продуктите като пикове на амплификация. Напр. при амплифицирана референтна ДНК от хетерозиготен индивид (имащ два алела с различна дължина) ще се визуализират 2 пика в едно поле; при тризомия ще е налице допълнителен пик или единият от двата ще е двойно по-голям, при монозомия ще се появи само един пик.

5.3. Молекулно-цитогенетични методи

През 90-те години огромната пропаст между молекулната генетика и цитогенетичните техники донякъде се намалява от развитието на молекулно-

цитогенетични методи като флуоресцентната ин ситу хибридизация. Молекулната цитогенетика създаде мост между молекулната генетика и цитогенетиката (Фиг. 10).



Фигура 10. Разрешителни възможности на различните видове техники за генетичен анализ.

Въвеждането на молекулно-цитогенетичните методи довежда до рязко подобряване на диагностичните възможности. Прилагат се различни техники като FISH, многоцветен FISH (Multiplex FISH –mFISH и SKY - Spectral Karyotyping), PRINS (Primed In Situ Labelling), обратен FISH, fiber-FISH (високорезолютивен FISH върху изтеглена ДНК - фибрила), CGH (Comparative Genomic Hybridization - сравнителна геномна хибридизация).

FISH представлява бърза и надеждна техника в молекулната цитогенетика. В определени случаи дава допълнителна важна информация към тази, получена чрез традиционното кариотипиране. Методът позволява директна визуализация на определени геномни секвенции чрез комплементарно свързване на флуоресцентно белязани проби към метафазни хромозоми или интерфазни ядра. Приложението на метода включва микроделеционен/микродупликационен анализ, идентификация на маркерни хромозоми, изясняване на структурни реаранжировки и генни преустройства и амплификации, асоциирани с неоплазми, пренатален и предимплантационен анализ. Важно предимство е възможността да се установят хетерозиготни делеции, което прави възможно откриването на носители на болестни мутации. Локус-специфичните проби могат да бъдат ВАС - клонове, РАС - клонове (РАС - bacterial P1-plasmid

Artificial Chromosome), космидни или фосмидни клонове от PCR - продукти. Необходимите клонове BAC- PAC- клонове за FISH картиране могат да бъдат подбрани от бази данни с картирани и клонирани човешки клонове чрез геномни браузъри като Ensembl (<http://www.ensembl.org>) [Ensembl] или UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>) [UCSC].

Многоцветният FISH представлява една от най-мощните техники в молекулната цитогенетика и позволява визуализация на сложни хромозомни преустройства, интерстициални транслокации, неуловими с други методи. Според Kearney и сътр. многоцветният FISH в комбинация с микрочипова CGH се очертава като перфектен подход при изясняването на „скрити” хромозомни преустройства [Kearney, 2006].

При **mFISH** се използва набор от хромозома- специфични ДНК проби, които хибридизират върху денатурирани метафазни хромозоми. Пробите представляват YAC - хромозоми (Yeast Artificial Chromosomes - изкуствено синтезирани хромозоми на дрожда), белязани с комбинация от флуорохроми. Пет флуорохрома в различни съотношения дават 24 различни цвята, специфични за всяка хромозома, което дава възможност за анализ на целия на хромозомен набор. Флуоресцентният анализ изисква CCD- камера (Charge-Coupled Device - прибор със зарядна връзка) и специализиран софтуерен [Speicher et al., 1996].

SKY - техниката комбинира интерферометрия, CCD- визуализация и оптична микроскопия [Schrock et al., 1996]. Първоначално всички 24 хромозоми се сепарират чрез flow-сортиране (1-22, X и Y) и се амплифицират чрез DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction - PCR с дегенерирали олигонуклеотидни праймери). След това се бележат с комбинация от 1 до 4 различни флуорохроми, като всяка хромозома се оцветява в различен цвят. Приготвя се „коктейл” от белязаните хромозоми и след денатурация, в присъствието на Cot-1-DNA за блокиране на повторените секвенции, пробите хибридизират върху метафазни хромозоми. Емисионните спектри от всички точки на средата в областта на видимата и близо - инфрачервената част на светлината се измерват едновременно. Благодарение на уникалната спектрална характеристика на всяка хромозома е възможно софтуерно автоматизирано кариотипиране на хромозомния набор.

Сравнителната геномна хибридизация е молекулно-цитогенетична техника за детекция на небалансирани геномни промени [Kallioniemi et al., 1996]. СГХ методът е базиран на конкурентна хибридизация между ДНК от изследваната проба (т.нар. тест ДНК) и ДНК от нормални клетки (референтна ДНК), върху нормални метафазни хромозоми. Важно е да се отбележи, че СГХ не дава информация за плоидността или локализацията на реаранжираните секвенции, отговорни за промяната в броя копия. СГХ има няколко силни страни: 1) позволява анализ на целия геном за допълнителен или липсващ генетичен материал в единичен експеримент; 2) не изисква метафази от пациента и 3) може да бъде проведен при наличие на малък брой високопречистени клетки. При СГХ тест ДНК, химично модифицирана с хаптен (обикновено биотин), се смесва в съотношение 1:1 с референтна ДНК, белязана с различен хаптен (обикновено дигоксигенин) и двете ко-хибридизират върху нормални метафазни клетки. Хомоложните секвенции, присъстващи и в двете ДНК-и се „състезават” за едни и същи таргетни места. Хибридизиралите референтна и тест ДНК молекули се определят чрез хаптен-специфични лиганди, куплирани с различни флуорохроми, обикновено флуоресцеин изотиоцианат (FITC) - зелено за референтната ДНК и родамин - червено за тест ДНК. Относителното количество на тест и референтната ДНК, хибридизирали към даден локус може да бъде определено чрез измерване на флуоресцентното съотношение (FR) червено:зелено. Това съотношение трябва да бъде 0.5, 1.0 или 1.5 за локусите, които присъстват в тест ДНК съответно в 1, 2 или 3 копия. Макар че големи хромозомни дисбаланси могат да се определят чрез конвенционална флуоресцентна микроскопия, задълбочената интерпретация на СГХ изисква софтуерен анализ. При сравнителния анализ на СГХ метода с цитогенетичния метод е доказано, че СГХ напълно възпроизвежда бройни аномалии, касаещи цяла хромозома (анеуплоидии), както и системни цитогенетично видими дупликации и делеции с големина не по-малка от 10-20Mb [Nacheva et al., 1998].

5.4. Микрочипови ДНК технологии

Методът на микрочип-базираната сравнителна геномна хибридизация е разработен в края 90-те години от Solinas-Toldo и сътр. и Pinkel и сътр [Pinkel et al., 1998; Solinas-Toldo et al., 1997]. Благодарение на голямата си резолюция и чувствителност микрочиповата СГХ бързо се превръща в ключов подход при

проучването на генома на раковите клетки [Davies et al., 2005; Jonsson et al., 2005; Pinkel et al., 1998], при откриването на нови синдроми и кандидат гени за различни заболявания [Koolen et al., 2006; Sharp et al., 2006; Shaw-Smith et al., 2006; Vissers et al., 2005], при диагностиката на пациенти с множествени вродени малформации и/или интелектуална недостатъчност [de Vries et al., 2005; Shaw-Smith et al., 2004; Vissers et al., 2003], при пренаталната генетична диагностика [D'Amours et al., 2011; Evangelidou et al., 2010; Rickman et al., 2006; Roa et al., 2005], а понастоящем се използва и за целите на предимплантационната генетична диагностика [Alfarawati et al., 2011; Fiegler et al., 2007; Fiorentino et al., 2011; Fishel et al., 2010]. Именно високата резолюция е причина за драматично увеличение на гените идентифицирани чрез молекулно кариотипиране и вероятно все повече гени ще се идентифицират по този начин. Изясняването на небалансираните геномни микроаберации чрез микрочипова СГХ при пациенти, води не само до описание на нови синдроми, но също така и до диагностично доизясняване на вече описани синдроми [de Ravel et al., 2007; Feuk et al., 2006; Friedman et al., 2006a; Ishkanian et al., 2004; Menten et al., 2006; Sanlaville et al., 2005; Sebat et al., 2007; Shaffer & Bejjani, 2006].

В научната литература се натрупват все повече данни, които доказват големите предимства на микрочиповата СГХ пред конвенционалните методи:

- много по-големи разрешителни възможности, позволяващи идентифициране на нови микроструктурни преустройства;
- разкриване на ниско-степенни мозаицизми;
- доказване на хромозомен дисбаланс при привидно балансирани преустройства.

Молекулното кариотипиране удвоява степента на детекция на хромозомните нарушения благодарение на високата си резолюция [de Ravel et al., 2007]. В научната литература се натрупват все повече доказателства в подкрепа на това твърдение. Първите публикации по проблема докладват за повече от 15 – 24% сегментни анеуплоидии при пациенти с идиопатична интелектуална недостатъчност и дисморфизъм [Shaw-Smith et al., 2004; Vissers et al., 2003]. Няколко по-късни проучвания съобщават за 10-25% честота на небалансирани геномни микроизменения [de Vries et al., 2005; Rosenberg et al., 2006; Schoumans et al., 2005]. При геномно

скриниране на 60 пациента с вродени сърдечни дефекти Bernard Thienpont и съавт. откриват в 30% от пациентите дисбаланси, неописвани при фенотипно нормални индивиди [Thienpont et al., 2007]. Menten В. и сътр. описват субмикроскопски хромозомни аберации, установени с молекулно кариотипиране в 20% от 140 пациента с идиопатични конгенитални малформации, интелектуална недостатъчност и нормален кариотип [Menten et al., 2006].

За сравнение докато конвенционалната цитогенетика и FISH изследванията откриват хромозомни аберации при около 10% от пациентите с дисморфизъм и/или интелектуална недостатъчност, микрочиповият СГХ анализ детектира аберации при 20% [Veltman, 2006].

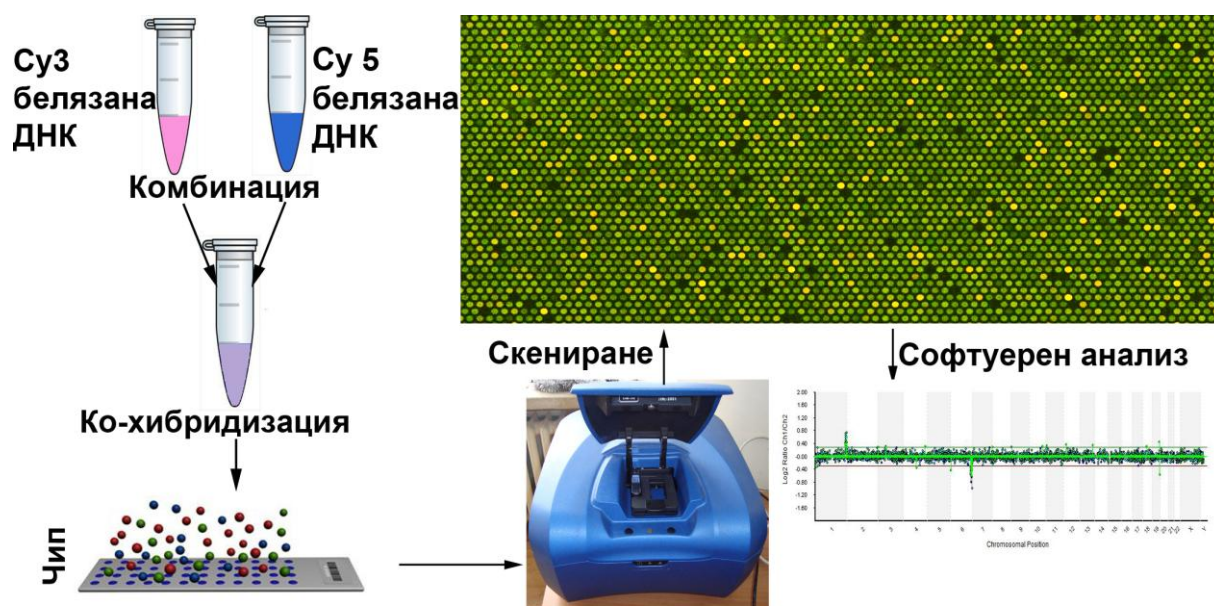
СГХ чиповият анализ е по-чувствителен за детекция на мозаицизъм в сравнение с конвенционалните цитогенетични техники. Причините за това са няколко: 1) без клинични данни за мозаицизъм, броят на анализирани метафази може е недостатъчен и да се пропусне нискостепенен мозаицизъм; 2) единична абнормна клетка би могла да се интерпретира като артефакт от клетъчното култивиране, тъй като хромозомният анализ се основава на стимулирани клетки, които реагират в различна степен на стимулацията, анеуплоидните клетки могат да се окажат по неконкурентни с нормалните клетки и да са представени по-слабо в културата [Vermeesch et al., 2005]. По високата чувствителност на микрочиповата СГХ за детекция на мозаицизъм в сравнение с рутинния хромозомен анализ, може да се дължи също и на факта, че се тестват множество клетъчни линии, както и/или на неспособността на цитогенетично абнормални Т лимфоцити да отговарят на митогени [Cheung et al., 2007]. При изследване на 2,585 пациенти, хромозомен мозаицизъм е детектиран чрез молекулно кариотипиране в 12 от случаите, като 10 от тях са били с нормална находка при цитогенетичния анализ на периферна кръв [Cheung et al., 2007]. Blake C. Ballif et al. съобщават за 18 случая на мозаицизъм, доказани с микрочипова СГХ. При всеки от случаите, мозаицизмът е потвърден чрез FISH анализ независимо от типа на аберацията: маркерни хромозоми, автозомни тризомии, терминални и интерстициални делеции, както и дериватни хромозоми, като установеният процент на абнормалните клетки в нестимулираните култури често е различен в сравнение със стимулираните с фитохемаглутинагин култури [Ballif et al., 2006]. Ето защо микрочиповата СГХ, базирана

на анализ на геномна ДНК, изолирана директно от некултивирана периферна кръв е добър метод за разкриване на нискостепенен мозаицизъм при небалансираните хромозомни аберации в сравнение с традиционните цитогенетични техники.

Видимо балансираните структурни преустройства се срещат при 0,6% от пациентите с дисморфизъм и/или интелектуална недостатъчност [Rauch et al., 2006]. Около 6% от де ново възникналите видимо балансираните реципрочни транслокации [Warburton, 1991] и 23% от видимо балансираните комплексни преустройства (три и повече хромозомни скъсвания) [Madan et al., 1997] асоциират с абнормни фенотипи. Наблюдаваните отклонения във фенотипа при някои случаи се обясняват с различни механизми като директно засягане на гени в мястото на разкъсването [Fantes et al., 1995; Kalscheuer et al., 2003], с промяна на разположението на гените в този район, т. нар. „позиционен ефект [Kenwrick et al., 1987; Kleinjan & van Heyningen, 1998; Krebs et al., 1997] или нарушаване на родителския импринтинг [Dupont et al., 2002]. Приложението на все по-мощни техники за анализ като FISH, метафазна СГХ и микрочипова СГХ хвърля светлина върху молекулната природа на видимо балансираните хромозомни преустройства при пациенти с дисморфичен фенотип и доказва, че известна част от тях асоциират със скрити дисбаланси, под резолюцията на метафазния анализ. Става ясно колко сложни могат да бъдат хромозомните реаранжировки, засягайки до 5 хромозоми в комбинация от транслокации, инсерции и инверсии [Astbury et al., 2004; Ciccone et al., 2005; Gribble et al., 2005; Patsalis et al., 2004]. Установи се, че малки скрити патологични дисбаланси се намират не само в районите на скъсване, но и на други места в генома [Astbury et al., 2004; Ciccone et al., 2005; Gribble et al., 2005; Higgins et al., 2008; Kirchhoff et al., 2000; Patsalis et al., 2004; Schluth-Bolard et al., 2009]. При различни изследвания на пациенти с абнормен фенотип и видимо балансираните хромозомни транслокации с микрочипова СГХ се установяват патологични скрити делеции в 30-50% от пациентите [Baptista et al., 2008; De Gregori et al., 2007; Gribble et al., 2005].

5.4.1. Принцип на микрочиповата СГХ.

Принципът на микрочиповата СГХ се базира на конкурентната хибридизация на алтернативно белязани тестована и контролна ДНК върху картирани и секвенирани геномни клонове, фиксирани върху твърд носител под формата на микрочипове (Фиг. 11).



Фигура 11. Схематично представяне на принципа на микрочиповата СГХ.

Тестваната геномна ДНК обикновено се бележи с флуоресцентното багрило Су3 (Cy3 - зелена флуоресценция), а контролната ДНК със Су5 (Cy5 - червена флуоресценция). Контролната ДНК може да се избере от комерсиално достъпни контролни ДНК от здрави индивиди или да се направи собствен пул от контролна ДНК от мъже и жени без лична или фамилна анамнеза за вродени малформации, като контролната и тестваната ДНК трябва да съвпадат по пол. Белязането се осъществява посредством *nick* (белег) транслация. Процесът се нарича така, тъй като първоначално ДНК се третира с ДНК-аза, която създава едноверижни никове, впоследствие се добавя ДНК-полимераза с 5'-3' екзонуклеазна активност, която удължава 3'-хидроксилния край, като заменя небелязаните нуклеотиди с радиоактивно или флуоресцентно белязани dNTPs (Deoxyribonucleotides Triphosphate). На следващ етап създадените никове могат да бъдат лигирани чрез ДНК-лигаза или свободната 3'-хидроксилна група да послужи като матрица за действието на ДНК-полимераза I [Rigby et al., 1977]. При определени условия, в присъствието на Cot-1-ДНК за блокиране на повтарящите се последователности, белязаните ДНК хибридизират върху микрочиповете, след което се промиват за отстраняване на несвързаната ДНК. Детекцията на флуоресцентните сигнали се осъществява на лазерен скенер, като интензитетът на Су3 се измерва при дължина на вълната 532 nm, а на Су5 при 635 nm. Образите се анализират със софтуерна програма, която нормализира интензитетите на Су3 и Су5 спрямо целия

набор от флуоресцентни сигнали (точки) върху чипа и изчислява съотношението $Cy3/Cy5$ като двоичен логаритъм. Нормализацията обикновено е необходима за корекция на нежелани ефекти, дължащи се на вариации при белязането, настройки на скенера или изработка на микрочиповете [Staaf et al., 2007]. Най-честите нежелани ефекти са различия между интензитетите от образите на различни микрочипове, пространствени различия между образите и вариации на интензитетите в рамките на един образ. Всяка от тези вариации може да бъде коригирана чрез сложни математически операции [Wu, 2003], чиято крайна цел е да отстрани различията поради технически недостатъци и да запази промените, дължащи се на биологични причини [Quackenbush, 2002]. Въз основа на нормализираните $\log_2$ съотношения за всеки отделен клон, софтуерът прави полуколичествен анализ на CNVs за отделните клонове в целия геном [Pinkel & Albertson, 2005]. Ако интензитетите на $Cy3$ и $Cy5$ в дадена точка са еквивалентни, този район на тестваната ДНК се интерпретира като нормален (балансиран), стойности на флуоресцентното съотношение над и под определена стойност се отчитат съответно като дупликации или делеции.

Ограничения на микрочиповия CGH метод.

Наред със значителните предимства на молекулярното кариотипиране в сравнение с конвенционалното съществуват и някои недостатъци. Методът не може да детектира балансирани транслокации и кратни промени на хаплоидния хромозомен набор, както и моногенни дефекти. Тъй като се отчитат само количествени разлики между тестваната и контролната проба, балансирани транслокации, които по дефиниция нямат загуба или допълнение на генетичен материал, не могат да бъдат засечени. При полиплоидните аберации двойният интензитет от полиплоидната ДНК проба не се детектира поради нормализацията на съотношението от интензитетите на флуоресцентните сигнали. Друг недостатък на метода е, че някои гени инкорпорират с различна ефективност най-често използваните багрила $Cy3$ и $Cy5$, което води до грешка при отчитането на резултатите. Този недостатък може да бъде преодолян като се проведе експеримент с размяна на флуорохроми (dye swap), при който тестваната ДНК се бележи веднъж със $Cy3$ и втори път със $Cy5$ и съответно контролната ДНК със $Cy5$ и $Cy3$.

5.4.2. Видове микрочипове

С напредъка в развитието на технологиите се разработват различни технически платформи с все по-увеличаваща се резолюция. В близко бъдеще ДНК фрагментите ще се прилагат върху микрочиповете с все по-голяма гъстота, увеличавайки резолюцията и създавайки възможност за анализ на дисбаланси в отделни гени [Carter, 2007]. Докато геномната резолюция на микрочипа зависи от броя, разпределението и големината на ДНК секвенциите, възможността за детекция на CNVs зависи от съотношението на интензитета на сигналите и фоновия шум, както и от качеството на тестваната проба [Ylstra et al., 2006]. При създаването на дизайн на едно микрочипово изследване от особена важност за анализа е качеството, количеството и чистотата на изолираната ДНК [Tan et al., 2007]. ДНК с висока чистота и добро качество лесно може да се екстрахира от периферна кръв и прясно замразени тъкани. В някои случаи обаче (ДНК от фиксирани в парафин тъкани, амниотична течност, малко количество кръв), количеството на изолираната ДНК може да се окаже недостатъчно за провеждане на експеримента. Разработени са различни методи за цялостно геномно амплифициране, които осигуряват адекватни количества ДНК с възможно най-голямо приближение до оригиналния геномен профил [Arriola et al., 2007; Aviel-Ronen et al., 2006; Fiegler et al., 2007]. PCR-базираните методи като DOP-PCR осигуряват достатъчно количество ДНК за СГХ анализ, макар че в районите с по-голяма гъстота на високо-повторени ДНК секвенции като 1p32-pter, 16p, 19p, и 22q амплификацията се компрометира [Little et al., 2006]. MDA (Multiple Displacement Amplification) - множествена амплификация чрез отместване на пробата) е не-PCR-базирана амплификация, при която се генерират крайни продукти с по-големи размери и по-голяма достоверност. Реакцията се инициира чрез хибридизация на случайни хексамерни праймери към ДНК-матрицата в присъствието на Phi29 полимерaza или големи фрагменти Bst ДНК-полимерaza. [Arriola et al., 2007; Lovmar & Syvanen, 2006]. MDA може да намножи ДНК от единична клетка до 1-2µg с покритие на генома до 99% [Spits et al., 2006].

Микрочиповете могат да бъдат класифицирани в зависимост от: а) дължината на използваните ДНК-секвенции (кДНК-, олиго-, ВАС-чипове); б) техниката на конструиране на ДНК секвенциите върху микрочипа (накапвани върху чипа или синтезирани *ин ситу*); в) условията на хибридизация на белязаната тествана ДНК

(едноканални и двуканални чипове); г) обхвата на анализа (таргетни и ЦГА-чипове) и д) вида на анализа (експресионни, генотипиращи, метилационни, CNVs-чипове, ChIP-on-chip).

а) Дължина на използваните ДНК секвенции.

При конструирането на микрочиповете, се използват ДНК секвенции с различни размери: комплементарни ДНК (кДНК)-клонове (0,5-2 Kb), сравнително големи ВАС-клонове (80-200 Kb), фосмидни и космидни клонове (~40 Kb), геномни PCR-продукти (100-1,5 Kb), олигонуклеотиди (25-80 bp), SNPs-олигонуклеотиди (25 bp) [Carter, 2007; Tan et al., 2007].

Фосмидни и космидни клонове

Фосмидните и космидните клонове имат приблизителна дължина ~40 Kb и осигуряват достатъчно добро съотношение между интензитета на сигналите и фоновия шум. Малките им размери допринасят за добра резолюция от около 20 Kb, която максимално може да се качи до 15 Kb.

Геномни PCR продукти

Още по-висока резолюция може да се постигне с геномни PCR продукти, но за сметка на по-лошото съотношение SBR (Signal to Background Ratio) [Dhami et al., 2005; Mantripragada et al., 2003]. Един от основните недостатъци на чиповете, конструирани от геномните PCR продукти, е начина на фиксиране на клоновете върху носителя. Прилага се механично накапване на ДНК разтвора върху микроскопско стъкло, което не позволява фиксирането на повече от 60 000 елемента и ограничава постигането на много висока резолюция. Трябва да се има също предвид, че секвенциите могат съдържат сегментни дупликации или LCRs, което може да маскира CNVs в изследвания геном в случай на хомоложност.

Комплементарни ДНК микрочипове

В исторически план първите чипове използвани за геномен анализ са кДНК микрочиповете, които се прилагат за експресионен анализ [Pollack et al., 1999]. Технически чипът се изработва като със специфични праймери се амплифицират конкретни гени, при което се генерират кДНК-проби. Получените продукти се

фиксира на предметно стъкло, обикновено в няколко копия за по-голяма сигурност [Cheung et al., 1999; Schena, 2003]. Самият експеримент накратко включва следните стъпки: изолиране на мРНК от контролна и тествана проба; обратна транскрипция до кДНК, по време на която в новосъздадената кДНК се инкорпорират Cy5 и Cy3, съответно в контролната и тестваната проба; хибридизация, промивка, скениране и анализ [Cheung et al., 1999; Remme et al., 2001]. Комплементарните ДНК-чипове предлагат много висока резолюция, позволяваща анализ на единични гени или дори части от гени [Carter, 2007], както и директна корелация на геномните алтерации с експресионните нива, но анализът е ограничен само до известни гени и експресирани секвенции [Tan et al., 2007].

ВАС-микрочипове

BACs-, PACs- и YACs- (Yeast Artificial Chromosomes) клоновете имат най-големи размери от използваните при направата на микрочипове и са широко използвани [Lockwood et al., 2006; Oostlander et al., 2004; Pinkel & Albertson, 2005]. Те варират по дължина от 100 до 200 Kb и осигуряват достатъчно интензивни сигнали, така че могат да бъдат измервани брой копия в широк диапазон от делеции до амплификации [Pinkel et al., 1998]. От друга страна големите им размери ограничават резолюцията им средно до 80-200 Kb. При tilling (препокриващи се) ВАС-чиповете всеки ВАС - клон се застъпва от следващия като така резолюцията се вдига до ~50 Kb. Един от недостатъците на ВАС-чиповете е, че поради големите им размери те съдържат високо повторени последователности, което може да доведе до неспецифична хибридизация. Още повече понастоящем информацията за вариациите в човешкия геном е недостатъчна, поради което често възникват грешки при картирането на ВАС-клоновете. Това налага всички данни, получени от ВАС - чиповете, да бъдат допълнително валидирани с втори метод като FISH или real-time copy number PCR. ВАС - чиповете се предлагат в два различни формата - за таргетен и ЦГА-анализ, като ЦГА-чиповете включват между 2400 до 32 000 ДНК секвенции.

Олигонуклеотидни микрочипове

Олигонуклеотидните платформи се конструират от едноверижни 25 до 85 bp олигонуклеотидни елементи [Barrett et al., 2004; Fan et al., 2006; Ylstra et al., 2006]. Олиго-базираните чипове предлагат най-високата възможна резолюция за микрочипова

СГХ. В зависимост от използваната техника на фиксиране на клоновете върху един микрочип теоретично могат да се позиционират до 4.2 милиона ДНК секвенции с максимална резолюция приближаваща се до конвенционалното ДНК секвениране (1–800 bp) [Carter, 2007]. Понастоящем са достъпни олиго-чипове с 1 милион олиго клонове. Недостатък на тази платформа е по-ниското съотношение между интензитета на сигналите и фоновия шум. Обикновено SD (Standard Deviation) на $\log_2$ съотношението при олиго-чиповете е от порядъка на 0.25, докато при ВАС-чиповете SD е около 0.05 [Carter, 2007].

SNPs-чипове

SNPs-чипове, наричани още генотипиращи чипове, се конструират също от олигонуклеотиди. Олигонуклеотидите съответстват на различни еднонуклеотидни замени в човешкия геном и позволяват скрининг за скачени хромозомни локуси с помощта на голям брой полиморфни маркери [Schork, 1997]. Генотипиращите чипове се използват за цялостни геномни асоциативни проучвания, при които се сравняват алелните и генотипните честоти на огромен брой ДНК полиморфизми между неродствени пациенти и незасегнати индивиди от една и съща популация [Bunney et al., 2003; Eberle et al., 2007]. Този подход е изключително полезен при идентифицирането и анализа на позиционни кандидат гени при различни мултифакторни заболявания. Създадени са подробни карти на генетичните варианти в човешкия геном, които позволяват бърз достъп до детайлна информация за генетични заболявания, гени, последователности, полиморфизми. Една такава публично достъпна база данни е НарМаp (www.hapmap.org) [НарМаp], която каталогизира SNPs в четири от най-големите човешки популации [Nature, 2005]. В допълнение към информацията, която се получава за вариациите в алелните копия, SNPs-чиповете позволяват разпознаването на събития, непроменящи генната доза като UPD и митотична рекомбинация и загуба на хетерозиготност [Tan et al., 2007].

Най-популярните SNPs платформи са различни варианти на микрочипове на Affymetrix и Illumina. Affymetrix използва набор от алел-специфични олигонуклеотиди със дължина 25 bp, фотолитографски синтезирани върху чипа (<http://www.affymetrix.com/>). Олигонуклеотидите са подбрани така, че само половината от тях са комплементарни на еднонуклеотидната замяна. В случая не се прилага ко-

хибридизация, тъй като чиповете са едноканални и хибридира само тестваната ДНК. Тестваната ДНК се смела с рестриктази, лигира се към адаптори и се амплифицира чрез универсални праймери, които разпознават секвенцията на адапторите. Амплифицираната ДНК впоследствие се фрагментира, бележи и хибридира върху SNPs-чипа [Affymetrix].

Illumina разработва алтернативна платформа, базираща се на BeadArray технология, при която върху носител са нанесени над 500 000 силиконови гранули <http://www.illumina.com/>. Към всяка гранула са прикрепени копия от една и съща локус-специфична олигонуклеотидна последователност с дължина 50 bp и резолюция до 1–800 bp [Carter, 2007]. След цялостна геномна амплификация тестваната ДНК хибридира с комплементарните ѝ олигонуклеотидни фрагменти върху гранулите. След хибридизацията на ДНК фрагментите следва ензим-медирано алел специфично удължаване на олигонуклеотидите върху гранулите, белязане на пробите с флуорохроми и имунохистохимична флуоресцентна детекция на сигналите [Illumina].

б) техника на конструиране на ДНК секвенциите върху микрочипа (шаблонни и рандом-чипове)

Шаблонни микрочипове

При шаблонните чипове по определена матрица върху плоска повърхност се накапват или синтезират ин ситу ДНК секвенции. Главният проблем е идентификацията на пробите в случай на PCR контаминация. При накапването пробите (сДНК, ВАС и някои олигонуклеотиди) се синтезират предварително и се фиксират върху предметното стъкло от много фини роботизирани игли. При този подход често има разлики между чиповете от различните серии, дължащи се на различна влажност по време на накапването, по-високо съдържание на озон в средата, дефект в накапващите игли. Това се отразява на морфологията на ДНК точките върху чипа и съответно качеството на последващата хибридизация. Алтернатива на накапването на ДНК секвенциите при шаблоните чипове е фотолитографско синтезиране ин ситу на олигонуклеотидни секвенции върху повърхността на микроскопското стъкло [Gao et al., 2001] [Pease et al., 1994].

Рандом микрочипове

За разлика от шаблонните чипове, при рандом-чиповете ДНК секвенциите предварително се прикрепват към гранули, които се фиксират в създадени върху силиконов носител микрокладенчета с големина около 3 μm , отстоящи на 5,7 μm едно от друго. Това позволява около 30 реплики за всяка проба в чипа. Идентификацията на всяка гранула се прави след хибридизация със специфични белязани компоненти, комплементарни на секвенциите от гранулите. Понастоящем основният производител на рандом-чипове е Illumina (<http://www.illumina.com>).

в) условия на хибридизация на белязаната тествана ДНК (двуканални и едноканални чипове)

Двуканални чипове

Принципът при двуканалните чипове се базира на конкурентната хибридизация между две проби ДНК (обикновено контрола срещу пациент), белязани с два различни флуорохрома [Shalon et al., 1996]. По-подробно обяснение на принципа е направено по-горе в текста на стр. 47, раздел II. 5.4.1.

Едноканални чипове

При едноканалните чипове ДНК-ките се бележат и хибридизират поотделно върху олигонуклеотиди, фиксирани върху чипа. Използват се за експресионен анализ. Тестваните проби се оцветяват с един и същи флуорофор и се провеждат две независими хибридизации върху отделни чипове. Една от силните страни на този подход е, че резултатите не могат да бъдат маскирани, поради вариации в контролната ДНК [Kumar, 2011]. Анализът на две състояния на един и същ ген изисква две отделни хибридизации с използвания флуорохром. Недостатък в сравнение с двуканалните чипове е необходимостта от двойно повече чипове. Някои от по-популярните едноканални платформи са Affymetrix "Gene Chip", Illumina "Bead Chip", Agilent single-channel arrays, the Applied Microarrays "CodeLink" arrays и the Eppendorf "DualChip & Silverquant".

г) обхват на анализа (таргетни и ЦГА-чипове)

Таргетни чипове

Таргетните чипове съдържат специфични региони от генома, отговорни за известни микроделеционни/микродупликационни синдроми, но не дават информация за останалата част от генома.

Чипове за цялостен геномен анализ

Чиповете за ЦГА осигуряват пълно покритие на генома като увеличават откриваемостта с 5% със сравнение с таргетните чипове [Veltman & de Vries, 2006].

Сравнение между двата алтернативни формата е направено в главата „Вариации в човешкия геном”, стр. 21, раздел II. 4.1.3.1.

д) вид на анализа (експресионни, генотипиращи, метилационни, CNVs-чипове, ChIP-on-chip)

Експресионни чипове

Експресионният анализ на ниво РНК дава възможност едновременно да се измери активността на хиляди гени в тоталната РНК, което намира приложение при изучаването на ефектите на определена терапия, на промените на експресията по време на ембрионалното или индивидуалното развитие. Експресионното профилиране може да се използва и при идентификацията на гени с променена експресия под действието на патогенни микроорганизми. Принципът на метода се базира на изолиране на геномна РНК и превръщането ѝ в кДНК, която хибридизира върху едноканални или двуканални чипове, съдържащи олигонуклеотиди от целия геном [Diaz & Barisone, 2011; Duggan et al., 1999]. Подвид на експресионните чипове са miRNA (микро РНК) чиповете. Микро РНК-ите са малки молекули, siRNA-подобни молекули, които регулират генната експресия, като се свързват към специфични мРНК и модулират транслацията им. Доказани са вариации в експресионните нива на miRNA в различните тъкани и стадии на развитие и е установена понижена експресия при пациенти с хронична лимфоцитна левкоза, аденокарцинома на колона и лимфом на Бъркит [Calin et al., 2002; Calin et al., 2004; Michael et al., 2003]. Приложението miRNA базираните чипове ще допринесе за по-доброто разбиране на ролята на miRNA за генната регулация [Sun et al., 2004].

Чипове за метилационен анализ

Метилационните чипове също се използват за експресионен анализ, тъй като е добре известно, че метилирането на ДНК има съществен ефект върху генната експресия. В човешкия геном 4% от цитозиновите остатъци са метилирани в 5' позиция. ДНК метилирането има ключова роля за геномния импринтинг, поддръжката на геномния интегритет и е важен фактор при развитието на неопластичните процеси [Egger et al., 2004; Ehrlich, 2002; Jones & Baylin, 2002]. Един от подходите за изолиране на метилираните участъци се базира на третиране на ДНК с бисулфит, при което цитозиновите бази се дезаминират и придобиват структура подобна на урацила. Същевременно метиловите остатъци на амидните групи на цитозиновите бази ги предпазват от дезаминиране при химично въздействие с бисулфит. В резултат на бисулфитното третиране, ДНК фрагмент, който е бил с метилирани GC острови ще генерира матрица, различна от изходната. Алтернативен подход за изолиране на метилираните участъци в генома е имунопреципитация на метилираната ДНК (MeDIP - Methylated DNA immunoprecipitation). Използват се моноклонални антитела, насочени срещу 5-methylcytosine [Weber et al., 2005]. След последваща амплификация, пречистване и белязане се спазват принципите на микрочиповата CGX [Jia et al., 2010]. Обикновено при метилационните чипове се прилага двуканалния подход, при който тестваната и контролната ДНК се бележат с различни флуорохроми, след което хибридизират върху ВАС или олигонуклеотидни секвенции.

Генотипиращи чипове

По същество те представляват SNPs-чипове с дължина на олигонуклеотидите между 25 и 50 bp и са разгледени подробно по-горе в текста. Генотипиращите чипове са в основата на революционна техника, наречена кариокартиране (karyomapping). SNP-генотипиращият анализ на родителите и потомството позволява картирането на кросовърите между родителските хаплотипи и конструирането на кариокарта, съгласно менделовите закони. Това дава възможност за идентифициране на информативни локуси за всеки от четирите родителски хаплотипа, картиране на унаследяването на хаплотипите и позицията на всеки кросовър при пробанда. Така за разлика от конвенционалния кариотип може да се установи родителския и пра-родителския произход на хромозомите и хромозомните сегменти в рекомбинантните хромозоми.

Това позволява едновременно цялостен геномен анализ за скаченост на моногенни болести и детекция на хромозомни дисбаланси (тризомия - при наличие на 2 хаплотипа от един родител, монозомия - при липса на хаплотип от единия родител). Кариокартиране може да се проведе след цялостна геномна амплификация и на единична клетка за целите на предимплантационната генетична диагностика, давайки възможност за диагностика на всички известни моногенни болести [Handyside et al., 2009]

CNVs чипове

Базиран е на конкурентна хибридизация между различно белязани с флуорохроми контролна и тествана ДНК. Принципът е разгледан подробно по-горе в текста на стр. 47, раздел II.5.4.1.

ChIP-on-chip чипове

ChIP-on-chip техниката, известна още като Location Analysis комбинира хроматинна преципитация с микрочипова технология. Прилага се при проучването на взаимодействията между белтъците (хистони, транскрипционни фактори) и ДНК, епигенетични модификации и позволява идентификацията на цистроми и свързващи места за ДНК-свързващи протеини. Методиката включва крос-свързване, имунопреципитация на белтък-ДНК комплексите, пречистване, амплифициране и хибридизация върху високорезолютивни чипове [Chen et al., 2010; Ren et al., 2000; Zheng, 2011].

6. Профилактика на вродените аномалии

Вродените аномалии представляват значително финансово и емоционално бреме за семейството и обществото, имат директен негативен ефект върху раждаемостта и повишават заболяемостта и смъртността във всички възрастови групи. Въпреки че по-леките вродени дефекти често могат да бъдат оперативно коригирани, семействата и лекарите все още нямат отговор относно причините за тях, риска за повторение и стратегиите за профилактика. Във всички развити страни са разработени мащабни програми за превенция на вродените аномалии. България е една от първите европейски държави, която има разработена специфична национална политика за редките болести.

Понастоящем в сила е III-тата Национална програма (2009-2013 год.) за „Диагностика, профилактика и контрол на лечението на наследствените болести, предразположения и вродените аномалии”. Сред приоритетните цели на програмата са: подобряване на диагностиката и профилактиката на наследствените и вродени болести и предразположения; подобряване контрола на лечението на генетичните и вродени болести; подобряване структурата на генетичната и скринингова мрежа в страната; създаване на публична база данни за регистрация на генетичната патология у нас с оглед подобряване на здравната статистика и разработване на бъдещи стратегии за развитие на здравеопазването; създаване и укрепване на съществуващите биобанки за генетични изследвания; повишаване на генетичната осведоменост на населението и медико-генетичната квалификация на медицинските специалисти.

Методите за превенция на ВА най-често се класифицират на 3 нива:

1. *Първична превенция*: избягване на причината/те за вродените дефекти, например ваксинация срещу рубеола, прием на фолиева киселина, мултивитаминозни препарати.
2. *Вторична превенция*: ранно откриване, последвано от ефективно ранно лечение, напр. вродена луксация на тазобедрената става, крипторхизъм. До скоро време, избирателното прекъсване на бременността при пренатално диагностициране на тежки фетални дефекти също беше причислявано към вторичната превенция. Наскоро СЗО и други международни организации изключиха този подход от термина „превенция”.
3. *Третична превенция*: пълно отстраняване на вродени аномалии чрез ранна хирургическа намеса. Третичната превенция позволява пълно възстановяване в 33.5% от случаите на вродени аномалии.

Основната част от вродените аномалии (85.3%) са предотвратими; въпреки това не съществува единна стратегия за превенцията им [Czeizel, 2005]. Поради тази и други причини, пренаталната диагностика (ПД) е важен елемент от клиничното проследяване на самата бременност, както и като важна стъпка към откриване, превенция и евентуално лечение на генетичните заболявания. ПД включва комплекс от техники и методи за диагностика с цел изясняване здравословното състояние на фетуса преди

раждането му и изясняване риска за раждане на болно дете. ПД е сравнително нов клон от медицината, наложил се през 80-те години на миналия век. Първото съобщение за ПД се появява през 1955 год., когато Fuchs и Riis и Serr и сътрудници докладват за определяне на фетален пол чрез изследване на полов хроматин (телце на Бар) в амниотични клетки. На практика методите за ПД се разделят на инвазивни и неинвазивни. Към неинвазивните методи спадат ехографията на плода, електрокардиографията, рентгенографията и др. Най-често прилаганият метод от тях е ултразвуковото изследване. Това е високоефективен и безвреден за майката и плода метод, който позволява да се открият около 80-98% от плодовете с анатомични пороци и е особено информативен в сроковете 11-14 г.с., 18-20 г.с. и 28-32 г.с. За състоянието на плода може да се съди и по биохимични показатели на кръвта и урината на бременната, по акушеро-гинекологичната ѝ анамнеза, резултатите от проведените бактериологични, имунологични и ендокринологични изследвания (т.нар. индиректни методи). Биохимичните изследвания на серумните маркерни протеини на бременната, заедно с ултразвуковото изследване, са особено полезни за откриване на жени с висок риск за раждане на деца с хромозомни болести и пороци на развитието. Трябва да се помни все пак, че биохимичният скрининг не е диагноза, а само оценка на риска. Под инвазивни методи се разбират вътрематочните интервенции под ултразвуков контрол при стерилни условия с цел получаване материал от плода за хистологични, биохимични, цитогенетични или молекулно-генетични изследвания. Най-често прилаганата инвазивна пренатална техника е късната амниоцентеза, следвана от хорионбиопсията, а много рядко се използва кордоцентезата. Историческа стойност имат феталната биопсия и фетоскопията. Многообещаващо е въвеждането на микрочиповата СГХ за целите на пренаталната диагностика. Методът може да се прилага в клиниката и да дава надеждни резултати за кратко време (около 5 дни). Микрочипова СГХ може да се извърши върху ДНК, изолирана от единични клетки, клетки от хорионни въси или амниоцити. Тъй като интерпретацията на големия брой CNVs, които се откриват при микрочиповия анализ е много сложна [Shaffer et al., 2007], голям брой от цитогенетичните лаборатории все още се въздържат от широкото приложение в практиката на ЦГА микрочиповия анализ за целите на пренаталната диагностика [Evangelidou et al., 2010]. В литературата има публикувани известен брой проучвания, доказващи предимствата на молекулното кариотипиране пред

конвенционалното, но все още е необходимо да се натрупат повече знания за значението на различните CNVs [Coppinger et al., 2009; Le Caignec et al., 2005; Rickman et al., 2005; Rickman et al., 2006; Sahoo et al., 2006; Shaffer et al., 2008; Sutton & Shaffer, 2000; Valduga et al., 2010; Vialard et al., 2009]. Съдейки по сложността при интерпретирането на данните от целия геном, най-вероятно за целите на пренатална диагностика ще се наложат таргетните чипове за целенасочен скрининг на анеуплоидии или известни микроделеционни/микродупликационни синдроми [Shaffer et al., 2006].

Микрочиповия СГХ предлага и нови възможности за превенция. Техниката позволява изследването на генома на единична клетка и отваря възможности за анеуплоиден скрининг, откриване на небалансирани транслокации и менделови болести в хода на предимплантационна генетична диагностика в полярни телца, единични бластомери и трофектодермни клетки [Alfarawati et al., 2011; Fiegler et al., 2007; Fiorentino et al., 2011; Fishel et al., 2010; Handyside et al., 2009; Le Caignec et al., 2006].

Неразривна част от профилактиката на ВА е медико-генетичното консултиране (МГК). МГК е процес, който включва няколко етапа: поставяне на точна клинична диагноза, генеалогичен анализ, определяне на риска за повторение, предаване на родителите на заключение от МГК и избор на подходяща терапия и превенция [Mueller & Young, 2001]. Един от основните принципи на МГК гласи, че без точна диагноза не е възможно прогнозиране на риска. Ето защо от изключителна важност е изясняването на етиологията на медицинския проблем.

Обобщение

Микрочиповата СГХ все по-често намира приложение като основен генетичен скринингов метод, както в изследователската дейност така и в диагностиката. Техниката позволява детекция на патологични субмикроскопски хромозомни нарушения при пациенти с аномалии в развитието. При част от пациентите с вродени малформации причината за абнормния фенотип са различни аберации, които обхващат локуси на гени, свързани с човешкото развитие. Този факт е от изключително значение при фенотип/генотипните корелации и при идентификацията на гените. Поради факта, че повечето нарушения включват локуси с множество гени, предизвикателствата са: 1) да се идентифицират гените, отговорни за даден фенотип и 2) да се разгадае ролята на отделните гени, локализирани в небалансирания участък. Високата резолюция на микрочиповия СГХ метода го прави основен метод на избор при определяне на кандидат-районите за гени, отговорни за генетични заболявания при човека. Той способства при определянето и прецизирането на критичните региони и броя на кандидат-гените за дадено заболяване или фенотипна изява. Тези предимства на техниката ни насочиха към търсене на нови небалансирани микроструктурни аберации в по-голяма извадка от пациенти с множествени вродени малформации и търсене на нови фенотипно-генотипни корелации. Допуснахме, че при част от пациентите вероятната причина за патологичния фенотип е нарушената функция на гени в резултат на микроструктурни аберации, неоткриваеми с рутинните диагностични методи. Тъй като количествените вариации в генома оказват голямо влияние върху състоянието на здраве и болест, детайлното проучване на геномните изменения, би могло да разкрие нова информация за фенотипния ефект на гени с неясна понастоящем функция. Беше допуснато, че в част от случаите с неясна етиология се касае за фамилни микроструктурни аберации, които се предават в небалансиран вид на потомството и поради ограниченията на конвенционалните методи, такива „скрити” геномни преустройства остават недиагностицирани.

III. 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.

IV. 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 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 небалансирани геномни микроизменения [Rio et al., 2002]. 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 CGH анализ са селектирани 52 пациента с BM - 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” (Приложение 1, стр. 184) и са подписали информирано съгласие за участие или това е направено от техен родител/пълномощен представител (Приложение 2 и 3, стр. 185 и 187).

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

небалансиращи 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. Кръвта е вземана до един час след нахранване (във връзка с постпрандиалното левкоцитоза) и съхранявана на +4°C до транспортирането в лабораторията на Катедрата по медицинска генетика. Изолирането на ДНК е извършвано не по-късно от 24 часа след вземане, а поставянето на лимфоцитни култури в рамките на същия ден. 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. При провеждането на експериментите са съблюдавани аспектите на добрата лабораторна практика за безопасна работа с биологичните агенти - ръкавици, очила, ламинарни боксове, отделни стаи за ДНК изолиране, стерилни камери, стерилни съдове, специални контейнери за отпадъците.

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.

3.1. Конвенционален цитогенетичен метод

3.1.1. *Поставяне и обработка на клетъчни култури от цялостна кръв.*

3.1.2. *Изготвяне на микроскопски препарати.*

3.1.3. *Изготвяне на микроскопски препарати.*

3.1.4. *Микроскопски анализ.*

Реактиви: Lymphochrome - готова комплексна среда за култивиране на лимфоцити от периферна кръв; колцемид; 0,75 моларен хипотоничен разтвор на KCl; пресен фиксатор от метанол и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1 на -20°C.

Апаратура: стерилен ламинарен бокс; центрофуга; устройство за разбъркване Vortex-Genie 2; термостат на 37°C.

Техника: техниката на рутинния цитогенетичен анализ, провеждан на краткосрочни лимоцитни култури, включва няколко основни етапа: 1) поставяне на клетъчни култури от цялостна кръв; 2) обработка на културите; 3) изготвяне на микроскопски препарати; 4) оцветяване на препаратите; 5) микроскопски анализ.

3.1.1. Поставяне и обработка на клетъчни култури от цялостна кръв

Средата за култивиране се разлива по 5 ml в стерилни флакони за култивиране. За всеки пациент се посяват 2 култури, като се работи се в стерилен ламинарен бокс. Във всеки флакон се добавя съответното количество кръв. За култивиране се предпочита прясно взета кръв, но при съхранение до 5 дни при 4°C също може успешно да се култивира. Кръвта трябва се взема в епруветка с Li- или Na-хепарин или с Na - цитрат като антикоагулант. Количество кръв за 5 ml култура:

- новородени – 0,1 ml
 - деца до 5 год. – 0,5 ml
 - деца над 5 год. и възрастни – 0,5 ml
- Инкубира се на 37°C за 68 - 72 часа.
 - Между 68 и 72 час към културата се добавя 0,05 ml колцемид.
 - Инкубира се за 25 min в термостат на 37°C.
 - Културата се прехвърля в центрофужна епруветка.
 - Центрофугира се за 10 min на 1000 оборота.

- Отпипетира се надстоящата течност.
- Утайката се разбива.
- Добавят се 5 ml предварително темперирани на 37°C хипотоничен разтвор на KCl.
- Инкубира се 10 min в термостат при 37°C.
- Центрофугира се за 10 min на 1000 оборота.
- Отпипетира се супернатанта, утайката се разбива и се добавят 5 ml пресен студен фиксатор.
- Горните две стъпки се повтарят още два пъти. Центрофугира се за 10 min на 1000 оборота.
- Отпипетира се супернатанта.
- Утайката се ресуспендира в малко количество пресен фиксатор и се съхранява на -20°C.

3.1.2. Изготвяне на микроскопски препарати

Апаратура: нагревателна плоча.

Техника (накапване на фиксираната лимфоцитна суспензия върху предметни стъкла):

- Предметните стъкла, предварително обезмаслени за 24 часа в абсолютен алкохол се изплакват и се охлаждат в дестилирна вода до 0-4°C.
- За накапване се използва охладена клетъчна суспензия. Преди накапването епруветките може да се оставят за 30 min във фризер - за по-добро фиксиране и разпръскване на хромозомите.
- Накапването се прави от височина 25-30 cm на хоризонтално разположени студени, мокри стъкла.
- Стъклата леко се отцеждат и се сушат на въздух при стайна температура наклонени под ъгъл 60°.
- Всеки препарат се надписва: амбулаторен номер на пациента, година, номер на посявката, номер на стъклото, абривиатура на оцветителната техника.
- Изсушените препарати се поставят за 45-50 min на термостатна плоча нагрята до 100°C.
- Оцветяването започва след като препаратите се охладят до стайна температура.

3.1.3. Оцветяване на препаратите с GTG - техника

Апаратура: светлинен микроскоп с увеличение 1000 пъти

Реактиви: PBS (4 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.46 g Na₂HPO₄, 0.1 g KH₂PO₄, 500 ml dH₂O), трипсин, буфер KH₂PO₄, буфер Na₂HPO₄.

Техника (приготвяне на батерията за оцветяване):

I-вата кювета (стайна температура): 15 mg трипсин в 75 ml PBS

Престой на препаратите: 1-2 min (времето на престой се определя емпирично).

II-рата кювета (4°C): 75 ml PBS

Престой на препаратите: проплакване на стъклата

III-та кювета (4°C, pH=6.8): 34 ml буфер KH₂PO₄, 41 ml буфер Na₂HPO₄, 3,5 ml боя на Gimsa.

Престой на препаратите: от 4 до 6 min

IV-та кювета (4°C): дестилирана вода

Престой на препаратите: проплакване на стъклата. Качеството на оцветяването се контролира на микроскоп.

Оцветяват се както пресни препарати, така и препарати 7-ми ден. При експресно GTG оцветяване препаратите се пекат на електрическа плоча при 100°C за 45 min.

3.1.4. Микроскопски анализ

За анализ се избират подходящи метафазни пластинки с добре разпръснати, непокриващи се хромозоми и отчетливо лентуване. При увеличение 1000 пъти всяка метафазна пластинка се анализира за бройни и структурни хромозомни аберации. При некомплицирани случаи се анализират 12 - 15 пластинки. Ако има съмнение за мозаицизъм, броят на анализирани пластинки може да се увеличи до 100. Няколко пластинки се заснемат със CCD устройство и се кариотипират със софтуерна програма за автоматизиран анализ на метафазни хромозоми - ICAROS на MetaSystems, Germany.

3.2. Фенол-хлороформна екстракция на високомолекулна ДНК от венозна кръв

Високомолекулна ДНК е изолирана чрез фенол-хлороформна екстракция. Фенол-хлороформната екстракция се основава на извличането на белтъци и други съставки от клетъчен лизат в органична фаза, като ДНК остава във водната фаза и се преципитира с етанол.

Апаратура: центрофуга Rotina 46, устройство за разбъркване Vortex-Genie 2, термостат на 37°C.

Реактиви: лизиращ буфер, pH 7.4, 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, нуклеолизиращ буфер (SE), pH 8.0, 75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, 10% натриев додецил сулфат (SDS - Sodium Dodecyl Sulfate), 20 mg протеиназа К, 70% и 96% етилов алкохол, стерилен TE-буфер (pH 8.0, 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA).

Техника:

- Вземат се 10 ml периферна кръв в епруветки с Na₂EDTA като антикоагулант.
- Кръвта се прехвърля в 50 ml пластмасова стерилна епруветка.
- Добавят се 30 ml прясно приготвен лизиращ буфер (pH 7.4). Еритроцитите се лизират чрез леко обръщане на епруветките няколко пъти, след което пробите се оставят за 30 min на лед. Центрофугират се на 2500 rpm на 4°C за 15 min. Супернатантът се отстранява, утайката се разбърква и стъпката се повтаря отново.
- Утайката от бели кръвни клетки се разтваря в 3 ml SE буфер чрез разбъркване. Добавя се 300 µl 10% SDS разтвор и 50 µl от 20 mg/ml разтвор на протеиназа К.
- Сместа се инкубира на 37°C за една нощ или на 55°C за 5 часа до получаване на вискозен разтвор.
- Добавя се равно количество (около 3 ml) фенол еквилибриран с 0,5M Tris Cl (pH 8,0) и се разбърква на вортекс за 15 sec.
- Центрофугира се на 3000 rpm на стайна температура за 15 min.
- *Ако органичната и водната фаза не са добре разделени, се центрофугира отново за по-дълго време или на по-висока скорост.
- Водната фаза се пренася в чиста епруветка с пастъорова пипета.

- За малки обеми (<200 µl) се използва автоматична пипета.
- Добавя се равно количество фенол:хлороформ:изоамилов алкохол (25:24:1=vol:vol:vol), разбърква се на вортекс или за 30 min на ролер и се центрофугира на 3000 rpm на стайна температура за 15 min.
- Горната водна фаза се прехвърля в чиста центрофужна епруветка и се прибавя равно количество хлороформ:изоамилов алкохол (24:1=vol:vol) и епруветката се разбърква на вортекс или се поставя на ролер за 30 min.
- Центрофугира се на 3000 rpm на стайна температура за 15 min.
- Водната фаза се прехвърля с пастърова пипета в чиста епруветка.
- Добавят се 3 обема ледено студен абсолютен етанол (96%). Епруветките се обръщат, докато разтворът се разбърка добре. ДНК преципитира веднага, след което може да бъде извадена от етанолния разтвор със стерилна пастърка.
- Ако ДНК е фрагментирана се налага центрофугиране на 5000 rpm за 5 min на стайна температура.
- ДНК преципитатът се промива в 70% етанол два пъти и се изсушава на стайна температура.
- 70%-ият етанол се отстранява възможно най-пълно, утайката се оставя в отворена епруветка на стайна температура, докато и последните видими останки от етанола се изпарят.
- Добавят се 500-1000 µl стерилен TE буфер.
- Епруветките се поставят на ролер докато ДНК напълно се разтвори (12-24 часа).
- ДНК се съхранява на -20°C.

3.3. Хоризонтална гел-електрофореза и спектрофотометрично измерване

Оценка на качеството и количеството на тестваната и нормална ДНК е направена чрез хоризонтална нисковолтова агарозна гел електрофореза. Хоризонталната нисковолтова агарозна гел електрофореза дава възможност ДНК фрагментите да се разделят според заряда и молекулната си маса. Затова тази техника се използва за определяне на количеството и качеството на ДНК. Разтвореният в агарозния гел етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК под действието на UV- светлина.

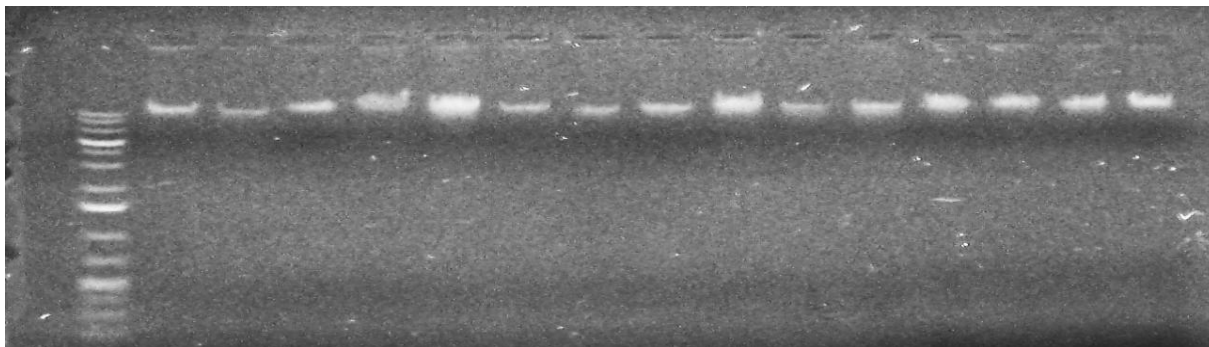
Апаратура: нагревателен уред с магнитна бъркалка за разтапяне на агарозата, нивелирана масичка за изливане на гела, апарат за хоризонтална електрофореза (GibcoBRL, Horizon 20-25), пластмасова вана за изливане на агарозния гел със стартови гребени, токоизправител (Gibco BRL, PS 3002), UV - трансилюминатор с дължина на вълната 315 nm.

Реактиви: 10×TBE електрофоретичен буфер (pH 8.0, 90 mM Tris-HCl, 90 mM борна киселина, 1 mM Na₂EDTA), 1% агароза (Agarose GibcoBRL) в 1×TBE електрофоретичен буфер, 10 mg/ml етидиев бромид, разтвор за нанасяне на пробите (6x).

Техника:

- Върху пластмасова ваничка за изливане на гел се поставя стартовия гребен.
- Приготвя се 1% агарозен гел: 1 g агароза в 100 ml 1×TBE буфер.
- Приготвената смес се вари на нагревателен уред с магнитна бъркалка до пълното стапяне на агарозата.
- Изчаква се температурата да спадне до 60-65°C, след което се добавят 2 µl етидиев бромид.
- Гелът се излива във ваничката и се изчаква до пълното му полимеризиране.
- Приготвя се микс за гела: 1 µl ДНК в 3 µl син разтвор за нанасяне на пробите.
- Електрофоретичната вана се напълва с 1×TBE буфер така, че да се покрие изцяло гела.
- Под буфера в стартовите ямки на агарозния гел се накапват по 7 µl от микса за всяка проба.
- Разделянето се извършва при подавано напрежение от 80 V/cm.

- Фрагментите се визуализират с UV при 315 nm дължина на вълната.
- Гелът се оставя да тече в продължение на 30 min, след което се заснема (Фиг. 12).



Фигура 12. Електрофоретична оценка на качеството на изолираната ДНК.

Високомолекулната ДНК се визуализира като тесни ясно флуоресциращи ивици в гела.

Спектрофотометрично оценка на изолираната ДНК

Измерването на концентрацията на геномна ДНК се извършва спектрофотометрично. Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda=260$ nm от пуриновите и пиримидиновите бази в ДНК.

Апаратура: NanoDrop® ND-2000 - спектрофотометър, работещ с обеми от 1-2 μ l.

Препоръчително е съотношенията на чистота да бъдат $OD\ 260/280 = 1.8-2.0$; $OD\ 260/230 > 2.0$.

3.4. FISH анализ с локус-специфични проби

3.4.1. Предобработка на препарата

3.4.2. Денатурация на ДНК от препарата

3.4.3. Денатурация на ДНК пробата

3.4.4. *In situ* хибридизация

3.4.5. Промиване за отстраняване на неспецифично-свързаната ДНК проба

3.4.6. Контраоцветяване с DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

3.4.7. Микроскопски анализ

Флуоресцентната *in situ* хибридизация позволява директно визуализиране на дадена ДНК последователност в клетките с помощта на флуоресцентно багрило на базата на комплементарно свързване с ДНК сонда.

Апаратура: водна баня на 37°C; водна баня на 80°C; *in situ* PCR — MJ Research 100TM; Vortex; термостат на 37°C.

Реактиви: 70%, 85% и 96% етанол; протеазен разтвор; локус - специфичен потвърдителен ВАС - клон, белязан в SO (Spectrum Orange - с оранжева флуоресцентна боя) или белязан в SG (Spectrum Green - със зелена флуоресцентна боя); FISH проба Prader-Willi/Angelman Region Probe - LSI D15S10 SpectrumOrange/CEP 15 (D15Z1) SpectrumAqua/PML SpectrumGreen Probe (Vysis); FISH проба Williams Region Probe - LSI ELN SpectrumOrange/LSI D7S486, D7S522 SpectrumGreen (Vysis).

Техника: FISH техниката включва няколко основни етапа: 1) фиксация на пробата, съдържаща таргетните клетки; 2) хибридизацията се състои в смесване на едноверижни проби с денатурирана таргетна ДНК; 3) промиване за отстраняване на несвързаната проба; 4) анализ на флуоресцентен микроскоп.

3.4.1. Предобработка на препарата (само ако е необходима)

- Препаратът се поставя в кювета, съдържаща 50 ml dH₂O, 250 µl 2N HCl, 25 µl. 10% пепсин, на водна баня 37°C за вариращ период от време (3 - 20 min).
- Следва престой 2x5 min в кювета с 1xPBS.
- 10 min в кювета с 1% paraformaldehyde.
- 5 min в кювета с 1xPBS.

- Възходяща етанолна серия - 70%, 85% и 96% на стайна температура за 3 min всеки.

3.4.2. Денатурация на ДНК от препаратa

- Върху изсъхналия препарат се накапват 100-150 µl денатуриращ буфер (70% formamide deionized). Поставя се покривно стъкло.
- Препаратът се поставя на 73°C (PCR) за 3 min.
- Отстранява се покривното стъкло и следва възходяща ледена етанолна серия - 70%, 85% и 96% за 3 min във всяка кювета
- Препаратът се оставя да изсъхне на стайна температура.

3.4.3. Денатурация на ДНК пробата

Денатурацията на пробата протича на тъмно (ДНК пробата е директно белязана с флуорохром чрез вмъкване на модифицирани, белязани нуклеотиди.

- Приготвя се хибридизационна смес: 7 µl хибридизационен буфер; 1 µl проба; 2 µl dH₂O.
- Приготвената ДНК проба се вортексира и центрофугира с цел добро разбъркване и утаяване.
- Поставя се на PCR апарат при 73°C за 5 min.
- Веднага се накапва на изсъхналия препарат или се оставя на 45°C докато препаратът стане готов и се поставя се покривно стъкло.

3.4.4. In situ хибридизация

Препаратът се оставя за минимум 16 часа на 37°C във влажна хибридизационна камера.

3.4.5. Промиване за отстраняване на неспецифично-свързаната ДНК проба

Тази стъпка има за цел “отмиването” на ДНК последователностите, които не са свързани с таргетните последователности строго специфично и могат да се визуализират като фон, който да затрудни анализа или дори да попречи на правилната интерпретация на флуоресцентния образ. Това се постига с частична денатурация на препаратите при висока температура в солеви разтвор и под действие на детергент.

- Отстранява се покривното стъкло от препаратите и се поставя в кювета с предварително темперирани 0.4xSSC (Saline-Sodium Citrate) на 72°C водна баня за 2 min.
- Третира се за 5 min в измиващ буфер (4xSSC, 1% Tween 20).
- Препаратите се промиват в кювета с dH₂O за 1 min на стайна температура и се оставят да изсъхнат на тъмно на въздуха.

3.4.6. Контраоцветяване с DAPI

Ядрата на клетките се багрят с багрило DAPI, което се свързва с ДНК. Това багрило визуализира отделните клетки в синьо, което осигурява отчитането на флуоресцентните сигнали в отделните клетки.

- Върху изсъхналите препарати се накапват по 12-15 µl DAPI - 125 ng/ml DAPI/Antifade (Vysis, DAPI II, Cat # 32-804831) и се поставя покривно стъкло.
- До микроскопирането препаратите се съхраняват на - 20°C.

3.4.7. Микроскопски анализ

Гените и съответните хромозомни райони (локуси и центромери) се визуализират при използване на съответен филтър под флуоресцентен микроскоп. Броят на флуоресцентните сигнали в една клетка е равен на броя копия на съответната последователност в генома.

Апаратура: флуоресцентен микроскоп “Olympus BX60”, снабден с DAPI, FITC, TRITC, Cy3, Cy5 и AQUA флуоресцентни филтри; CCD imaging PCO камера VC45; компютърна система MetaSystems, програма ISIS, Германия.

Реактиви: имерсионно масло.

Техника: Анализът се осъществява въз основа на отчитане броя на сигналите в отделните клетки. Нормалните диплоидни клетки имат по два сигнала, съответстващи на двете хомоложни хромозоми и на двата алела на съответния ген. Анализът на броя на копията на всяка таргетна ДНК последователност (локус или центромерен район) се извършва изключително под микроскоп. Компютърната система се използва само за архивиране и документация на някои находки.

3.5. Сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове

В настоящата работа са използвани 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 и Cy5) тест- и контролна ДНК с фиксирани върху предметни стъкла ДНК секвенции (олигонуклеотиди или ВАС - клонове).

3.5.1. Олигонуклеотидни микрочипове

3.5.1.1. Апаратура

3.5.1.2. Реактиви и консумативи

3.5.1.3. Техника

3.5.1.3.1. Подготовка на пробата

3.5.1.3.2. Белязване

3.5.1.3.3. Пречистяване и комбиниране на белязаните проби

3.5.1.3.4. Хибридизация

3.5.1.3.5. Промиване

3.5.1.3.6. Скениране на микрочиповете

3.5.1.3.7. Софтуерен анализ на данните

3.5.1.1. Апаратура

- Лазерен скенер GenePix 4100A
- Хибридизационна печка SciGene 777 за олигонуклеотидни микрочипове
- Водна баня
- Вортекс Vortex-Genie 2
- Центрофуга със статичен ротор за епендорфки HERMLE Z-233-MK2
- Термоциклер с капак PTC 100
- Спектрофотометър NanoDrop® ND-2000c
- Шейкър, PSU-2T, Biosan

3.5.1.2. Реактиви и консумативи

- Мъжка и женска контролна ДНК

- Кит за флуоресцентно белязване на ДНК, съдържащ 5X буфер, 10X dNTP, Cy3 dUTP (Deoxyuridine Triphosphate), Cy5 dUTP (Deoxyuridine Triphosphate), ехо-Klenow ензим, BlueGnome (UK, Cambridge)
- Хибридизационен кит, съдържащ 2xHi-RPM буфер и 10X блокиращ агент
- Олиго буфери 1 и 2 за промиване на хибридизиралите чипове (Agilent)
- Cot-1-ДНК
- TE буфер
- Свободна от нуклеази вода
- 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
- Покривни стъкла с гумени уплътнители (gasket slides) за хибридизиране на олиго микрочипове
- Колонки за пречистване и концентрация на ДНК, с целулозна мембрана, с обем на стартовия материал 500 µl, диаметър на порите 30 kDa (Kilodalton), Amicon®Ultra, Millipore
- Стъклени кювети с размер 120/120/75 mm, в комплект с метални неръждаеми държатели за стъкла, Solmedia ST1100
- PCR - епруветки 0,2 ml

3.5.1.3. 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.

3.5.1.3.1. Подготовка на пробата

Работи се с разтворена в TE буфер високомолекулярна 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-

нискомолекулярна ДНК, което налага предварителна рестрикция на тестваната и контролната ДНК посредством RsaI и AluI. Тестваните ДНК на пациентите (Т1-Т8) и контролните ДНК-и (К1-К8) се разреждат със свободна от нуклеази дестилирана H₂O до 100 ng/μl работна концентрация.

3.5.1.3.2. Белязане

Белязането се осъществява на принципа на pick трансляцията. Използват се рандом праймери за белязане 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.

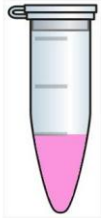
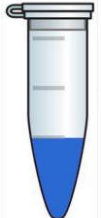
- Подготовка на рандом праймерите

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 белязане (labeling mix)

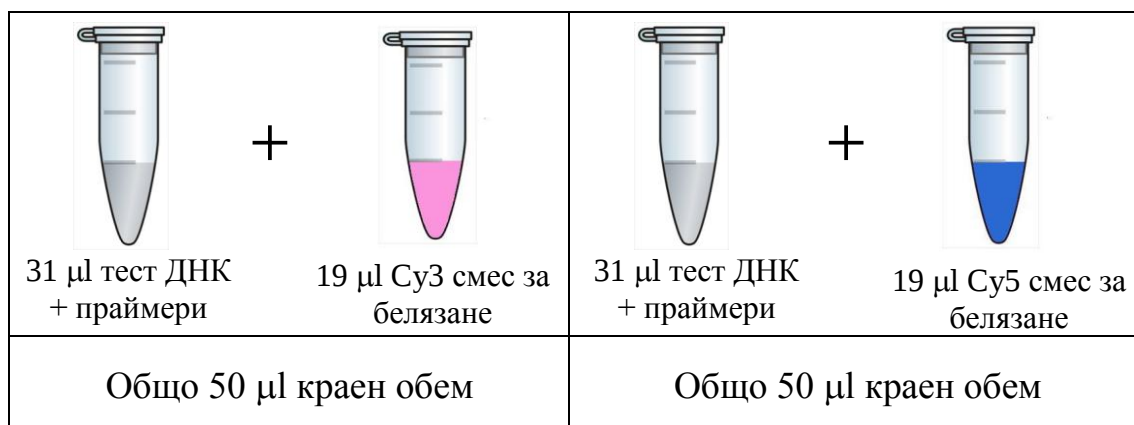
Работи се с количества, необходими за 16 реакции (8 тест ДНК, белязани със Cy3 и 8 контролни ДНК, белязани със Cy5) (Табл. 5).

Таблица 5. Необходими реактиви за белязане на 16 реакции за олиго-микрочипов анализ.

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

- **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 (Фиг. 13).



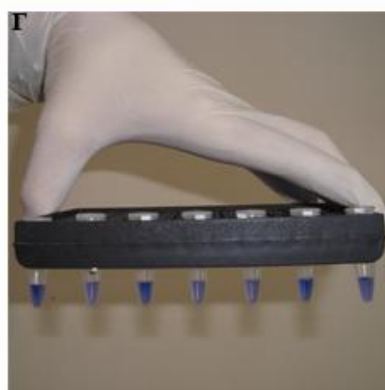
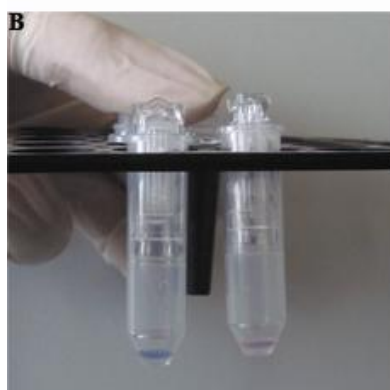
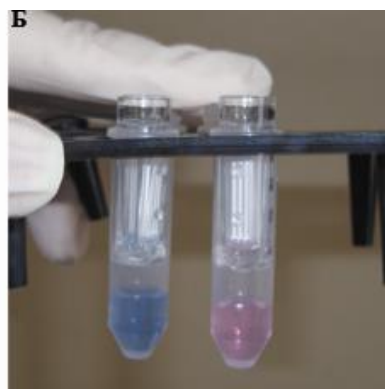
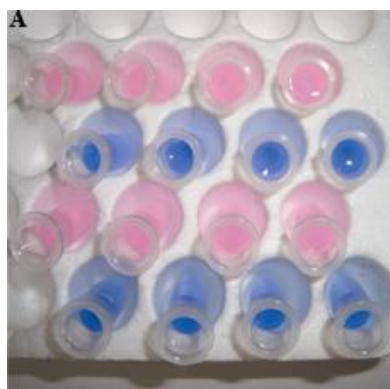
Фигура 13. Комбиниране на тестваната и контролната ДНК със сместа за белязване.

- **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.

3.5.1.3.3. 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 TE буфер (краен обем 480 μl) (Фиг. 14 A).



Фигура 14. Белязане, пречистване, комбинация, хибридизация, промиване и скениране на олиго-микрочиповете.

А) Тест- и контролни ДНК, смесени с ТЕ буфер;

Б) Белязаните ДНК се задържат във филтъра след първото пречистване през колонките;

В) Пречистени белязани тест и контролна ДНК;

Г) Комбинирани белязани тест и контролна ДНК.

Показание за добро белязане е отчетливият виолетов цвят;

Д) Микрочипове с покривни стъкла в хибридизационна касета;

Е) Хибридизационна печка с монтирани касети;

Ж) Проплакване в първи промивен разтвор с шейкър;

З) Лазерен скенер GenePix 4100A.

- **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 (Фиг. 14 Б). При второто промиване в колонките се наливат по 480 µl филтриран 1x TE 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 (Фиг. 14 В).

- **Определяне на обема на пречистените проби**

Количеството на пречистената ДНК се измерва с помощта на пипета, като варира около 21 µl. Добавя се 1xTE 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**

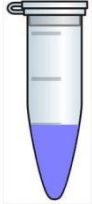
Всяка тест ДНК (39 µl), белязана със Су3 се комбинира със Су5, белязана контролна ДНК (39 µl), като се съблюдава съвпадение по пола на пациента и контролата (общ обем 78 µl) (Фиг. 14 Г).

3.5.1.3.4. Хибридизация

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

- **Приготвяне на хибридизационна смес**

Предварително се разтваря с дестилирана вода 10x блокиращият агент, който е в лиофилизирано състояние и се инкубира 1 час на стайна температура. Към всяка проба (78 µl) се добавят:

 78 µl проба	130 µl 2x хибридизационен буфер (Hi-RPM) 26 µl 10x блокиращ агент (вортексира се преди употреба) 25 µl човешка COT ДНК Общ обем ~260 µl.
--	--

- **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 (Фиг. 14 Д). 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 (Фиг. 14 Е).

3.5.1.3.5. Промиване

Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК. Предварително се приготвят се следните разтвори (Табл. 6):

Таблица 6. 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 (Фиг. 14 Ж). 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.

3.5.1.3.6. Скениране на микрочиповете

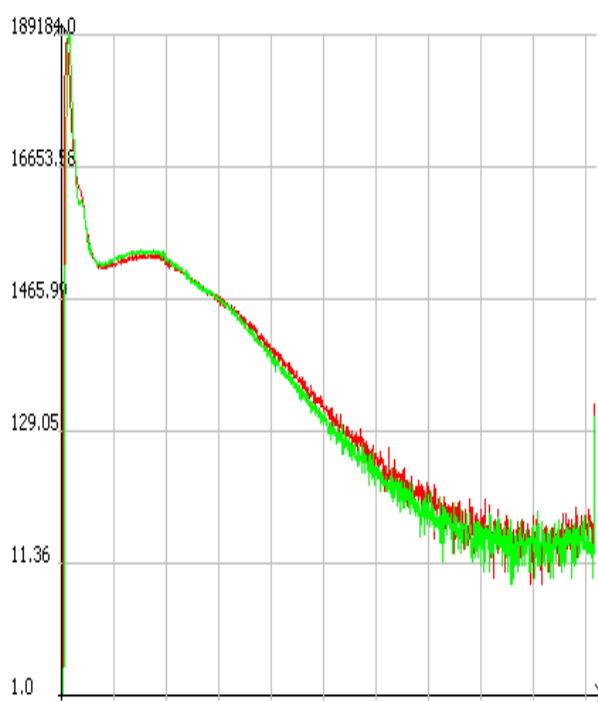
Препоръчително е микрочиповете да се скенират същия ден, защото багрилата, особено Cy5, много бързо се разрушават под действието на атмосферния озон и светлината. Cytochip Oligo микрочиповете бяха скенирани на двуканален лазерен скенер GenePix 4100A, с 532 nm дължина на вълната за зеления лазер и 635 nm за червения лазер (Фиг. 14 З).

- **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 μ m. 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. 15).



Фигура 15. Хистограма на зелената и червената флуоресценция.

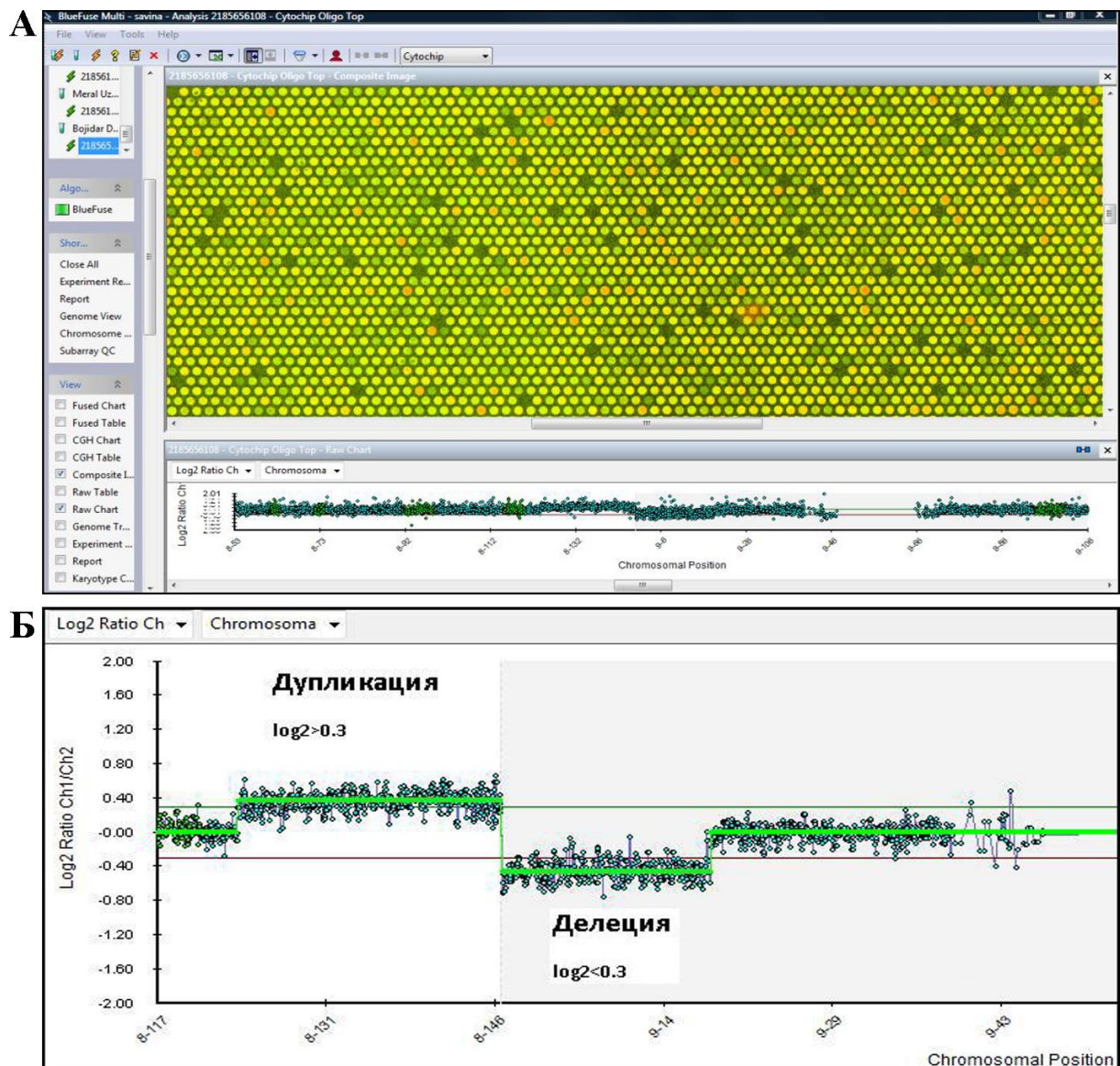
В този пример ординатата показва броя на пикселите, а абсцисата интензитетът на сигналите на пикселите. Зелената линия отговаря на зеления лазер (532 nm) и съответно червената линия на червения лазер (635 nm). Високият пик до ординатата показва сигналите от фоновия шум (голям брой пиксели със слаб сигнал). 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 настройват, 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 хибридизационното поле. Прескеният 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”.

3.5.1.3.7. Софтуерен анализ на данните

Всички данни са обработени с програма BlueFuse Multi version 2.2., (BlueGnome, Cambridge) (Фиг. 16 A). 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.



Фигура 16. Софтуерен анализ на скенирания чип.

А) Образ на белязаните ДНК-фрагменти върху олиго-чип; Б) ДНК профил с едновременно наличие на дупликация и делеция, в тестваната ДНК.

Критерии за отчитане на резултатите от експеримента.

При обработка на данните се генерира графика за всяка тествана ДНК, като абцисата показва хромозната позиция на хибридизиралите 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) (Фиг. 17 Б).

- **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 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.

3.5.2. ВАС - микрочипове

3.5.1.4. Апаратура

3.5.1.5. Реактиви и консумативи

3.5.1.6. Техника

3.5.1.6.1. Подготовка на пробата

3.5.1.6.2. Белязване

3.5.1.6.3. Пречистяване и комбиниране на белязаните проби

3.5.1.6.4. Хибридизация

3.5.1.6.5. Промиване

3.5.1.6.6. Изсушаване на микрочиповете

3.5.1.6.7. Скениране на микрочиповете

3.5.1.6.8. Софтуерен анализ на данните

Тъй като двата метода имат значителни прилики в техническо отношение, по-подробно ще бъдат описани само разликите между тях.

3.5.2.1. Апаратура

- Лазерен скенер GenePix 4100A
- Инкубатор
- Водна баня
- Вортекс Vortex-Genie 2
- Центрофуга със статичен ротор за епендорфки HERMLE Z-233-MK2
- Термоциклер с капак PTC 100
- Спектрофотометър NanoDrop® ND-2000c
- Шейкър, PSU-2T, Biosan

3.5.2.2. Реактиви и консумативи

- Мъжка и женска контролна ДНК
- Cot-1-ДНК
- 3М натриев ацетат (pH 5.2)
- Абсолютен алкохол
- Епендорф епруветки, 1.5 ml с капакачка

- Кит за флуоресцентно белязване на ДНК и хибридизация, съдържащ буфер за белязване, свободна от нуклеази вода, рандом праймери, dCTP (2'-deoxycytidine 5'-triphosphate), Cy3 dCTP и Cy5 dCTP, ЕДТА, 10% декстранов буфер (BlueGnome, UK, Cambridge)
- CytoChip ВАС - 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
- Покривни стъкла с хибридиране размер 22/22 mm
- Колонки за пречистване със смола, AutoSeq G50 column
- Стъклени кювети с размер 120/120/75 mm, в комплект с метални неръждаеми държатели за стъкла, Solmedia ST1100
- Хибридизационна камера

3.5.2.3. 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.

3.5.2.3.1. 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. 77, раздел IV. 3.5.1.3.1.).

3.5.2.3.2. Белязване

Белязането както при олигочиповете се осъществява на принципа на nick трансляцията с помощта на рандом праймери.

- Приготвяне на смес за белязване (labeling mix)

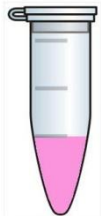
Работи се с количества, необходими за 16 реакции (8 тест ДНК, белязани със Cy3 и 8 контролни ДНК, белязани със Cy5) (Табл. 7).

Таблица 7. Необходими реактиви за белязване на 16 реакции за ВАС-микрочипов анализ.

Компоненти	Су3 смес за белязване на 8 реакции	Су5 смес за белязване на 8 реакции
Реакционен буфер	84 μ l	84 μ l
Свободна от нуклеази вода	159.6 μ l	159.6 μ l
рандом праймери	84 μ l	84 μ l
dCTP - смес за белязване	42.5 μ l	42,5 μ l
Су3 dCTP	8,4 μ l	
Су5 dCTP		8,4 μ l
Общо	378 μ l	378 μ l
За 1 реакция	45 μ l	45 μ l

- **Смесване на ДНК-те със сместа за белязване**

По 45 μ l от Су3 сместа за белязване се разпределят в 8 епруветки, надписани от Т1 до Т8 (тест ДНК) и съответно по 45 μ l от Су5 микса в 8 епруветки, надписани от К1 до К8 (контролна ДНК). Във всяка епруветка се добавят по 4 μ l от работния разтвор ДНК (100 ng/ μ l).

	45 μ l Су3 смес за белязване 4 μ l ДНК (100 ng/ μ l) Общо 49 μ l		45 μ l Су5 смес за белязване 4 μ l ДНК (100 ng/ μ l) Общо 49 μ l
---	--	--	--

- **Подготовка на компонентите за белязване**

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 μ l Klenow ензим (общ обем 50 μ l), разбърква се внимателно и се центрофугира на пулс.

- **Белязване в термоциклер**

Реакционните смеси с контролните и тест ДНК-те се поставят в термоциклер на 37°C за 16-20 часа.

- **Стопиране на реакцията**

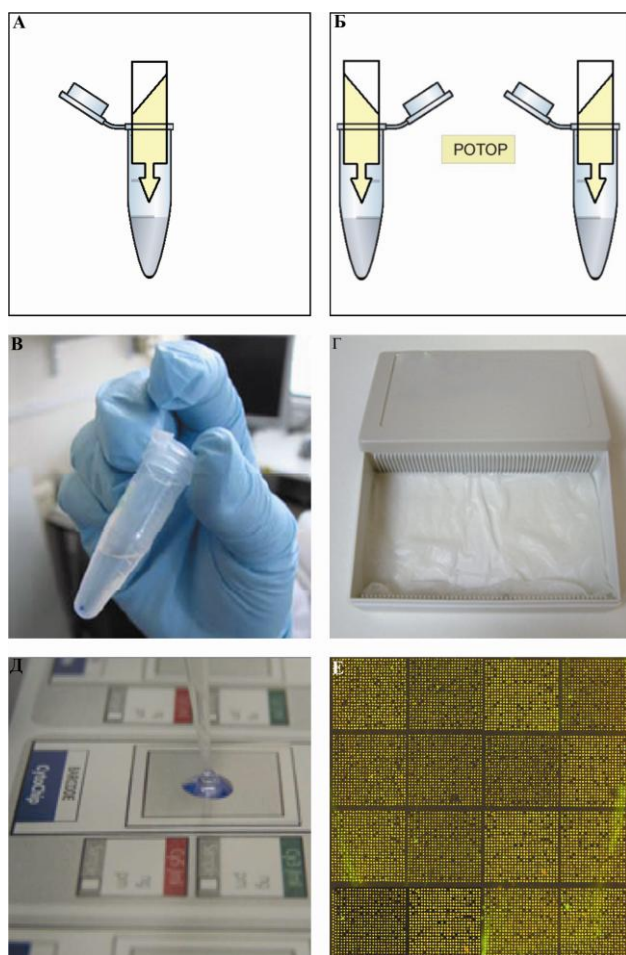
На края на белязането във всяка епруветка се добавят по 5 μ l ЕДТА, като се вортексират добре за блокиране на реакцията на белязване (краен обем 55 μ l).

3.5.2.3.3. 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 (Фиг. 17 А).



Фигура 17. Пречистване, преципитация, хибридизация и скениране на ВАС микрочиповете.

А) Смолата пада на дъното на колонките, като течността се стича в събирателните епруветки, отделената течност се изхвърля, а колонките се поставят в предварително надписани епендорф епруветки от T1 до T2 и от K1 до K2; Б) Ориентация на епендорфките в центрофугата - капачките се насочват към ротора; В) Смесените ДНК след преципитация - наблюдава се ясен виолетов цвят; Г) Хибридизационна камера; Д) Накапване на хибридизационната смес върху покривното стъкло; Е) Изглед на скениран микрочип - едно от двете полета - наблюдава се хибридизация върху чипа.

- **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

центрифуга на 2000 G за 60 sec, като епендорфките се поставят в същата ориентация като колонките при центрофугирането (Фиг. 17 Б).

- **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: 180 - 325 ng/µl
- Инкорпорация на багрилото: 6 - 15 pmol/µl
- Чистота на пробата при 260/280 nm: 1,8 - 2

- **Комбинация на пробите с тествана и контролна ДНК**

Всяка тест ДНК, белязана със Су3 се комбинира със Су5, 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 µl Cot-1-ДНК и 11 µl 3М натриев ацетат и се вортексират. Прибавят се 312 µl абсолютен алкохол, завъртат се двукратно и се оставят на тъмно на -20°C за най-малко 2 часа.

3.5.2.3.4. 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 (Фиг. 17 В). Отстранява се супернатантът като се излива върху салфетка и се добавят 312 µl 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 µl 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 хибридационната камера**

В пластмасова непрозрачна кутия се поставя лигнин и се напоява с 10 ml 2xSSC/50% формаид (Фиг. 17 Г).

- **Накапване на хибридационната смес върху микрочиповете**

Хибридационната смес се охлажда на стайна температура и в центъра на покривното стъкло се накапват 19 µl. Ръководейки се по матрица, микрочипът се залепя върху покривното стъкло като се внимава да не се образуват мехури (Фиг. 17 Д). Микрочиповете се поставят в хибридационната камера, която се увива плътно с парафилм и се инкубира на тъмно на 47°C за 16 - 21 часа.

3.5.2.3.5. Промиване

Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК. Предварително се приготвят следните разтвори (Табл. 8).

След приключване на хибридацията 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 8. Необходими разтвори за промиването на хибридизиралите ВАС-микрочипове.

№	Буфер	Обем	Т°C	Шейкър	Време
1.	2xSSC/0,05% Tween 20	400 ml	Стайна температура	Да	10 min
2.	2xSSC/0,05% Tween 20	400 ml	Стайна температура	Да	10 min
3.	2xSSC/0,05% Tween 20	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.

3.5.2.3.6. 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.

3.5.2.3.7. Скениране на микрочиповете

При скенирането на ВАС - микрочиповете се повтарят същите стъпки при олигочиповете, вж. стр. 83, раздел IV. 3.5.1.3.6. (Фиг. 17 E).

3.5.2.3.8. Софтуерен анализ на данните

При софтуерния анализ се спазва същия подход като при олигонуклеотидните чипове, вж. стр. 84, раздел IV. 3.5.1.3.7.

V. 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

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 (<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. 18).



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 [Mitelman, 2009]. Хромозомният анализ е извършен в Катедрата по Медицинска генетика, МУ-София.

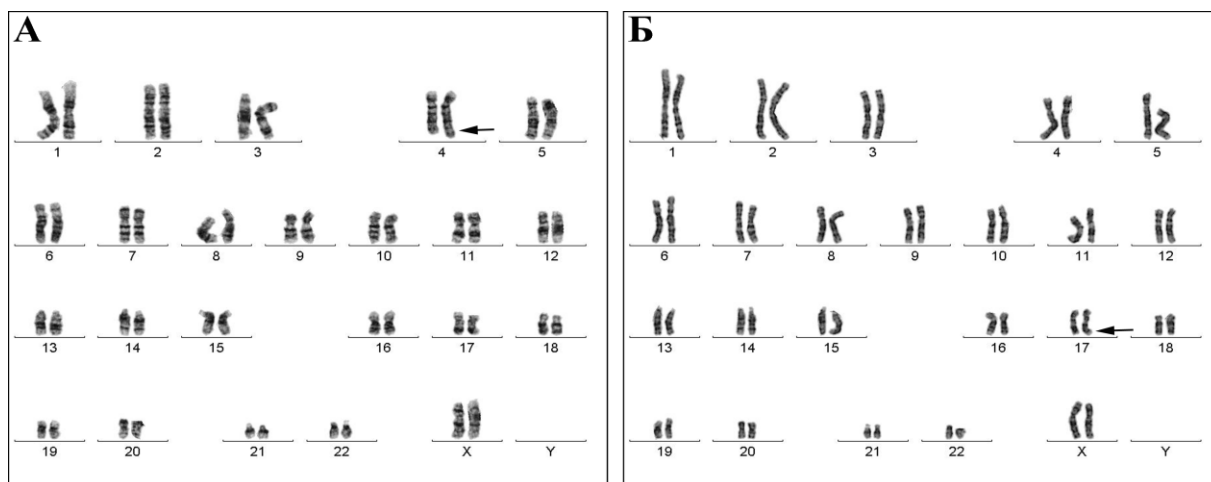
С цитогенетичния анализ в изследваната група е установена 14,5% честота на патологични хромозомни аберации.

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) (Табл. 9). Тези 11 пациента са изключени от микрочиповия анализ, тъй като при тях диагнозата беше дефинитивно изяснена. При шестима от селектираните за микрочипов анализ пациенти (Пациенти 1, 2, 4, 5, 12 и 42) са установени два хромозомни полиморфизма, една балансирана реципрочна транслокация и три кариотипа с неясна цитогенетична находка (Табл. 9). При Пациенти 5 (Фиг. 19 Д) и 12 (Фиг. 19 Г) 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) (Фиг. 19 Е). При трима от пациентите е установен допълнителен хромозомен материал с неясен произход: Пациент 1 - 46,XX,add(4)(q35) (Фиг 19 А); Пациент 2 - 46, XX, add(17)(q25) (Фиг. 19 Б); Пациент 4 - 46,XY,add(18)(p11.2) (Фиг 19 В).

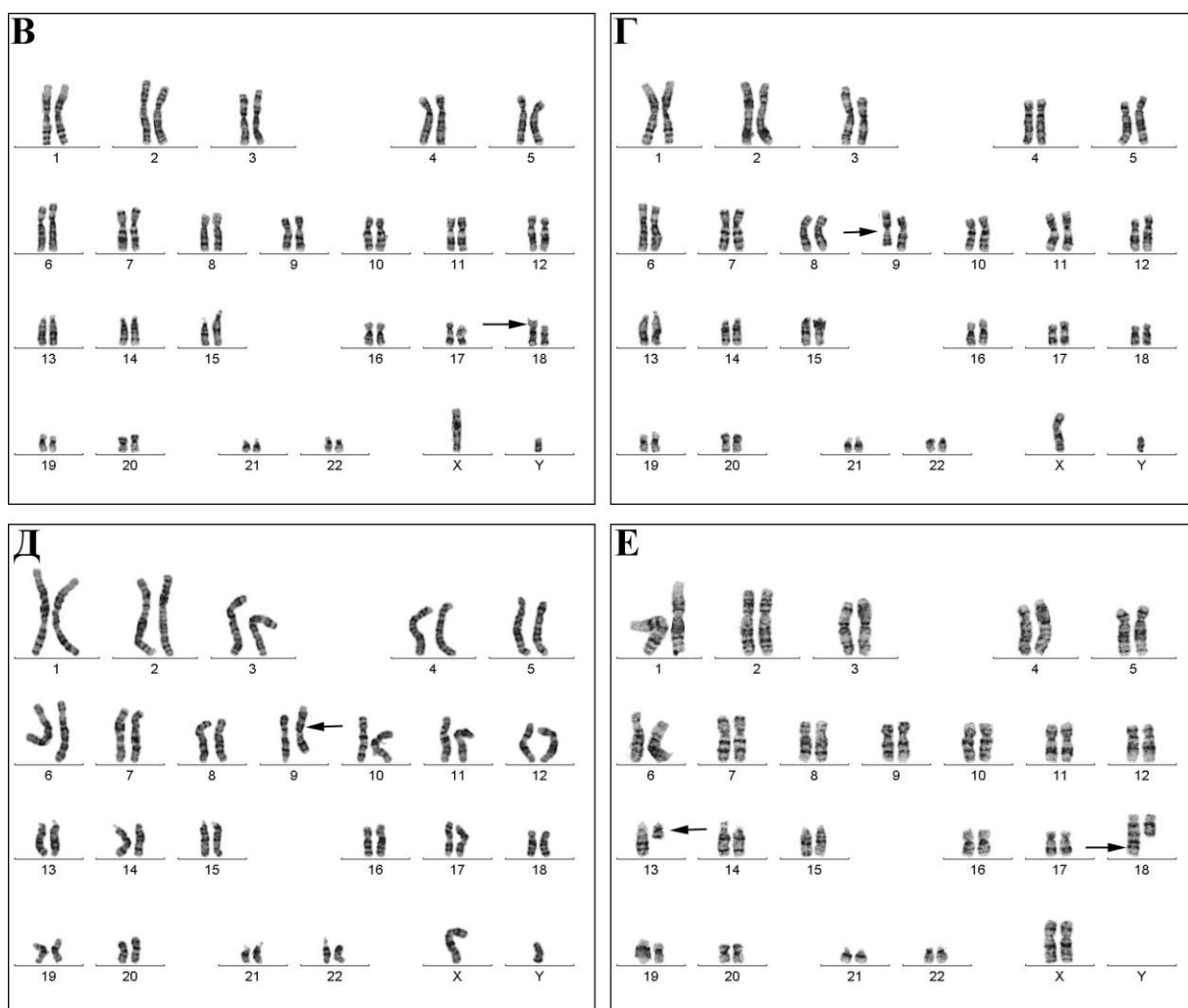
За да установяване произхода (де ново или унаследени) на хромозомните преустройства цитогенетично са изследвани родителите на Пациенти 1, 2 и 5. За съжаление част от пациентите са от държавни институции за изоставени деца и нямахме достъп до биологичен материал от родителите им. При родителите на Пациенти 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.

Таблица 9. Пациенти с установени цитогенетични находки.

Пациенти	Кариотип
Пациент 1	46,XX,add(4)(q35)
Пациент 2	46, XX, add(17)(q25)
Пациент 4	46,XY,add(18)(p11.2)
Пациент 5	46,XY,inv(9)(p11q13)
Пациент 12	46,XY,inv(9)(p11q13)
Пациент 42	46,XX,t(13;18)(q13;q23)
Пациент 53	47,XX,+21
Пациент 54	47,XX,+21
Пациент 55	47,XX,+21
Пациент 56	47,XY,+21
Пациент 57	47,XY,+21
Пациент 58	47,XY,+21
Пациент 59	mos 45,X[50]/46,XY[50]
Пациент 60	mos 45,X[15]/46,Xdel(X)(q22)[15]
Пациент 61	mos 45,X[29]/47,XY,+mar[11]/46,XY[10]
Пациент 62	mos 45,X[36]/46,XX[14]
Пациент 63	mos 45,X[86]/46,Xr(X)(p22q26)[13]/47,Xr(X)(p22q26)r(X)(p22q26)[1]



продължена



Фигура 19. Кариограми на пациентите с установени отклонения в кариотипа, селектирани за микрочипов анализ.

Със стрелки са обозначени хромозомните находки:

А) Пациент 1 - цитогенетичният анализ показва патологичен женски кариотип с допълнителен материал в края на дългото рамо на 4 хромозома с неясен произход - 46,XX,add(4)(q35);

Б) При Пациент 2 хромозомният анализ установи патологичен женски кариотип с допълнителен материал в края на дългото рамо на 17 хромозома с неясен произход - 46,XX,add(17)(q25);

В) Пациент 4 беше с патологичен мъжки кариотип - 46,XY,add(18)(p11.23);

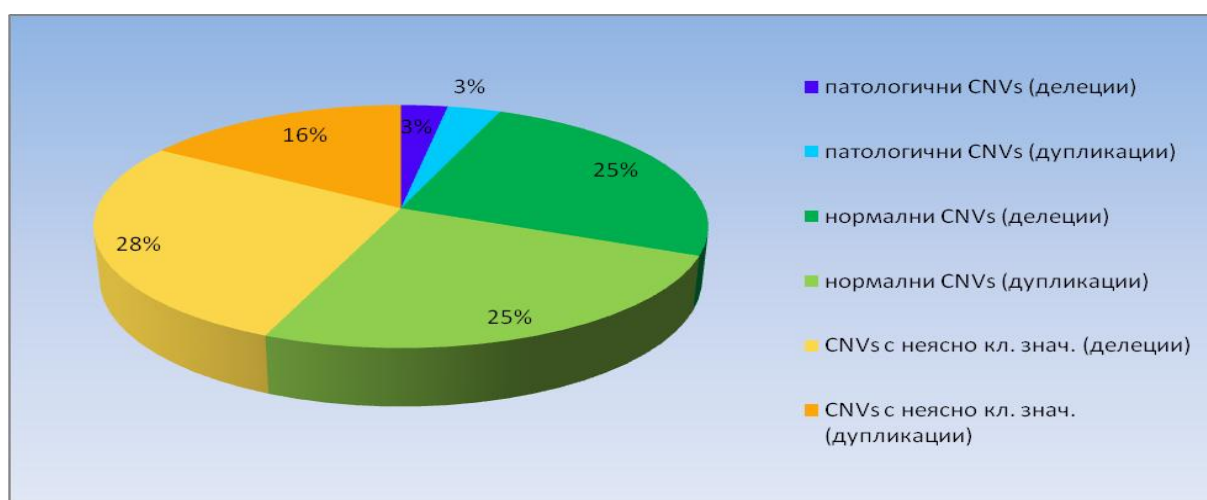
Г) При Пациент 12 хромозомното изследване показва мъжки кариотип с видимо балансирана перичентрична инверсия на хромозома 9 - 46,XY,inv(9)(p11q13);

Д) Пациент 5 също беше с полиморфна инверсия на 9-та хромозома - 46,XY,inv(9)(p11q13);

Е) При кариотипирането на Пациент 42 се установи видимо балансирана транслокация - 46,XX,t(13;18)(q13;q23).

4. Микрочипова CGH

От изследваните с микрочипов олиго-CGH 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. 20).



Фигура 20. 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. 10). 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 10. 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

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. 21 А и Б, Табл. 10):
 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. 21 Н, Табл. 10):
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. 21 В и Г, Табл. 10):
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 (Табл. 10, Фиг. 21 Д и Е):
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. 21 Ж и З, Табл. 10):

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 и терминална дупликация в дългото рамо на 1 хромозома - dup(1)(q42.3q44) с размер от 10,739,896 Kb (Фиг. 21 И и К, Табл. 10):

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 - del(17)(p11.2p11.2) с размер от 3,921,815 bp (Фиг. 21 О, Табл. 10):

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

Казус 8

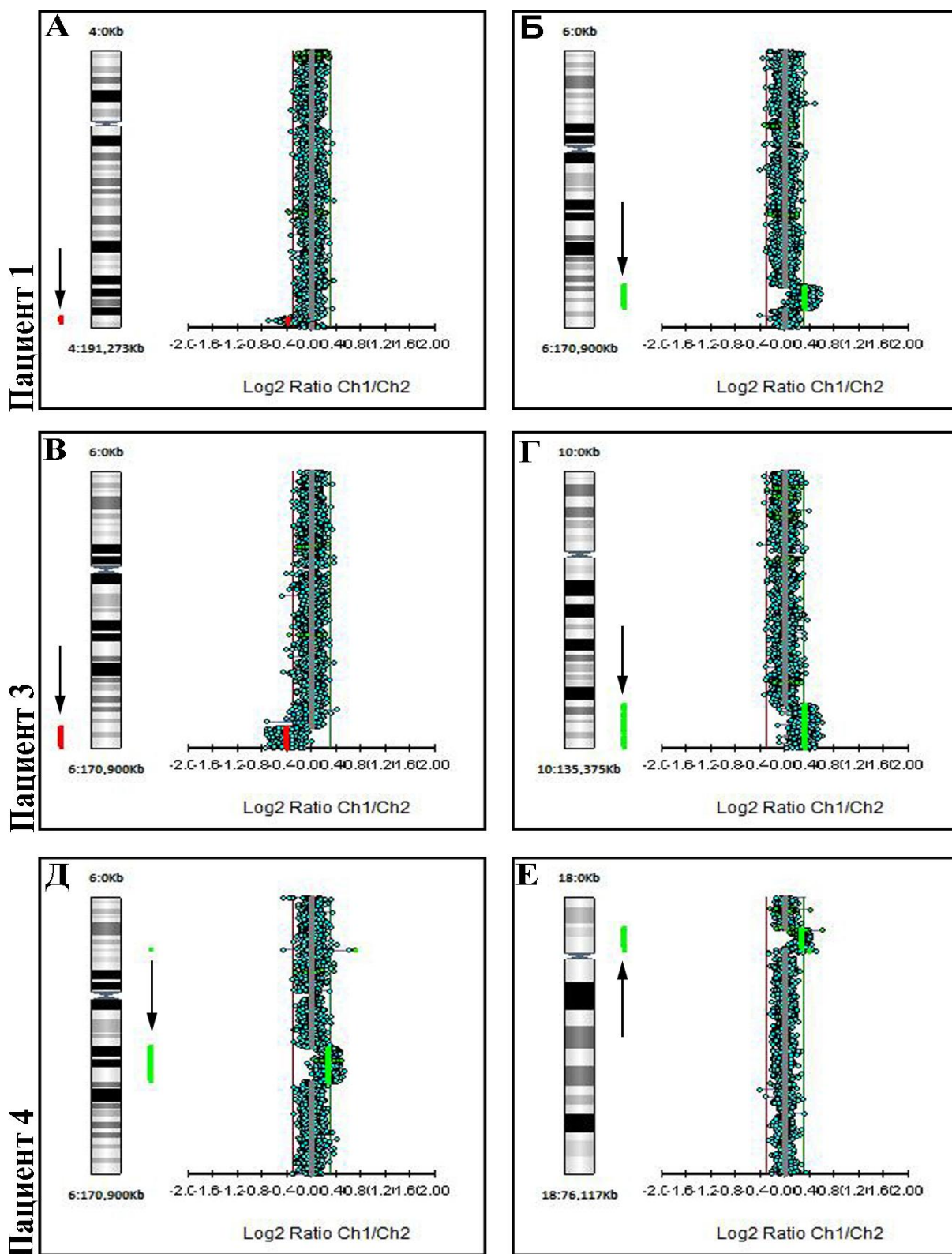
При Пациент 8 (момче с нормален мъжки кариотип и множествени малформации) молекулното кариотипиране установява една патологична аберация - интерстициална делеция в дългото рамо на 4 хромозома - del(4)(q21.1q21.22) с размер 1,700,916 bp (Фиг. 21 П, Табл. 10):

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

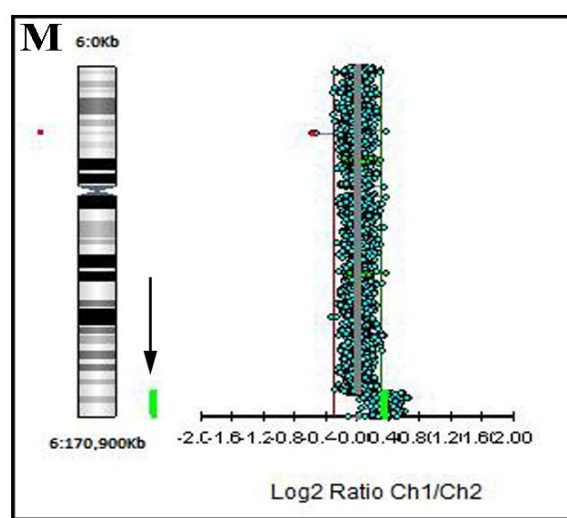
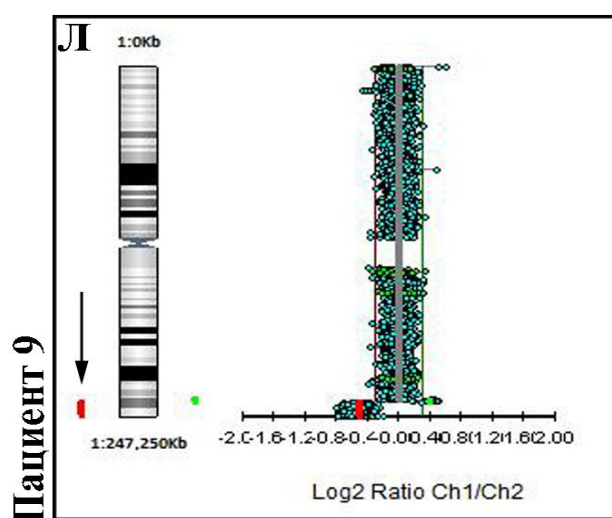
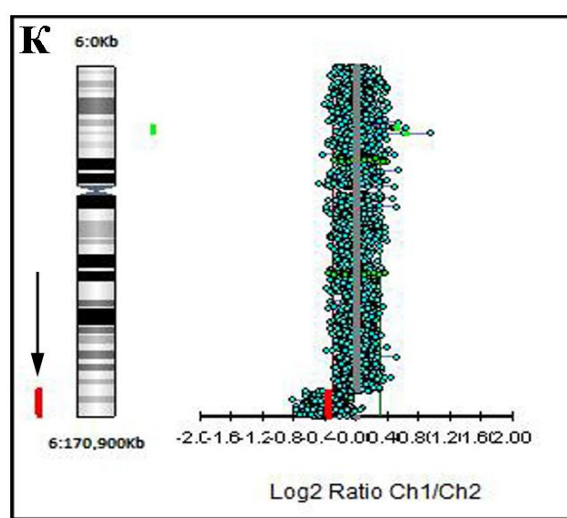
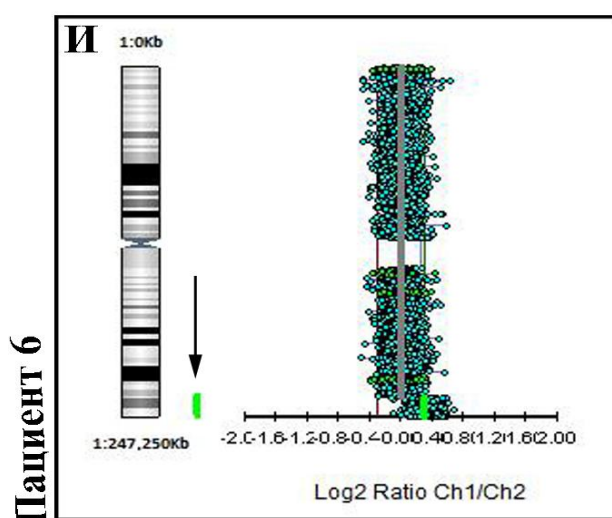
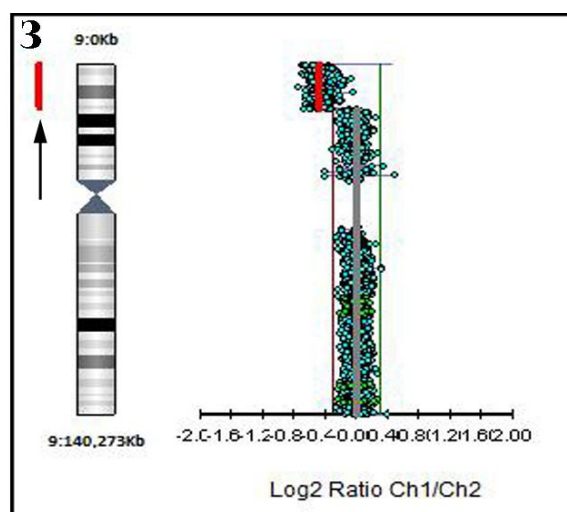
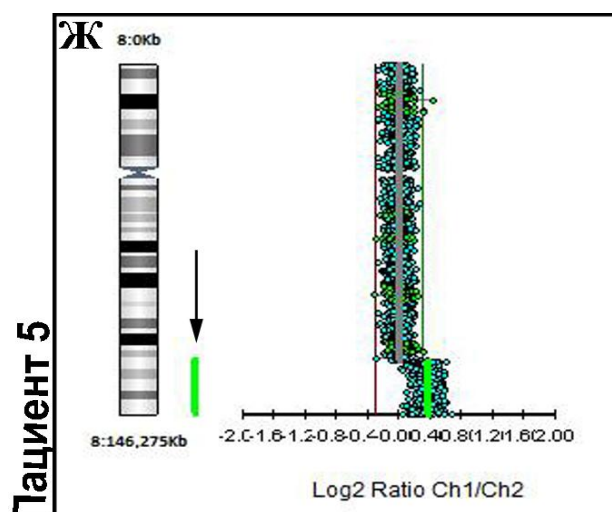
Казус 9

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 - del(1)(q43q44), обхващащ 110,548,700 Kb и терминална дупликация в дългото рамо на 6 хромозома - dup(6)(q25.3q27) с размер от 11,878,054 Kb (Фиг. 21 Л и М, Табл. 10):

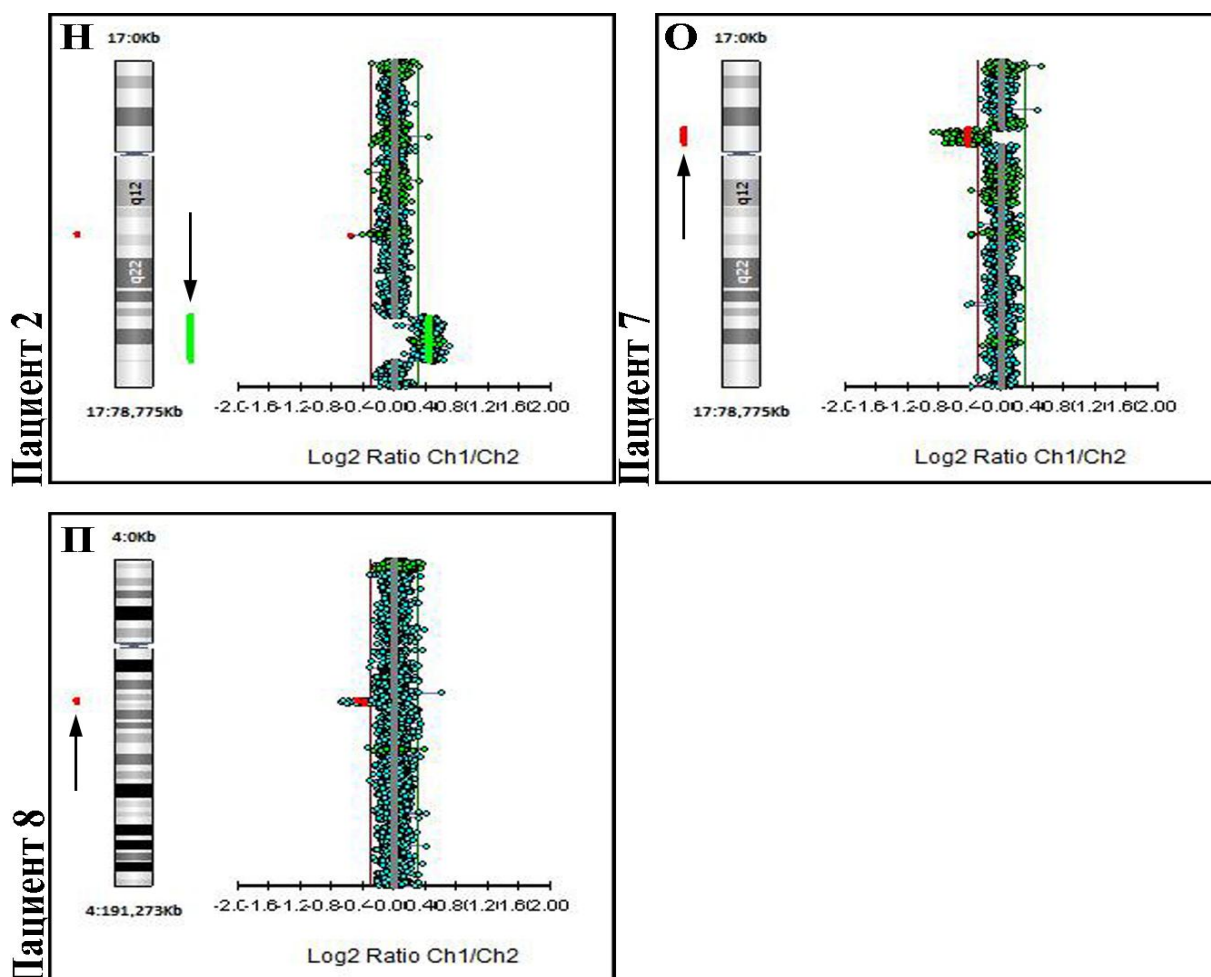
arr 1q43q44(236,642,045-247,190,744)x1, 6q25.3q27(158,902,925-170,780,979)x3



продължена



продължена



Фигура 21. 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 3: В) Геномен профил на Пациент 3 за хромозома 6, разкриващ $\text{del}(6)(\text{q}25.3\text{q}27)$ с размер 12,978,687 bp; Г) Геномен профил на Пациент 3 за хромозома 10, разкриващ $\text{dup}(10)(\text{q}25.2\text{q}26.3)$ с размер 21,360,598 bp.

Пациент 4: Д) Геномен профил на Пациент 4 за хромозома 6, разкриващ $\text{dup}(6)(\text{q}16.1\text{q}21)$ с размер 21,333,134 bp; Е) Геномен профил на Пациент 4 за хромозома 18, разкриващ $\text{dup}(18)(\text{p}11.22\text{p}11.22)$ с размер 5,479,842 bp.

Пациент 5: Ж) Геномен профил на Пациент 5 за хромозома 8, разкриващ $\text{dup}(8)(\text{q}24.13\text{q}24.3)$ с размер 22,764,514 bp; З) Геномен профил на Пациент 5 за хромозома 9, разкриващ $\text{del}(9)(\text{p}24.3\text{p}22.2)$ с размер 18,023,617 bp.

Пациент 6: И) Геномен профил на Пациент 6 за хромозома 1, показващ дупликация в дългото рамо на 1-ва хромозома, визуализирана със зелен стълб; К) геномен профил на Пациент 6 за хромозома 6, разкриващ делецията в дългото й рамо (червен стълб).

Пациент 9: Л) Геномен профил на Пациент 9 за хромозома 1, показващ делеция в дългото рамо на 1-ва хромозома, визуализирана с червен стълб; М) геномен профил на Пациент 9 за хромозома 6, разкриващ дупликация в дългото й рамо (зелен стълб).

Пациент 2: Н) Геномен профил на Пациент 2 за хромозома 17, разкриващ dup(17)(q24.2q25.2) с размер 10,773,752 bp.

Пациент 7: О) Геномен профил на Пациент 7 за хромозома 17.

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) (Приложение 4, стр. 189). 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: атг 19q13.31(47952719-48205993)x3. 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: атг 9p11.1q12(47002212-66032256)x1.

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. 11).

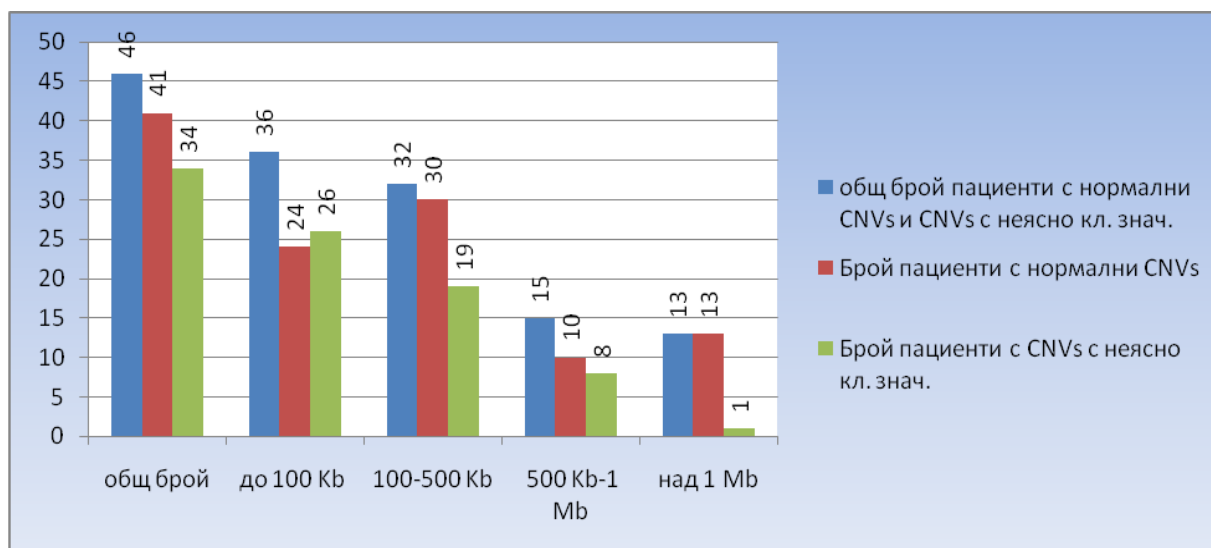
С нормална природа са 124. Те са разпределени по размер както следва: 46 (37%) с размер под 100 Kb; 52 (42%) с размер 100 - 500 Kb; 11 (9%) с размер 500 Kb - 1 Mb; 15 (12%) с размер над 1 Mb. От тях 62 са дупликации и 62 делеции (Табл. 11).

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. 11).

Таблица 11. 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 кл. знач.	232	103	92	21	16
нормални CNVs	124	46	52	11	15
CNVs с неясно кл. знач.	108	57	40	10	1

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 22 е показано разпределението по размери на нормалните CNVs и CNVs с неясно клинично значение и броят пациенти, при които са установени.



Фигура 22. Брой пациенти с нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение.

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 ВАС - клонове, 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.

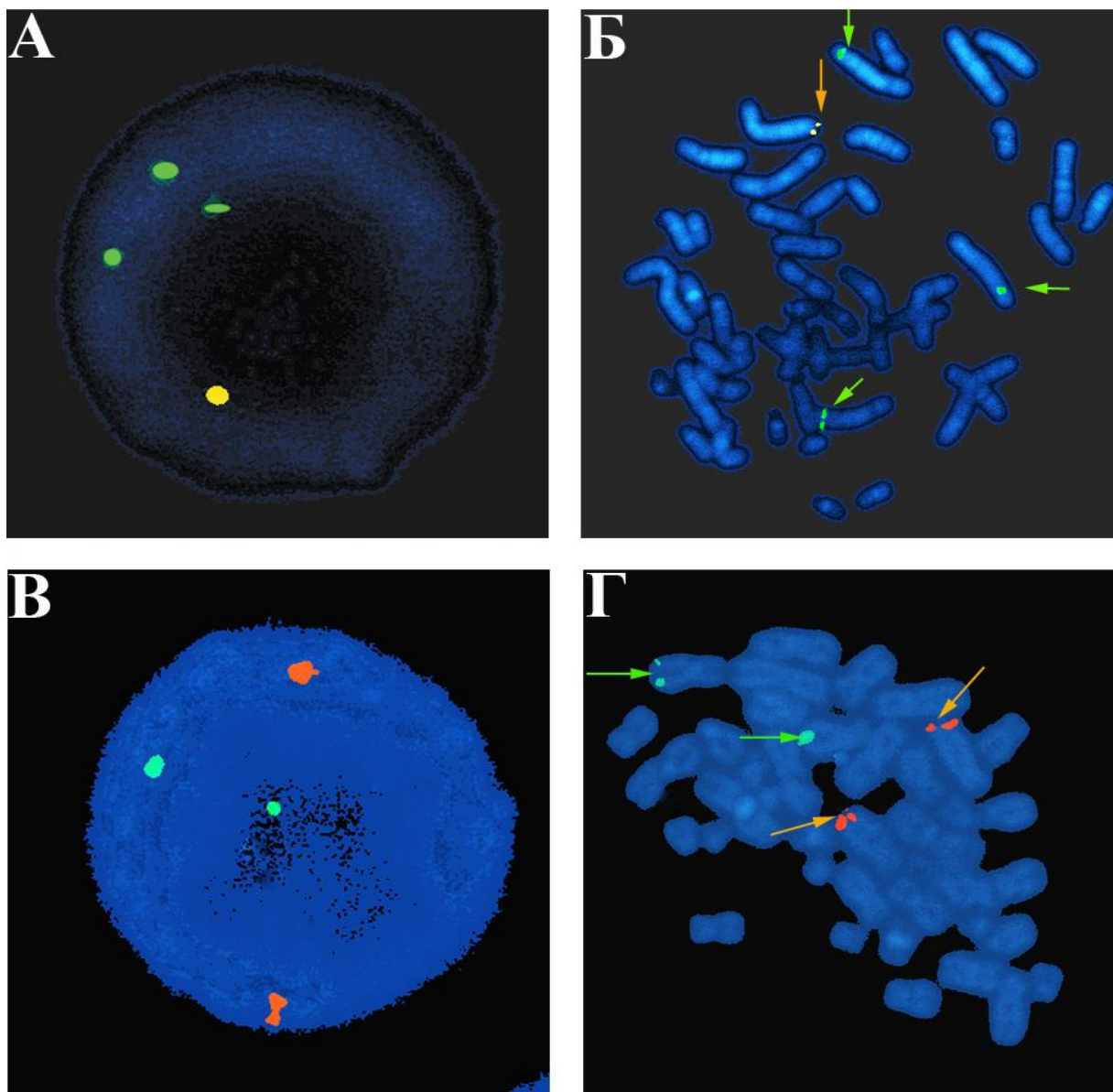
FISH анализът е извършен в Катедрата по Медицинска генетика, Медицински Университет – София.

Казус 1 - FISH валидиране на патологичните вариации

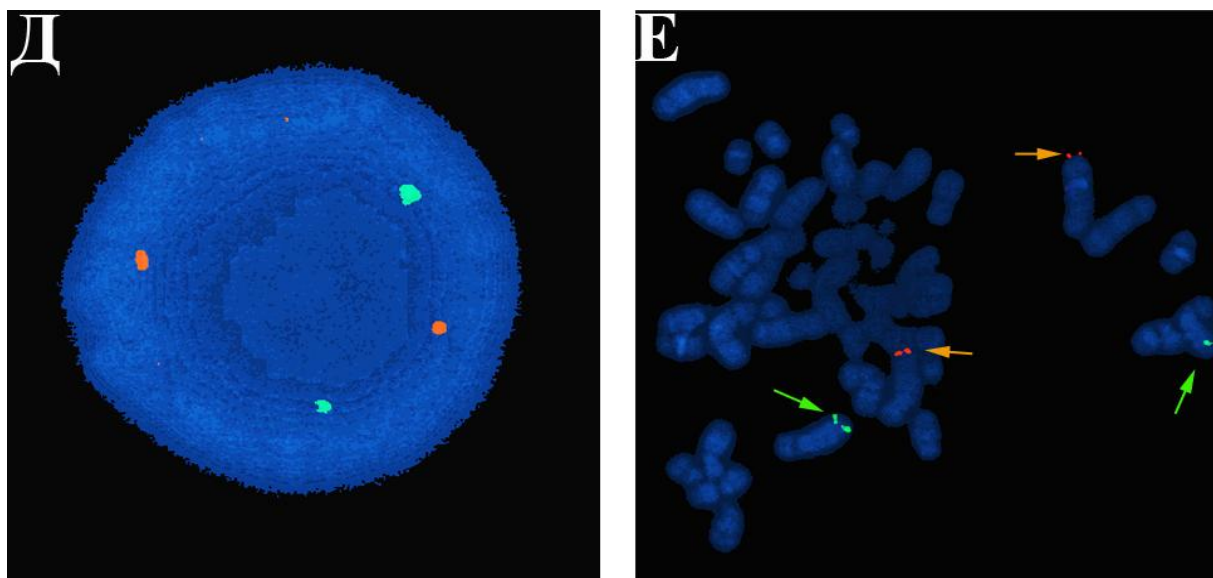
За FISH анализа на Пациент 1 от базата данни на BlueFuse (BlueGnome, UK, Cambridge) са подбрани специфични потвърдителни ВАС - клонове за находките в 4 и 6 хромозома, белязани съответно в SO за 4q35.1 района - RP11-45I20 и SG за 6q25.2 района. Във всички анализирани метафазни пластинки и интерфазни ядра 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. 23 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. 23 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 - 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 й.



продължена

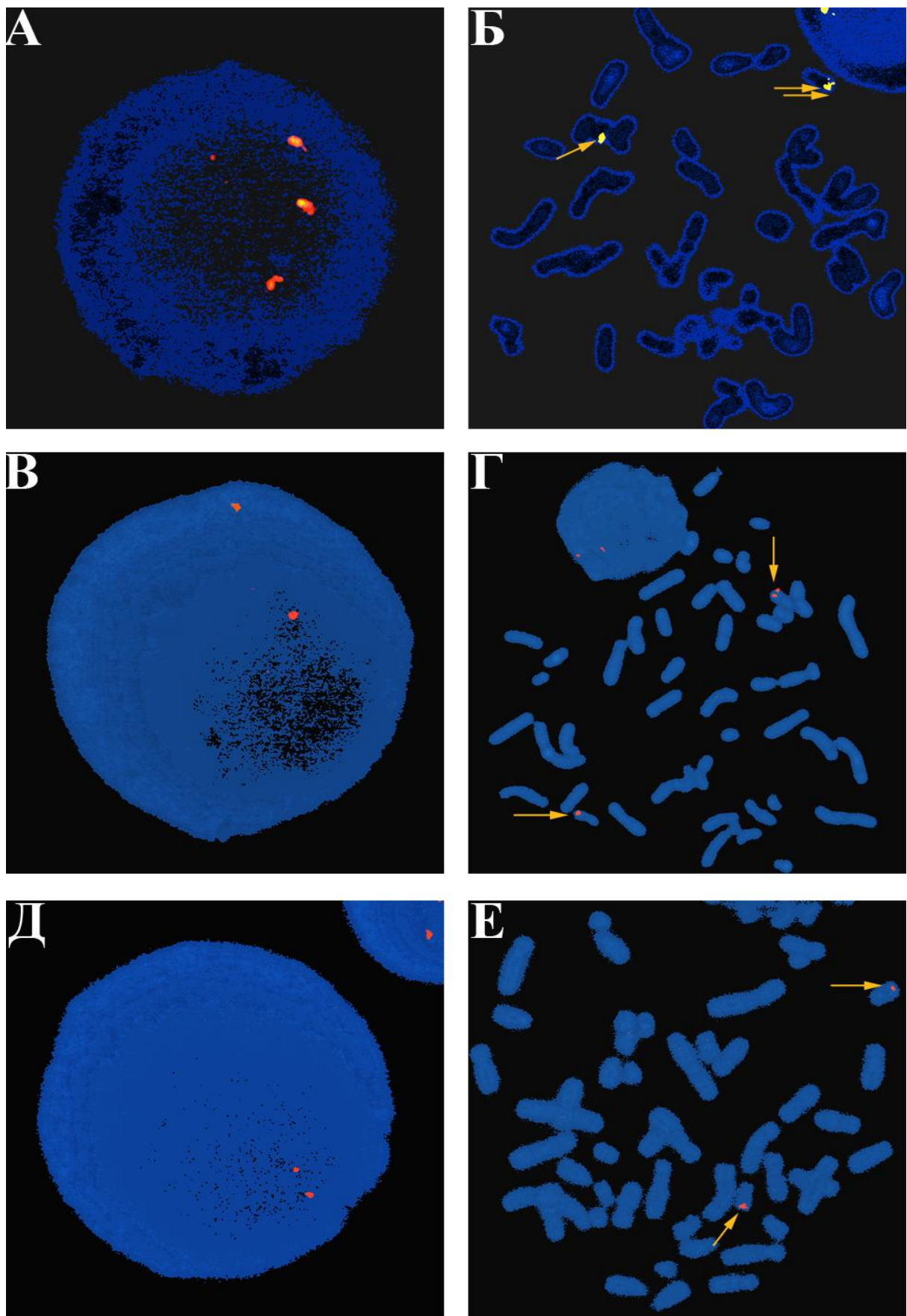


Фигура 23. FISH анализ на Пациент 1 и родителите.

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 ВАС - 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 - *puc ish 17q24.2 (RP11-94E7x3)* (Фиг 24 А). При FISH анализа на метафазни пластинки оранжевият сигнал от дуплицирания район на 17 хромозома е визуализиран с двойно по-големи размери (Фиг. 24 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. 24 В, Г, Д и Е): *puc ish 17q24.2 (RP11-94E7x2)* - при майката на пациентката; *puc ish 17q24.2 (RP11-94E7x2)* - при бащата на пациентката.



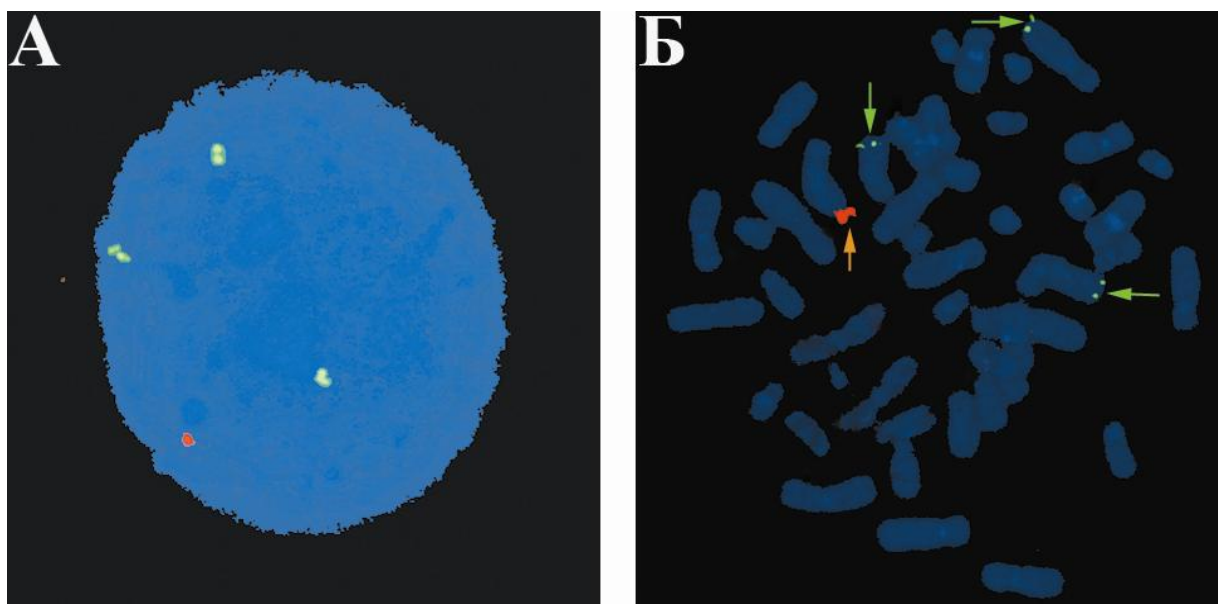
Фигура 24. FISH анализ на Пациент 2 и родителите.

С оранжеви стрелки са показани 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 - puc ish 6q26 (RP11-157L10x1), което показва хетерозиготна делеция в този локус и по 3 зелени сигнала от 10q25.2 - puc ish 10q25.2 (RP11-62L18x3), доказващо дупликация на района (Фиг. 25 А и Б).



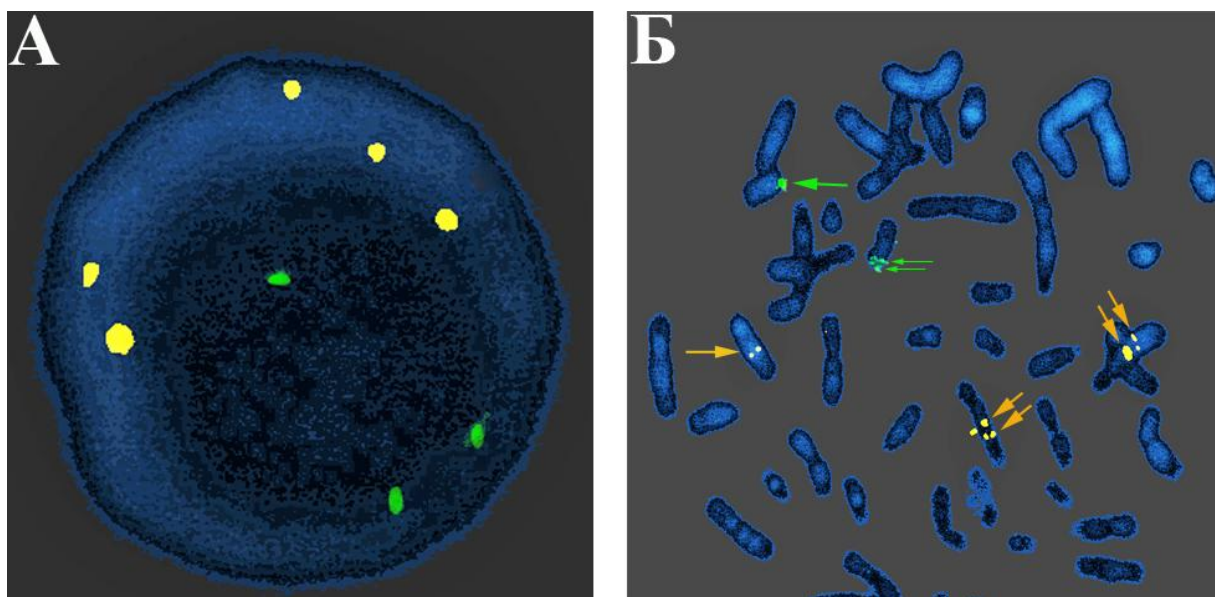
Фигура 25. FISH анализ на Пациент 3.

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 нямаше биологичен проб 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 ВАС - 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 - *puc ish 6q21* (RP3-522O2x5) и по три зелени сигнала - 18p11.21(RP11-94H14x3) (Фиг. 26 А).



Фигура 26. FISH анализ на Пациент 4.

А) Интефазен FISH; Б) Метафазен FISH.

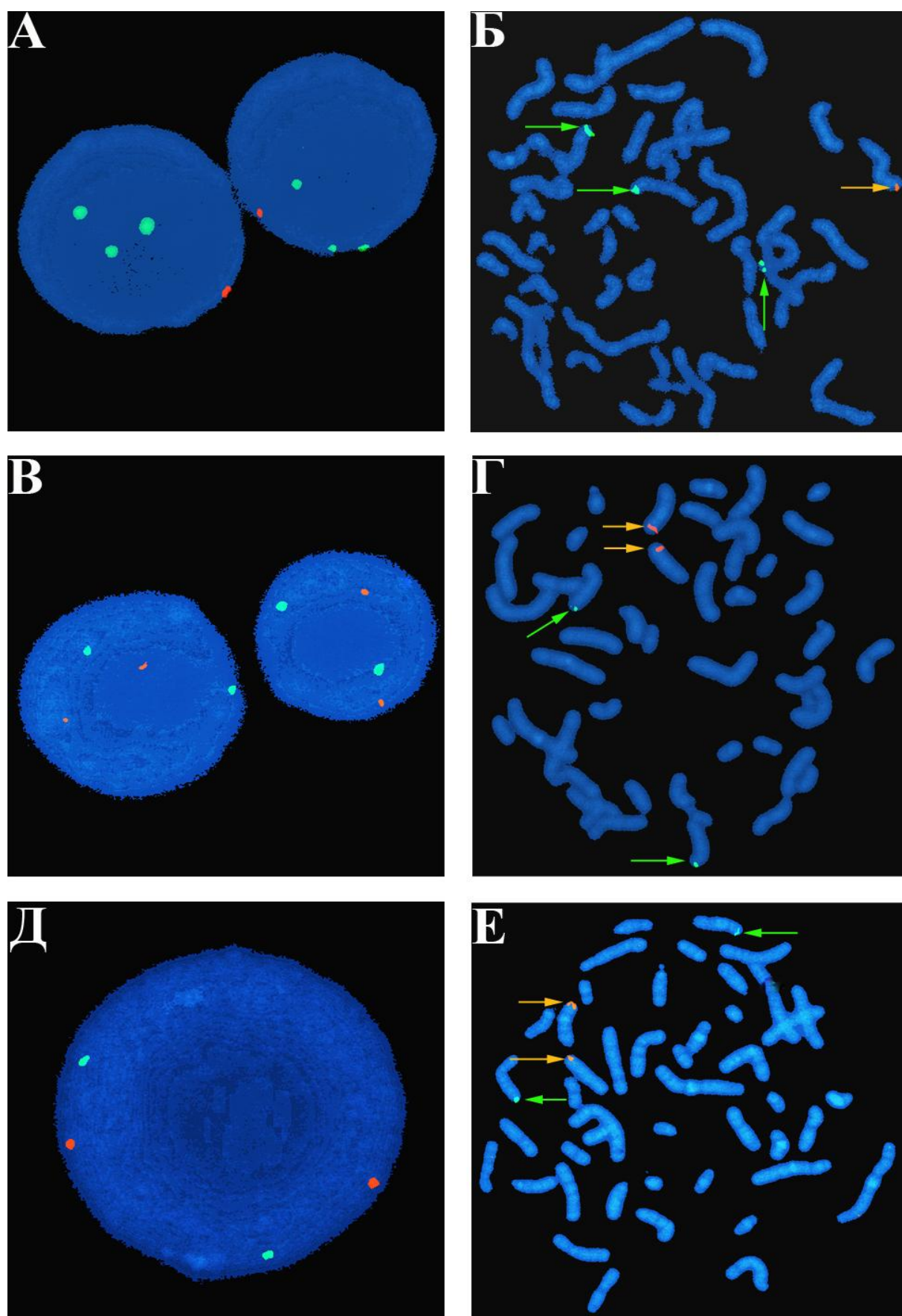
FISH анализът на метафазни пластинки показва, че 2 от допълнителните оранжеви сигнала от RP3-522O2 се дължат на крос хибридизация в късото рамо на 6-та хромозома. Петият оранжев сигнал е локализиран в хромозома от група D. Проведен е повторен цитогенетичен анализ, при което е установено, че между двете 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. 26 Б).

Казус 5 - FISH валидиране на патологичните вариации

FISH анализът на Пациент 5 потвърждава находката от микрочиповия анализ. Подбрани са локус - специфични потвърдителни ВАС - 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 - клона от 8q24 локуса и един оранжев сигнал - *puc ish 9p23(RP11-527D15x1)*, което показва хетерозиготна делеция в този локус (Фиг. 27 А и Б).

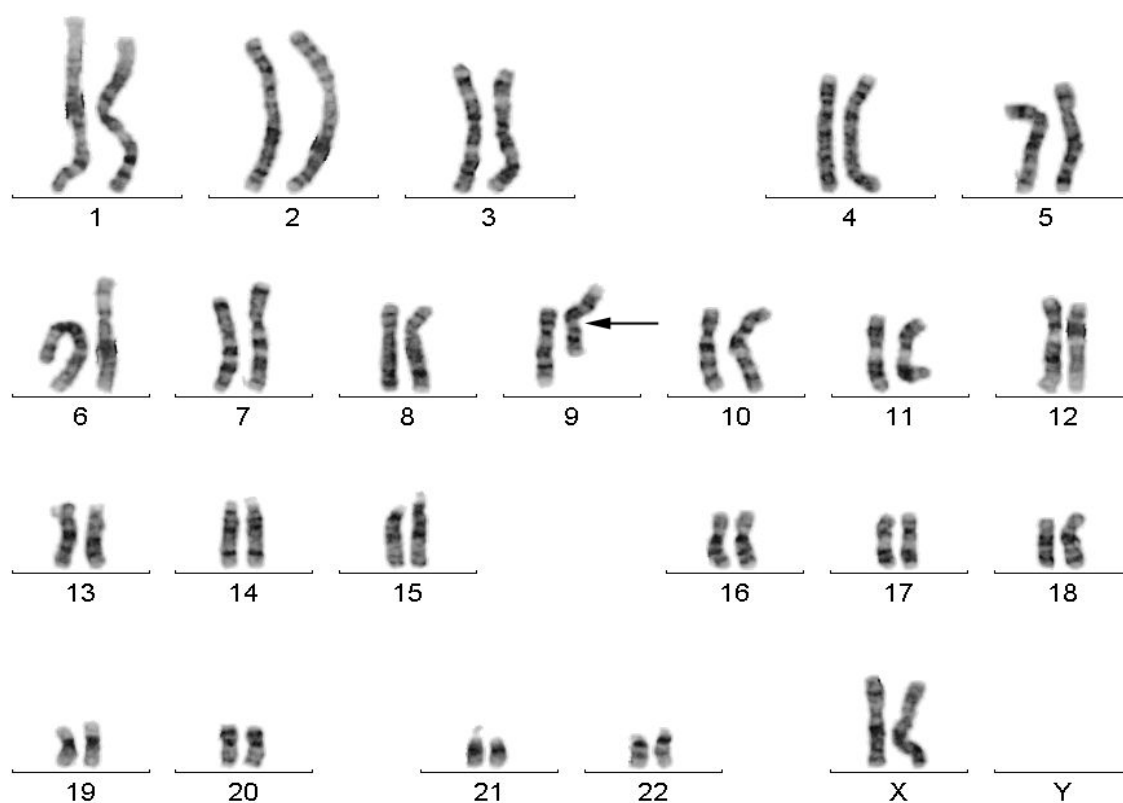
За уточняване на произхода на патологичните CNVs е направен FISH анализ на родителите на пациента. Тъй като RP11-527D15 ВАС - клонът се намира в зона на CNVs с докладвани полиморфни делеции в този район, е важно родителите да се изследват със същия ВАС - клон, за да се отхвърли евентуален полиморфизъм 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. 27 В, Г, Д и Е).



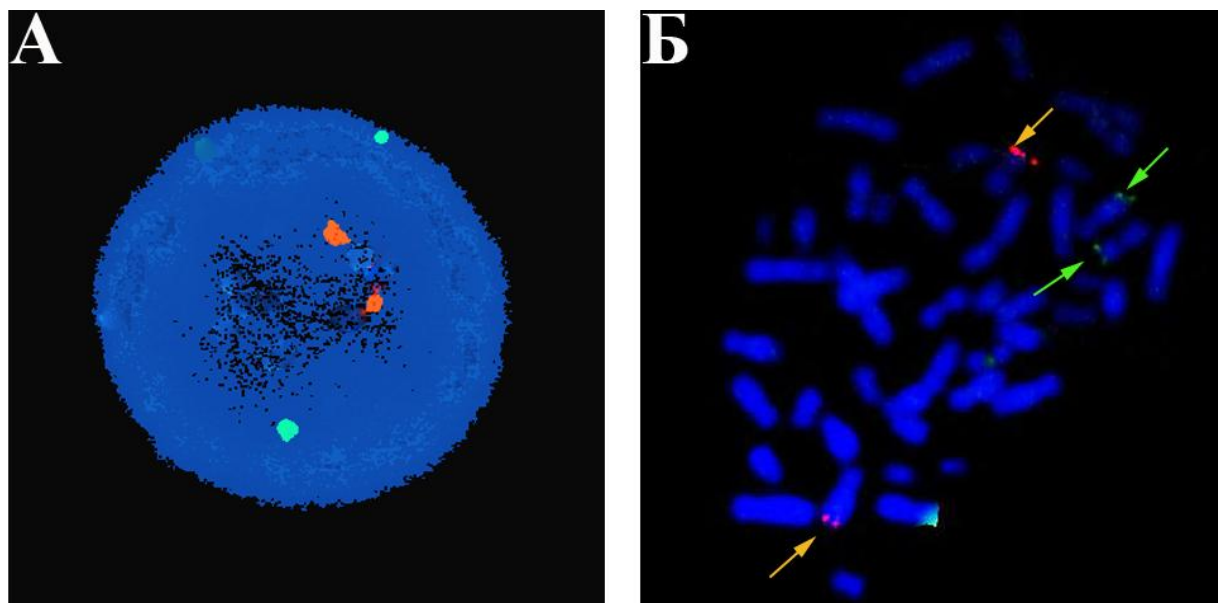
Фигура 27. FISH анализ на Пациент 5 и родителите.

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 (Фиг. 28). Направеният FISH анализ със същите BAC - сонди на сибса показва нормален брой сигнали и от двата локуса (Фиг. 29 А и Б).



Фигура 28. Цитогенетичен анализ на сестрата на Пациент 5.
Инвертираната хромозома 9 е посочена със стрелка.

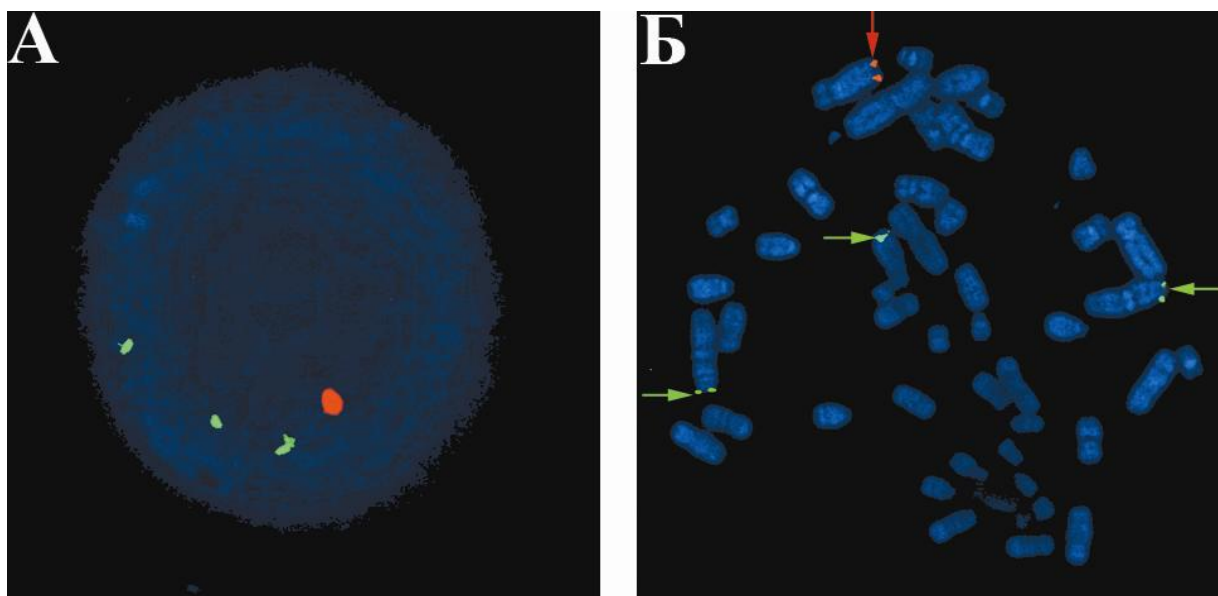


Фигура 29. FISH анализ на сестрата на Пациент 5.

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 молекулярното кариотипиране. Използвани са ВАС - клонове: RP11-99F4/SG с хромозомна позиция 1q43 и RP11-157L10/SO с хромозомен локус 6q26 (Фиг. 30 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).



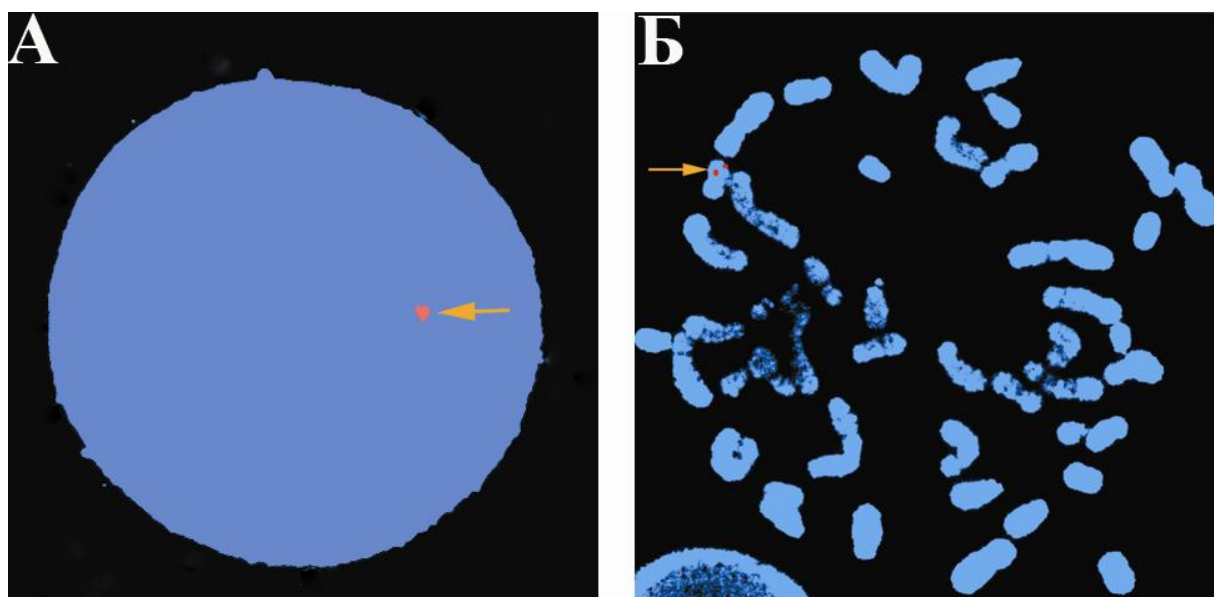
Фигура 30. FISH анализ на Пациент 6.

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 ВАС - 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. 31 А и Б).

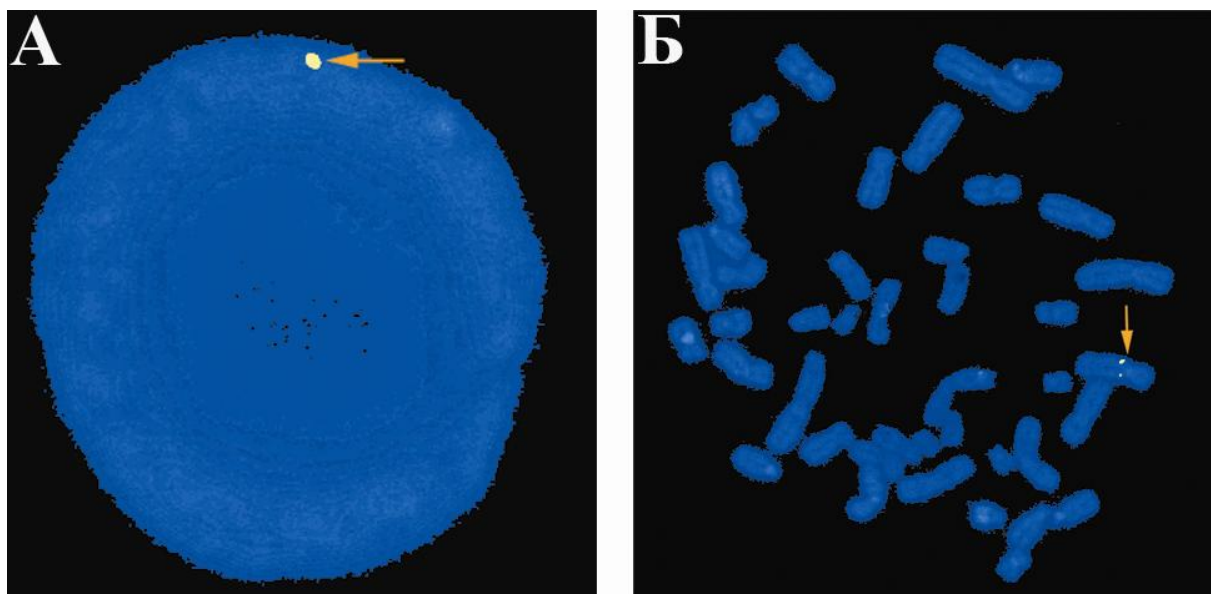


Фигура 31. FISH анализ на Пациент 7.

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 молекулярното кариотипиране (Фиг. 32 А и Б).



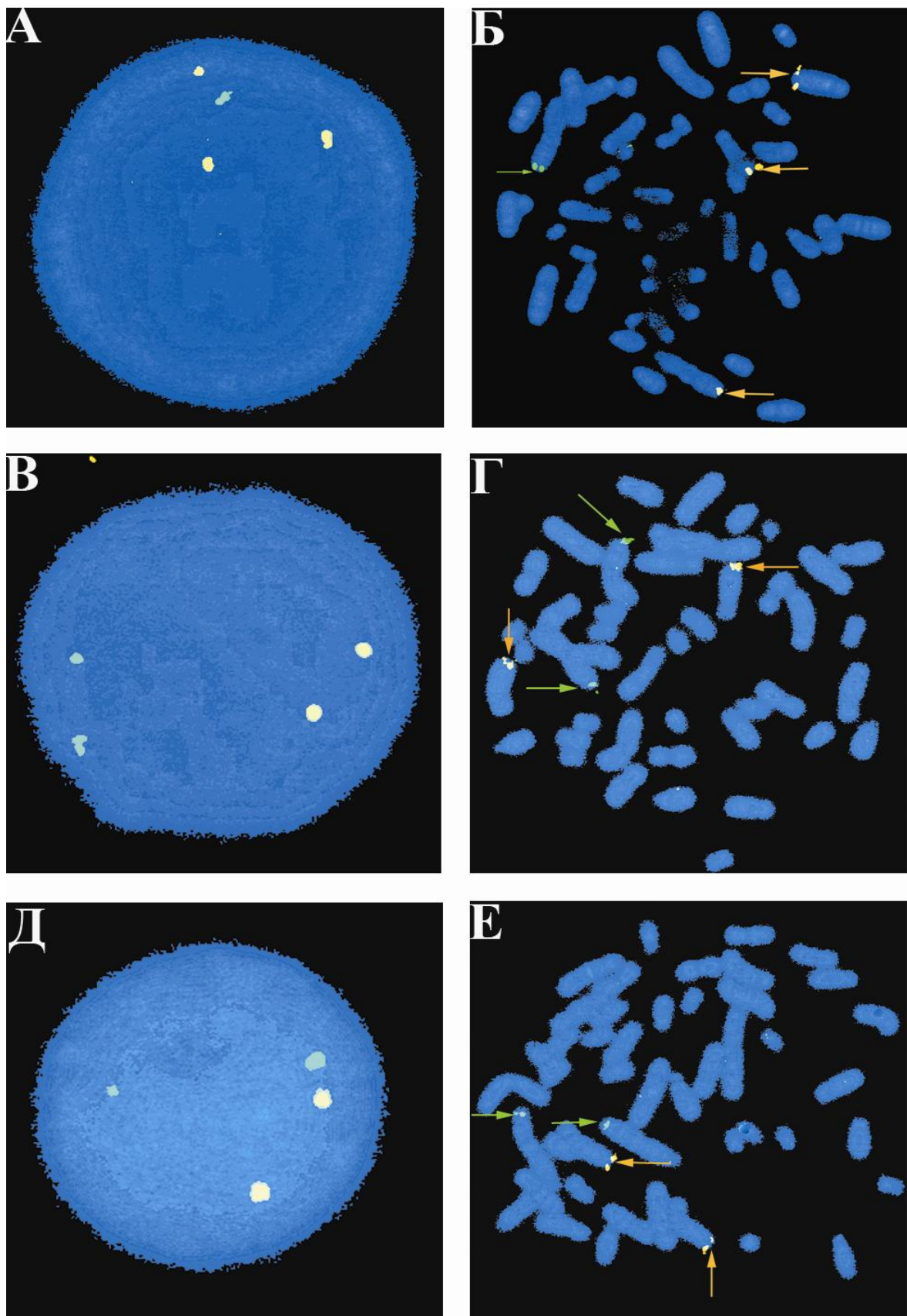
Фигура 32. FISH анализ на Пациент 8.

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 ВАС - клонове: RP11-99F4/SG с хромозомна позиция 1q43 и RP11-157L10/SO с хромозомен локус 6q26 (Фиг. 33 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. 33 В, Г, Д и Е).



Фигура 33. 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 [OMD, 1998], version 2.10, както и са използвани допълнителни интернет източници като OMIM.

6.1. 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 ПАК 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 - 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. 34).



Фигура 34. Клиничен фенотип на Пациент 1.

Наблюдава се лицев дисморфизъм, преаурикуларна висулка, четирипръстна бразда.

6.2. 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 психо-моторното развитие. Поставена е работна диагноза синдром на Смит-Лемли-Опитц.

6.3. 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. 35). Психологично изследване: задръжка в психо-моторното развитие и КоР = 28. Въз основа на наблюдаваната симптоматика е поставена работна диагноза синдром на Едуардс.



продължена



Фигура 35. Клиничен фенотип на Пациент 3.

Наблюдава се отчетлив лицев дисморфизъм, диспластични ротираны назад уши.

6.4. 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. 36).



Фигура 36. Клиничен фенотип на Пациент 6.

6.5. 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 проминиращ 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 проминиращ 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. 37).



Фигура 37. Клиничен фенотип на Пациент 5.

6.6. 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, антимоногоидни очни цепки, особено разположение на косата в челната област, ниско разположени уши, заострена дясна ушна мида, дистално изтънени пръсти (Фиг. 38).



Фигура 38. Клиничен фенотип на Пациент 6.

6.7. 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 CCC са без особености. От опорно-двигателната система е набелязана шийна и по-изразена гръдна кифоза; високо имплантирани палци на ръцете, клинодактилия, къси ахилесови сухожилия.

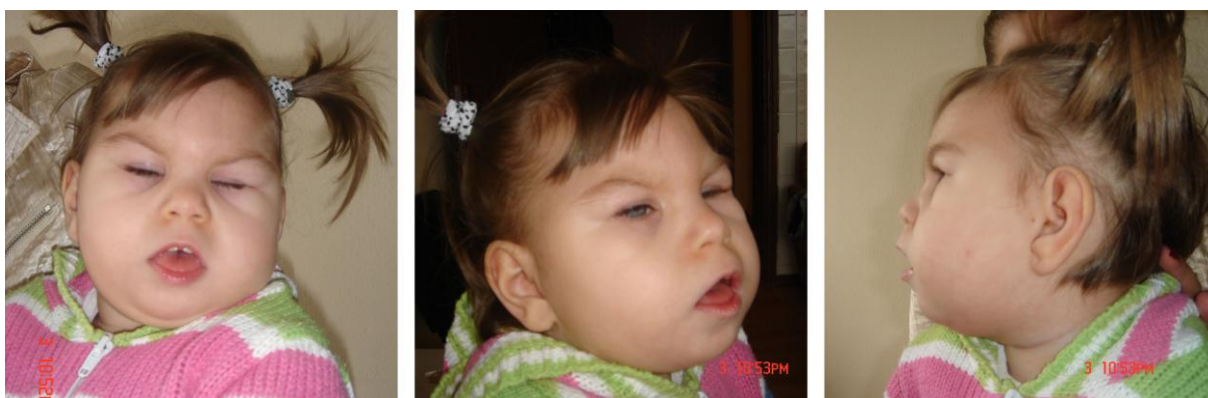
6.8. Казус 8 - клиничен фенотип

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. 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, CCC - ритмична сърдечна дейност, сърдечна честота 98/min, ясни тонове, без шумова находка. От неврологичния статус - спастична диплегия, живи сухожилни

рефлекси, с разширени рефлексогенни зони на долни карйници, 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.

6.9. 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. 39). 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 39. Клиничен фенотип на Пациент 9.

6.1.1. 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 12 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 12. Находки от ВАС- и олиго-чиповия анализ при Пациенти 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Пациенти	Чип	Хро-мо-	Тип абера-ция	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

VI. 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 микроструктурни 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 (Табл. 9, стр. 97, раздел V. 3.). 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 [Hansteen et al., 1982; J. L. Hamerton, 1975; Jacobs, 1974; Maeda et al., 1991]. При деца с т. нар. „хромозомен фенотип” (множествени вродени аномалии и интелектуална недостатъчност) се установяват ХА в много по-висок процент. Kenue и сътр. при проучване на генетичните причини за ВМ установяват абнормен кариотип при 41% [Kenue et al., 1995], а Mohamed M. Mokhtar при 38,7% от изследваните деца с множествени аномалии [Mokhtar, 1997]. Young и сътр. намират при 17% от изследваните хромозомни дефекти [Young et al., 1986]. Въз основа на проучване на Czeizel хромозомни и моногенни дефекти се откриват при 25% от всички ВМ [Czeizel, 2005]. По данни от други литературни източници хромозомни аберации се откриват при

6-10% от ВМ [Jorde et al., 2003; Turnpenny & Ellard, 2005]. Според Симеонов при проучване на 1462 случая на дисморфични синдроми, относителният дял на хромозомните аберации е 29,6% [Симеонов, 1995].

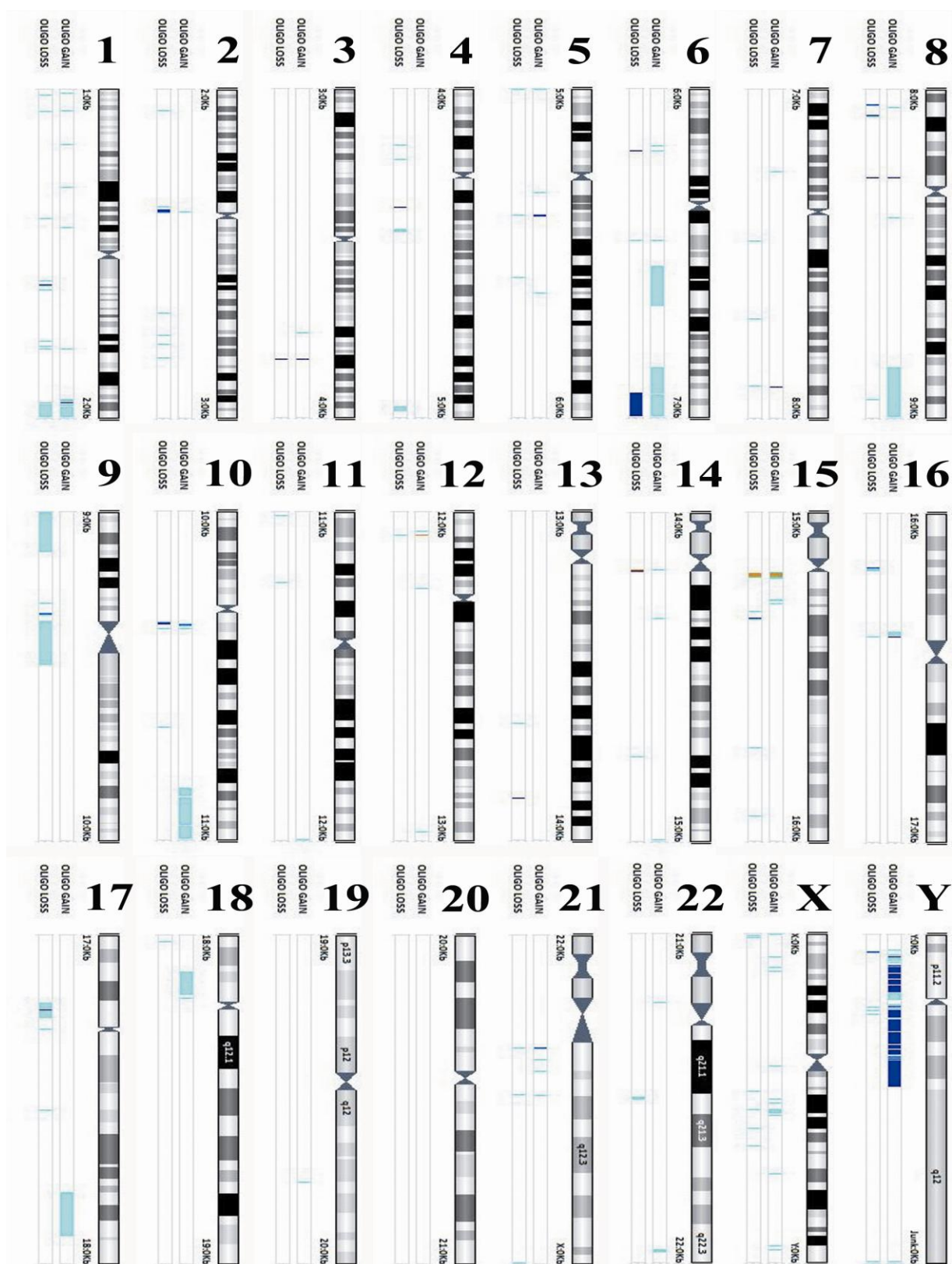
Прави впечатление по-ниският процент на микроскопски установените хромозомни аберации в нашата група. Обяснение за това е, че при първоначалния подбор на пациентите не са прилагани най-строгите критерии за включване, като наличие на множествени аномалии, съчетани или не с поведенчески аномалии и интелектуална 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.

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 CGH

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 40 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 40. Хромозомно разпределение на установените CNVs (патологични, нормални и с неясно клинично значение).
 *oligo loss - делеции; oligo gain - дупликации

1.1. Обсъждане на установените патологични вариации в броя копия

Петнадесет патологични геномни аберации са открити при 9 от изследваните пациенти (Табл. 10, стр. 100, раздел V. 4.1.). В нашето проучване клинично значими патологични находки се срещат с честота 17,3%. При различни изследвания микрочиповата CGH открива количествени геномни нарушения при 10 до 30% от случаите с неясни малформативни синдроми [Bar-Shira et al., 2006; Menten et al., 2006; Sahoo et al., 2006; Schaeffer et al., 2004; Thienpont et al., 2007].

При 6-ма от анализиранияте (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 [Okten et al., 2009], 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

1.2. 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.

1.2.1. 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** (*ING2, RWDD4A, C4orf41, STOX2, ENPP6, IRF2, CASP3, CCDC111, MLF1IP, ACSL1, HELT, SLC25A4, KIAA1430, SNX25, LRP2BP, ANKRD37, UFSP2, C4orf47, CCDC110, PDLIM3, SORBS2, TLR3, FAM149A, CYP4V2, KLKB1, F11, MTNR1A, FAT1*) и **15 OMIM гена** (604215, 147576, 600636, 611511, 152425, 103220, 611482, 609488, 605889, 603029, 608614, 229000, 264900, 600665, 600976). Обхванати са OMIM локуси за външна офталмоплегия с митохондриална ДНК делеция (609283); корнеоретинална дистрофия (210370).

Частичната монозомия по дисталната част на дългото рамо на 4 хромозома спада към групата на редките болести с честота 1:10 000 [Strehle et al., 2001; Strehle & Bantock, 2003]. Симптомите зависят изключително от размера на делетирания участък. Дисталната 4q монозомия обикновено е резултат от спонтанна (де ново) мутация по време на ранното ембрионално развитие. Клиничната картина на частичната 4q монозомия включва различни комбинации от следните находки: хипертелоризъм, широк корен на носа, къс нос с широки ноздри, дълъг филтрум, тънка горна устна, микроретрогнатия, ниско поставени уши, преаурикуларна висулка, ниска линия на окосмяване на врата, клинодактилия на пръстите на ръцете и тежко психомоторно изоставане. Налице са и симптоми като черепни и скелетни дефекти, аномалии на пръстите на ръцете и краката, гастроинтестинални, сърдечни и урогенитални аномалии,

генерализирана мускулна хипотония [Caliebe et al., 1997; Eggermann et al., 2005; Lin et al., 1988; Van Buggenhout et al., 2004].

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 [Graham et al., 1997]. Хаплоинсуфицицията по *SLC25A4*, е добро обяснение за хипертрофичната кардиомиопатия, наблюдавана при нашата пациентка.

Фенотипът на пациентката е модулиран и от присъствието на допълнителна аберация в 6 хромозома - частична тризомия - *dup(6)(q25.1q25.3)* с размер 13.993 Mb. Изолираните дупликации на дългото рамо на 6-та хромозома са изключително рядко докладвани в научната литература. Типичната клинична симптоматика включва хипертелоризъм, антимонголоидно разположени очни цепки, устни с обърнати надолу ъгли, ставни контрактури, лека интелектуална недостатъчност без изоставане във физическото развитие [Zweier et al., 2008].

Дупликацията в *(6)(q24.2q25.3)* е патологична и покрива **66 HGNC гена** (*UTRN, EPM2A, FBXO30, SHPRH, GRM1, RAB32, C6orf103, STXBP5, SAMD5, SASH1, UST, MAP3K7IP2, SUMO4, ZC3H12D, PPIL4, C6orf72, KATNA1, LATS1, NUP43, PCMT1, LRP11, RAET1E, RAET1G, ULBP2, ULBP1, RAET1L, ULBP3, PPP1R14C, IYD, PLEKHG1, MTHFD1L, AKAP12, ZBTB2, RMND1, C6orf211, C6orf97, ESR1, SYNE1, C6orf98, MYCT1, VIP, FBXO5, MTRF1L, RGS17, OPRM1, IPCEF1, MAGI1, CNKSR3, RPS4P8, RBM16, TIAM2, TFB1M, CLDN20, NOX3, MIRN1202, ARID1B, C6orf35, ZDHHC14, SNX9, SYNJ2, SERAC1, GTF2H5, TULP4, TMEM181, DYNLT1, SYTL3*) и **38 OMIM гена** (128240, 607566, 609101, 608048, 604473, 604586, 607955, 610752, 605101, 608829, 611106, 607609, 606696, 603473, 608141, 176851, 609243, 609244, 605698, 605697, 611047, 605699, 612025, 611427, 604698, 133430, 608441, 192320, 606013, 607191, 600018, 604709, 607033, 607105, 605952, 609410, 608780, 601554). Обхванати са OMIM локуси за миоклонична епилепсия (254780); инсулинозависим захарен диабет (600320); дефект в продукцията на щитовидни хормони (274800); автозомно-рецесивна спино-

церебеларна атаксия (610743); глухота, индуцирана от аминокликозиди (580000); фотосензитивна трихотриодистрофия (601675).

Един от дублицираните 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 [Yizhar et al., 2004].

Друг дублициран 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 [Liu et al., 2002]. 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.

1.2.2. 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. Частичната дупликация на 17q района е изключително рядко заболяване. Повечето от случаите са резултат от неправилна мейотична сегрегация при

родител с балансирана транслокация, включваща 17 хромозома [Caine et al., 1989], но макар и рядко се срещат и де ново възникнали мутации [Orye & van Bever, 1985]. Клиничната картина при 17q тризомията има специфична характеристика: интелектуална недостатъчност, тежко изоставане във физическото развитие, психомоторно изоставане, микроцефалия, голяма уста с тънки устни и обърнати надолу ъгли, палатосхизис, микрогнатия, къса шия, вродени сърдечни дефекти, бъбречни аномалии, ризомелия, полидактилия и халтави стави [Fryns et al., 1979; Lukusa & Fryns, 2010; Naccache et al., 1984; Orye & van Bever, 1985]. Фенотипът на нашия пациент покрива някои от типичните симптоми.

Дуплицираният район включваше **128 HGNC гена** (*CCDC46, APOH, PRKCA, MIRN634, CACNG5, CACNG4, CACNG1, HELZ, PSMD12, PITPNC1, MIRN548D2, NOL11, SNORA38B, BPTF, C17orf58, KPNA2, AMZ2, SLC16A6, ARSG, WIPI1, MIRN635, PRKAR1A, FAM20A, ABCA8, ABCA9, ABCA6, ABCA10, ABCA5, MAP2K6, KCNJ16, KCNJ2, SOX9, SLC39A11, SSTR2, COG1, FAM104A, C17orf80, CPSF4L, CDC42EP4, SDK2, C17orf54, RPL38, TTYH2, DNAI2, KIF19, BTBD17, GPR142, GPRC5C, CD300A, CD300LB, CD300C, CD300LD, C17orf77, CD300E, RAB37, CD300LF, SLC9A3R1, NAT9, TMEM104, GRIN2C, FDXR, FADS6, USH1G, OTOF2, OTOF3, C17orf28, CDR2L, ICT1, ATP5H, KCTD2, SLC16A5, ARMC7, NT5C, HN1, NUP85, GGA3, MRPS7, MIF4GD, SLC25A19, GRB2, KIAA0195, CASKIN2, TSEN54, LLGL2, MYO15B, MYO15B, RECQL5, SAP30BP, ITGB4, GALK1, H3F3B, UNK, UNC13D, WBP2, TRIM47, TRIM65, MRPL38, FBF1, ACOX1, CDK3, EVPL, SRP68, GALR2, ZACN, EXOC7, FOXJ1, RNF157, FAM100B, QRIH2, PRPSAP1, SPHK1, UBE2O, AANAT, RHBDF2, CYGB, PRCD, SNORD1C, SNORD1B, SNORD1A, ST6GALNAC2, ST6GALNAC1, MXRA7, JMJD6, C17orf95, SFRS2, MIRN636, MFSD11, MGAT5B*) и **77 OMIM гена** (138700, 176960, 606405, 606404, 114209, 606699, 604450, 605134, 601819, 600685, 603880, 610008, 609224, 188830, 611062, 601254, 605722, 600681, 608160, 182452, 606973, 605468, 607217, 604182, 608855, 605483, 609046, 605949, 606790, 610705, 606786, 609801, 609956, 609807, 604990, 138254, 103270, 607696, 607827, 607828, 605752, 603000, 603879, 191720, 170285, 606006, 611974, 606521, 108355, 608755, 603781, 610218, 147557, 604313, 601058, 601128, 608897, 606962, 611041, 611844, 609751, 123828, 601590, 604858, 603691, 610935, 608163, 602291, 601249, 603730, 600950, 608759, 610598, 610137,

610138, 604914, 600813), като аберацията на някои от тях би могла директно да се свърже с фенотипа на пациентката. Обхванати са OMIM локуси за: комплекс на Carney тип 1 (160980); миксома интракардиален (255960); първична адренокортикална пигментна нодуларна болест (610489); синдром на късия QT интервал (609622); кардиодисритмична перидична парализа на Andersen (170390); кампомелична дисплазия (114290); вродена болест на гликозилирането тип Ig (611209); първична цилиарна дискинезия (612444); хипофосфатемична нефролитиоза/ остеопороза (612287); синдром на Usher тип 1 (276900); синдром на Usher тип IG (606943); микроцефалия тип Amish (607196); булозна епидермолиза с пилорна атрезия (607196); булозна епидермолиза non-Herlitz тип (226650); галактокиназен дефицит (230200); фамилен хемофагоцитен лимфохистиоцитоза (608898); пероксизомален Ацил-КоА-оксидазен дефицит (264470); алергичен ринит (607154); арилалкиламин N-ацетилтрансфераза (600950); ретинитис пигментоза (610599).

Сред гените с променена доза е *CEP112* (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 [Bond et al., 2005; Feng & Walsh, 2004], 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. Birnbaum и сътр. установяват, че високата активност на *PRKCA* може да доведе до префронтална кортикална дисфункция [Birnbaum et al., 2004]. De Quervain и сътр. при изследването на 304 индивида установяват, че *PRKCA* участва в сигнална каскада, включваща седем протеина, важни за човешката памет [de Quervain & Papassotiropoulos, 2006].

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 [Zuo et al., 2006]. Посредством RT-PCR ELISA Kikuno и сътр. установяват висока експресия в мозъка, особено в

нуклеус амигдалоидеус [Kikuno et al., 1999]. Нарушаването на метаболизма на секреторните везикули в синапсите има критична роля за процесите на запаметяването [Kaufman et al.].

В заключение направена е фенотип/генотипна корелация между *CEP112* и микроцефалията и *PRKCA* и *EXOC7* и изоставането в интелектуалното развитие.

1.2.3. 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 молекулярното 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).

В литературата рядко са съобщавани делеции на 6q района [Klein et al., 2007], но се характеризират със специфичен фенотип. Клиничната находка обикновено включва следните симптоми: интелектуална недостатъчност (100%), аномалии на ушите (88%), хипотония (86%), микроцефалия (82%), дефекти на крайниците (71%), мозъчни аномалии (67%), очни нарушения (50%), сърдечни дефекти (48%), генитални аномалии (48%) и припадъци (38%) [Evers et al., 1996; Hopkin et al., 1997; Lukusa et al., 2001; Meng et al., 1992; Nagamani et al., 2009; Pirola et al., 1998; Stevenson et al., 2004; Sukumar et al., 1999; Titomanlio et al., 2006]. 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** (*ZDHHC14, SNX9, SYNJ2, SERAC1, GTF2H5, TULP4, TMEM181, DYNLT1, SYTL3, EZR, OSTCL, C6orf99, RSPH3, TAGAP, FNDC1, SOD2, WTAP, ACAT2, TCP1, SNORA20, SNORA29, MRPL18, PNLDC1, MAS1, IGF2R, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, LPAL2, LPA, PLG, MAP3K4, AGPAT4, PARK2, PACRG, QKI, C6orf118, PDE10A, T, PRR18, SFT2D1, BRP44L, RPS6KA2, MIRN1913, RNASET2, FGFR1OP, CCR6, GPR31, TCP10L2, UNC93A, TTLL2, TCP10, C6orf123, C6orf124, MLLT4, KIF25, FRMD1, DACT2, SMOC2, THBS2, WDR27, C6orf120, PHF10, C6orf70, TCTE3, DLL1, FAM120B, PSMB1, TBP, PDCD2*) и **43 OMIM гена** (173350,

602425, 602544, 608427, 609590, 610652, 601397, 601685, 605392, 601835, 602043, 607995, 187020, 159559, 603815, 608966, 607223, 188061, 186977, 606582, 612266, 602017, 600075, 600866). Обхванати са локуси за фотосензитивна трихотиодистрофия (OMIM, 601675); ацетил Ко-ензим А ацетилтрансфераза (OMIM, 100678); аполипопротеин а (OMIM, 152200); плазминогенен дефицит тип I (OMIM, 217090); тромбофилия (OMIM, 188050); автозомно-рецесивна ювенилна форма на болестта на Паркинсон (OMIM, 600116), предразположение към лепра 2 (OMIM, 607572); дефекти на невралната тръба (OMIM, 182940); интервертебрална дископатия (OMIM, 603932); спиноцеребеларна атаксия 17 (OMIM, 607136).

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. Хаплоинсуфициенцията 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 [Nagamani et al., 2009].

Фенотипът на пациентката е повлиян и от дуплицирания участък на 10-та хромозома. Дисталната тризомия по 10q е изключително рядко заболяване. То се характеризира с изключително бавен пренатален и постнатален растеж, необичайно намален мускулен тонус (хипотония), лека до тежка интелектуална недостатъчност, както и леки до значителни закъснения в придобиването на умения, които изискват координация на психичните и мускулните дейности (психомоторно забавяне). Засегнатите деца могат да имат и характерни малформации на краниофациалната област, дефекти на ръцете и/или краката, аномалии на скелета, сърцето, бъбреците или белите дробове. Обхватът и тежестта на симптомите могат да варират при отделните случаи, в зависимост от точната дължина и мястото на дуплицираната част от хромозомата 10q. В повечето случаи дисталната 10q тризомия се дължи на хромозомна балансирана транслокация на един от родителите. В литературата са описани и случаи с

така наречената „чиста” дистална тризомия 10q, но това е много рядко явление [Migliori et al., 2002].

Дупликацията в (10)(q25.2q26.3) региона покрива **137 HGNC гена** (*GFRA1*, *C10orf96*, *PNLIPRP3*, *PNLIP*, *PNLIPRP1*, *PNLIPRP2*, *C10orf82*, *HSPA12A*, *C10orf134*, *KIAA1598*, *VAX1*, *KCNK18*, *SLC18A2*, *PDZD8*, *EMX2*, *RAB11FIP2*, *CASC2*, *C10orf84*, *PRLHR*, *C10orf46*, *NANOS1*, *EIF3A*, *SNORA19*, *FAM45A*, *SFXN4*, *PRDX3*, *GRK5*, *RGS10*, *TIAL1*, *RPS8P4*, *BAG3*, *INPP5F*, *C10orf119*, *SEC23IP*, *PPAPDC1A*, *C10orf85*, *BRWD2*, *RPL19P16*, *FGFR2*, *RPS15AP5*, *ATE1*, *NSMCE4A*, *TACC2*, *BTBD16*, *PLEKHA1*, *HTRA1*, *DMBT1*, *C10orf120*, *CUZD1*, *FAM24B*, *FAM24A*, *C10orf88*, *PSTK*, *IKZF5*, *ACADSB*, *HMX3*, *HMX2*, *BUB3*, *GPR26*, *CPXM2*, *OAT*, *NKX1-2*, *FAM53B*, *METTL10*, *FAM175B*, *ZRANB1*, *CTBP2*, *C10orf122*, *C10orf137*, *MMP21*, *UROS*, *BCCIP*, *DHX32*, *FANK1*, *ADAM12*, *C10orf90*, *DOCK1*, *C10orf141*, *NPS*, *FOXI2*) и **74 OMIM гена** (601496, 246600, 604422, 604423, 610701, 611171, 604294, 193001, 600035, 608599, 608598, 600895, 608226, 602039, 604769, 600870, 602856, 603413, 603883, 609389, 610909, 606417, 176943, 607103, 605302, 607772, 602194, 601969, 611310, 606238, 600301, 600647, 603719, 604847, 608277, 258870, 602619, 608416, 606938, 611883, 607960, 611640, 602714, 601403, 609513). 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 кутис 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-зависима дегенерация на макулата (610149); фамилна глиома (137800); 2-метилбутирил-КоА-дехидрогеназен дефицит (610006); орнитин-аминотрансферазен дефицит (258870); конгенитална еритропоеична 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 locus 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 неврогенеза.

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.

1.2.4. 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 CGH 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** (*EPHA7, MANEA, FUT9, KIAA0776, FHL5, GPR63, NDUFAF4, KLHL32, C6orf167, POU3F2, FBXL4, C6orf168, COQ3, SFRS18, USP45, CCNC, PRDM13, MCHR2, SIM1, ASCC3, GRIK2, HACE1, LIN28B, BVES, C6orf112, POPDC3, PREP, RPL35P3, PRDM1, ATG5, AIM1, RTN4IP1, QRSL1, MIRN587, C6orf203, BEND3, PDSS2, SOBP, SCML4, SEC63, RPL3P7, OSTM1, NR2E1, SNX3, LACE1, FOXO3, ZNF259P, ARMC2, SESN1, C6orf182, C6orf183, C6orf184, C6orf185, CD164, PPIL6, SMPD2, MICAL1, ZBTB24, C6orf224, AKD1, AKD2, FIG4, GPR6, WASF1, CDC40, C6orf186, DDO, SLC22A16, CDC2L6, AMD1, GTF3C6, BXDC1, BXDC1P, SLC16A10, KIAA1919, REV3L, TRAF3IP2, FYN, WISP3, TUBE1, C6orf225, LAMA4, RFPL4B, RPSAP45*) и **46 OMIM гена** (602190, 612327, 606865, 605126, 606915, 611776, 600494, 605654, 605196, 123838, 606111, 603128, 138244, 610876, 611044, 604577, 605824, 600400, 603423, 604261, 601797, 610502, 610564, 608648, 607649, 603849, 605930, 602681, 606103, 603356, 603498, 607129, 609390, 600553, 605035, 605585, 124450, 608276, 180980, 607550, 602776, 607043, 137025, 603400, 607345, 600133). Обхванати са OMIM локуси за: дефицит на комплекс I от митохондриалните ензими (252010); автозомно-рецесивна интелектуална недостатъчност (611092); поликистична чернодробна болест (174050), автозомно-рецесивна остеопетроза (259720); синдромна микрофталмия (601349); болест на Шарко-Мари-Тут 4J тип (611228); прогресивна ювенилна псевдоревматоидна артропатия (208230).

Дупликацията в (18)(p24.3p22.2) района покрива **34 HGNC гена** (*KIAA0802, NDUFV2, ANKRD12, TWSG1, RALBP1, PPP4R1, RAB31, TXNDC2, VAPA, APCDD1, NAPG, FAM38B, FAM38B2, C18orf58, GNAL, MPPE1, IMPA2, CIDEA, TUBB6, AFG3L2, SLMO1, SPIRE1, CEP76, PSMG2, PTPN2, SEH1L, CEP192, C18orf1, C18orf19, RNMT, MC5R, MC2R, ZNF519, ANKRD20A5*) и **22 OMIM гена** (600532, 610616, 605049, 605801, 604908, 605694, 605703, 607479, 603216, 139312, 611900, 605922, 604440, 604581, 609216, 609702, 176887, 609263, 606571, 603514, 600042, 607397). Обхванати са OMIM локуси за: глюкокортикоиден дефицит (202200); дефицит на комплекс I от митохондриалните 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 [Marical et al., 2007; Vermeulen et al., 2005; Wolff et al., 1991]. Това ни провокира да потърсим по - скоро корелация на клиничната картина с геномния дисбаланс в 6 - та хромозома. Парциалната тризомия 6q е изключително рядка хромозомна болест и клиничната картина варира при различните случаи. Фенотипът на нашия пациент покриваше някои от типичните симптоми при 6q тризомията: изоставане във физическото развитие, интелектуална недостатъчност, краниофациални аномалии, необичайно къса шия с птериgium, ставни контрактури и др. В повечето случаи частичната тризомия 6q е резултат от неправилна мейотична сегрегация на балансирана транслокация при един от родителите [Bernheim et al., 1979; Fitch, 1978; Rothlisberger et al., 1999]. За съжаление нямаше възможност да изследваме родителите на детето. Публикуваните данни в литературата за високо-резолютивен геномен скрининг на парциална 6q тризомия са оскъдни, тъй като става въпрос за рядка хромозомна болест. По-лекият клиничен фенотип подсказва, че в този район има по-малко доза-зависими гени.

Сред дублицираните 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 [Atanasoski et al., 1995]. Silveira и сътр. откриват увеличен брой повтори при пациент с интелектуална недостатъчност и атаксия [Silveira et al., 2002]. 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 неврогенезата. *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 [Fan et al., 1996]. 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.

1.2.5. 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 CGH 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. Клиничната картина покрива някои от типичните симптоми на частичната 9p - монозомия. Частичната 9p монозомия е известна още като синдрома на Алфи и е от групата на редките заболявания [Alfi et al., 1973]. Клинично се характеризира с дисморфични белези (дълъг филтрум, малформирани уши, тригоноцефалия с проминиращ фронтален ръб, краниосиностоза), изоставане в нервно-психичното развитие, хипотония, и др. [Huret et al., 1988]. 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 [Christ et al., 1999; Kawara et al., 2006; Marille et al., 2008; Swinkels et al., 2008]. Правят се опити за идентифициране критичните райони за тригоноцефалията и интелектуална недостатъчност. Chen C. и сътр. при геномното скриниране на 13 пациента с 9p - монозомия стесняват критичния район до 300 Kb [Marille et al., 2008].

При финото картиране на засегнатия регион от хромозома 9 е установено, че делецията обхваща **61 HGNC гена** (*CBWD1*, *C9orf66*, *DOCK8*, *KANK1*, *DMRT1*, *DMRT3*,

DMRT2, SMARCA2, VLDLR, KCNV2, KIAA0020, RFX3, GLIS3, SLC1A1, C9orf68, PPAPDC2, CDC37L1, AK3, RCL1, MIRN101-2, JAK2, IGHEP2, INSL6, INSL4, RLN2, RLN1, C9orf46, CD274, PDCD1LG2, KIAA1432, ERMP1, MLANA, KIAA2026, RANBP6, IL33, TPD52L3, UHRF2, GLDC, RPL23AP57, RNF2P, JMJD2C, C9orf123, PTPRD, RPL18AP11, RPS26P3, TYRP1, C9orf150, MPDZ, C9orf146, NFIB, ZDHHC21, CER1, FREM1, TTC39B, SNAPC3, PSIP1, C9orf93, C9orf92, BNC2, CNTLN, SH3GL2) и **40 OMIM гена** (611078, 611432, 607704, 602424, 604935, 600014, 192977, 607604, 609960, 601337, 610192, 133550, 611666, 610346, 609290, 611405, 147796, 606414, 600910, 179740, 179730, 605402, 605723, 610354, 611156, 605513, 608678, 238300, 605469, 601598, 115501, 603785, 600728, 603777, 608944, 602348, 603620, 608669, 611870, 604465), едни от които с неизвестна функция и други, имащи отношение към клиничната картина. Обхванати са OMIM локуси за церебеларна хипоплазия и интелектуална недостатъчност (224050); дистрофия на ретината (610356); неонатален захарен диабет с вроден хипотиреодизъм (610199); дикарбоксиламинноацидурия (222730); миелофиброза (254450); остра миелоидна левкемия (601626); есенциална тромбоцитемия (187950); полицитемия вера (263300); синдром на Budd-Chiari (600880); глицинова енцефалопатия (605899); окулокутанен албинизъм III тип (203290). Сред засегнатите гени бяха *VLDLR* (Very Low Density Lipoprotein Receptor), *GLIS* (Family Zinc Finger Protein 3), *SLC1A* (Solute Carrier Family - Neuronal/Epithelial High Affinity Glutamate Transporter), *JAK2* (Janus Kinase 2), *GLDC* (Glycine Decarboxylase) и др.

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 [Griggs et al., 2008]. 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 [Griggs et al., 2008].

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. Lerer и сътр. са изследвали 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 [Lerer et al., 2005]. 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 [Raymond et al., 1998]. 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 [Brisset et al., 2006; Chen et al., 2006; Huret et al., 1988; Jehee et al., 2005; Witters et al., 2004]. 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 [Chen et al., 2006; Schimmenti et al., 1995], но за момента има докладван само още един случай на комбинация от 9p частична монозомия и 8q частична тризомия [Okten et al., 2009]. Нашият случай е уникален с това, че участващата в преустройството 9-та хромозома има в добавка и перицентрична инверсия.

Частичната тризомия 8q24 е изключително рядко заболяване. Първият случай на частична тризомия 8q е докладван през 1972 от Lejeune и сътр. [Lejeune et al., 1972].

Клиничният фенотип наподобява този при пълната тризомия 8 (синдром на Warkany). Клиничните белези на синдрома включват хипертелоризъм, косо разположени очни цепки, широки ноздри, лека микрогнатия, тънка горна устна, кръгло лице с пълни бузи, лека задръжка в психомоторното развитие, без данни за малформации [Puvabanditsin et al., 2004; Sachs & van Waveren, 1981; Stengel-Rutkowski et al., 1992].

Картирането на q24.13q24.3 - дублицирания район в 8 хромозома разкри, че са обхванати **153 HGNC гена** (*ZHX2, DERL1, WDR67, FAM83A, C8orf76, ZHX1, ATAD2, MIRN548D1, WDYHV1, FBXO32, KLHL38, ANXA13, FAM91A1, FER1L6, C8orf54, TMEM65, TRMT12, RNF139, TATDN1, NDUFB9, MTSS1, ZNF572, SQLE, KIAA0196, NSMCE2, TRIB1, FAM84B, POU5F1P1, MYC, TMEM75, MIRN1205, MIRN1207, MIRN1208, GSDMC, FAM49B, ASAP1, ADCY8, EFR3A, OC90, KCNQ3, LRRC6, TMEM71, PHF20L1, TG, SLA, WISP1, NDRG1, ST3GAL1, ZFAT, MIRN30B, MIRN30D, KHDRBS3, FAM135B, COL22A1, KCNK9, TRAPPC9, C8orf17, CHAC1, EIF2C2, PTK2, MIRN151, DENND3, SLC45A4, GPR20, PTP4A3, TSNARE1, BAI1, ARC, PSCA, LY6K, C8orf55, SLURP1, LYPD2, LYNX1, LY6D, GML, CYP11B1, CYP11B2, LY6E, C8orf31, LY6H, GPIHBP1, ZFP41, GLI4, ZNF696, TOP1MT, RHPN1, MAFA, ZC3H3, GSDMD, C8orf73, NAPRT1, EEF1D, TIGD5, PYCRL, TSTA3, ZNF623, ZNF707, MAPK15, FAM83H, SCRIB, MIRN937, PUF60, NRBP2, PLEC1, MIRN661, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, EXOSC4, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C8orf30A, HEATR7A, SCXB, C8orf30B, BOP1, SCXA, HSF1, DGAT1, SCRT1, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CPSF1, MIRN939, MIRN1234, SLC39A4, VPS28, NFKBIL2, GPT, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, MFSD3, RECQL4, LRRC14, LRRC24, C8orf82, ZNF251, ZNF34, ZNF517, ZNF7, COMMD5, ZNF250, ZNF16, ZNF252, C8orf33*) и **84 OMIM гена** (609185, 608813, 604764, 611941, 606604, 602573, 611244, 603046, 601445, 608486, 602019, 610657, 609461, 609483, 190080, 608384, 605953, 103070, 601658, 602232, 188450, 601099, 603398, 605262, 607187, 610931, 610421, 610026, 605874, 611966, 607268, 606229, 600758, 601908, 606449, 602682, 602470, 606119, 606110, 606204, 602370, 610613, 124080, 601384, 603625, 165280, 606387, 610303, 611552, 130592, 137020, 611927, 607733, 604819, 601282, 609564, 138251, 610874, 606491, 603048, 123980, 611885, 610210, 609067, 610596, 609067, 140580, 604900, 605858, 609076, 607882, 606027, 607059, 611952, 604546, 138200, 603621, 609172, 603780, 194526, 604177, 194531,

608216, 601262). Обхванати са OMIM локуси за бъбречноклетъчен карцином (144700); автозомно-доминантна спастична параплегия (603563); нормална неонатална епилепсия (121201); предразположение към автоимунен тиреоидит (608175); тиреоглобулин (188450); болест на Шарко–Мари–Тут IV тип (601455); болест на de Meleda (248300); алдостеронизъм, чувствителен на глюкокортикоиди (103900); вродена надбъбречна хиперплазия, поради дефицит на стероид-11-бета-хидроксилаза (202010); дефицит на кортикостерон-метилоксидаза I тип (203400); дефицит на кортикостерон-метилоксидаза II тип (610600); амелогенезис имперфекта III тип (130900); епидермолизис булоза симплекс (131950); епидермолизис булоза симплекс с мускулна дистрофия (226670); цинк-зависим ентеропатичен акродерматит (201100); синдром на Rothmund-Thomson (268400); синдром на Baller-Gerold (218600); синдром на Rapadilino (266280). Част от засегнатите гени са свързани с фенотипа на пациента и са кандидати за по-нататъшни функционални проучвания за ролята им в процесите на индивидуалното развитие и интелектуална недостатъчност.

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 CGX) 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.

1.2.6. 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 високорезолютивния геномен скрининг. Клиничната картина на частичната 1q тризомия включва различни комбинации от следните симптоми: изоставане във вътреутробното развитие, макроцефалия, широки фонтанели с голямо разстояние между черепните шевове, проминиращо чело, капилярни невуси по лицето, антимоноголоидно разположени очни

цепки, плосък корен на носа, ниско разположени уши, микроретрогнатия, изоставане в психомоторното развитие и сърдечни дефекти [Chia et al., 1998; Concolino et al., 1998; Emberger et al., 2001; Shin et al., 2008; Verschuuren-Bemelmans et al., 1995].

Финото картиране на дуплицирания регион в 1-ва хромозома показва, че там се намират **41 HGNC гена** (*TOMM20, SNORA14B, RBM34, ARID4B, GGPS1, TBCE, B3GALNT2, GNG4, LYST, MIRN1537, NID1, GPR137B, ERO1LB, EDARADD, LGALS8, HEATR1, ACTN2, MTR, MT1P2, RYR2, ZP4, CHRM3, RPS7P5, FMN2, ADH5P3, GREM2, RGS7, FH, KMO, OPN3, CHML, WDR64, EXO1, MAP1LC3C, PLD5, CEP170, SDCCAG8, AKT3, ZNF238, C1orf100, ADSS, C1orf101, PPPDE1, FAM36A, C1orf199, HNRNPU, EFCAB2, KIF26B, SMYD3, TFB2M, C1orf71, SCCPDH, AHCTF1P, AHCTF1, ZNF695, ZNF670, ZNF669, ZNF124, VN1R5, ZNF496, NLRP3, OR2B11, OR2W5, C1orf150, OR2C3, OR2G2, OR2G3, OR13G1, OR6F1, OR14A2, OR14K1, OR1C1, OR9H1P, OR14A16, HSD17B7P1, OR11L1, TRIM58, OR2T8, OR2W3, OR2AJ1, OR2L13, OR2L8, OR2AK2, OR2L1P, OR2L5, OR2L2, OR2L3, OR2M1P, OR2M5, OR2M2, OR2M3, OR2M4, OR2T33, OR2T12, OR2M7, OR14C36, OR2T4, OR2T6, OR2T1, OR2T2, OR2T3, OR2T5, OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T7, OR2T27, OR14I1, SH3BP5L, ZNF672, ZNF692, PGBD2*) и **23 OMIM гена** (601848, 609696, 606982, 604934, 610194, 604388, 606897, 131390, 604658, 606603, 606099, 102573, 156570, 180902, 118494, 606373, 608832, 602517, 136850, 603538, 606695, 118825, 606063, 609605, 611223, 608433, 103060, 602869, 608783, 607055, 610853, 606416, 611677). Обхванати са OMIM локуси за синдрома на Chediak-Higashi (214500); автозомно-рецесивна хипохидротична ектодермална дисплазия (224900); дилатативна кардиомиопатия 1AA (612158); фолат-зависим ДНТ (601634), хомоцистеинемия (603174); метилкобаламинов дефицит тип cblG (250940); полиморфна катехоламинергична вентрикуларна тахикардия (604772); фамилна аритмогенна десностранна вентрикуларна дисплазия (600996); фамилна вентрикуларна дисплазия (192605); наследствена лейомиоматоза и бъбречноклетъчен карцином (605839); фумаразен дефицит (606812) и наследствена множествена кожна лейомиома (150800).

Част от гените са с неизвестна функция, а други могат да се свържат с клиничния фенотип: гени от клъстър на олфакторния рецептор, *NLRP3* (*Homo sapiens* NLR family, pyrin domain containing 3, transcript variant 5, mRNA); гени, кодиращи zinc

finger протеини; *SCCPDH* (Homo sapiens saccharopine dehydrogenase (putative), mRNA); *C1orf71* (Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 71, transcript variant 1, mRNA); *ACTN2* (Homo sapiens actinin, alpha 2, mRNA); *GREM2* (Homo sapiens gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis, mRNA); *LYST* (Homo sapiens lysosomal trafficking regulator mRNA); *LGALS8* (Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 8, transcript variant 4, mRNA); *EDARADD* (Homo sapiens EDAR-associated death domain, transcript variant A, mRNA) и други.

В нашия случай фенотипът на пациентката се модулира и от присъствието на допълнителна аберация в 6 хромозома - частична делеция del(6)(q25.36q27). Делецията в (6)(q25.3q27) - района е патологична и покрива **28 HGNC гена** (*SNX9*, *SYNJ2*, *SERAC1*, *GTF2H5*, *TULP4*, *TMEM181*, *DYNLT1*, *SYTL3*, *EZR*, *OSTCL*, *C6orf99*, *RSPH3*, *TAGAP*, *FNDCA1*, *SOD2*, *WTAP*, *ACAT2*, *TCP1*, *SNORA20*, *SNORA29*, *MRPL18*, *PNLDC1*, *MAS1*, *IGF2R*, *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, *LPAL2*, *LPA*, *PLG*, *MAP3K4*, *AGPAT4*, *PARK2*, *PACRG*, *QKI*, *C6orf118*, *PDE10A*, *T*, *PRR18*, *SFT2D1*, *BRP44L*, *RPS6KA2*, *MIRN1913*, *RNASET2*, *FGFR1OP*, *CCR6*, *GPR31*, *TCP10L2*, *UNC93A*, *TTLL2*, *TCP10*, *C6orf123*, *C6orf124*, *MLLT4*, *KIF25*, *FRMD1*, *DACT2*, *SMOC2*, *THBS2*, *WDR27*, *C6orf120*, *PHF10*, *C6orf70*, *TCF3*, *DLL1*, *FAM120B*, *PSMB1*, *TBP*, *PDCD2*) и **16 OMIM гена** (605952, 609410, 608780, 601554, 123900, 609667, 609991, 147460, 605442, 100678, 186980, 611831, 165180, 147280, 602607, 602608, 604842, 611682, 152200, 173350, 602425, 602544, 608427, 609590, 610652, 601397, 601685, 605392, 601835, 602043, 607995, 187020, 159559, 603815, 608966, 607223, 188061, 186977, 606582, 612266, 602017, 600075, 600866). Обхванати са OMIM локуси за ацетил-КоА-ацетилтрансфераза (100678); плазминогенен дефицит тип I (217090); тромбофилия (188050); автозомно-рецесивна ювенилна форма на болестта на Паркинсон (600116); предразположение към лепра (607572).

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 [Nagamani et

al., 2009; Susan et al., 1989; Veronica et al., 2006]. 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. Хаплоинсуфициентията 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.

1.2.7. 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** (*ZNF624, CCDC144A, KRT17P1, TBC1D27, TNFRSF13B, MPRIP, C17orf84, PLD6, FLCN, COPS3, NT5M, MED9, RASD1, PEMT, RAI1, SREBF1, MIRN33B, TOM1L2, LRRC48, ATPAF2, C17orf39, DRG2, MYO15A, ALKBH5, LLGL1, FLII, SMCR7, TOP3A, SMCR8, SHMT1, EVPLL, KRT14P, LGALS9C, CCDC144B, RPS28P9, RPS28P6, RPS28, TBC1D28, FOXO3B, TRIM16L, FBXW10, FAM18B, PRPSAP2, SLC5A10, FAM83G, GRAP, SNORD3B-1, SNORD3B-1, SNORD3B-2, SNORD3D, SNORD3A, SNORD3C, EPN2, B9D1, MIRN1180, MAPK7, MFAP4, RNF112, RPL17P43, SLC47A1, ALDH3A2, SLC47A2, ALDH3A1, ULK2, AKAP10, CYTSB, CCDC144C, FAM106A, FAM106B, LGALS9B*) и **30 OMIM гена** (604907, 607273, 604665, 605292, 609878, 605550, 602391, 607642, 184756, 608918, 602986, 602666, 600966, 600362, 601243, 182144, 611679, 603762, 604330,

607263, 602521, 600596, 601237, 609832, 609523, 609833, 100660, 608650, 604694, 608793). Обхванати са OMIM локуси за синдрома на Smith-Magenis (182290); синдрома на Potocki-Lupski (610883); вариабилен имунодефицит (240500); първичен спонтанен пневмоторакс (173600); синдрома на Birt-Hogg-Dube (135150); неонатална митохондриална енцефалокардиомиопатия (604273); автозомна рецесивна глухота (600316); синдрома на Sjogren-Larsson (270200). 8% от региона е покрит от полиморфизми от тип делеция (DGV: 8%, Emory: 0%).

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*. Популационната честота на синдрома се изчислява на 1 на 15 000-25 000 индивида като се засягат по равно и двата пола се среща във всички етнически групи. *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 молекулярното кариотипиране при нея беше изяснена диагнозата, което още веднъж

подчертава мощта на микрочиповата СГХ при генетичното диагностициране на пациенти с неясна симптоматика.

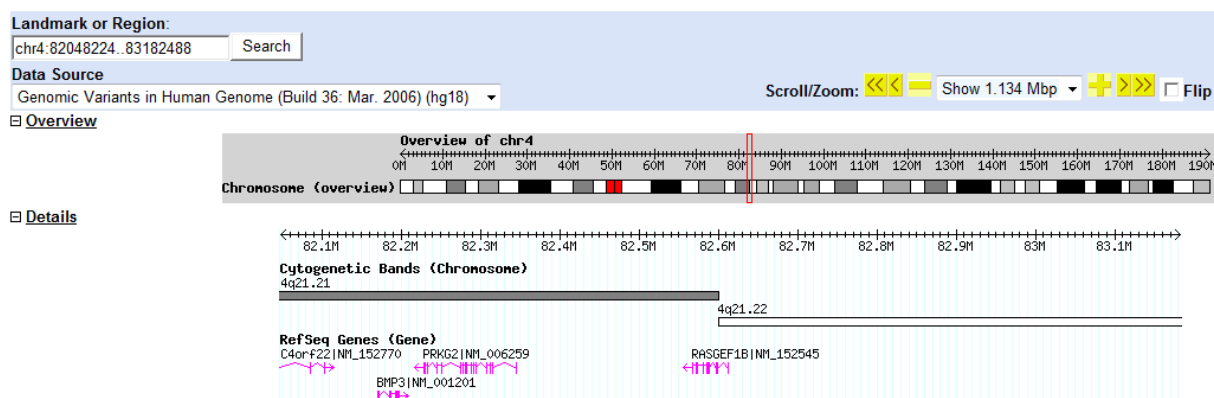
1.2.8. **arr 4q21.21q21.22(82,592,957-84,293,873)x1**

Делецията в (4)(q21.21q21.22) - района е патологична и покрива **12 HGNC гена** (RASGEF1B, HNRNPD, HNRPDL, ENOPH1, RPL7AP26, SCD5, MIRN575, SEC31A, THAP9, LIN54, COPS4, PLAC8) и **5 OMIM гена** (601324, 607137, 608370, 610257, 607515). 1% от региона е покрит от полиморфизми от тип делеция (DGV: 8%, Eмогу: 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** (*C4orf22*, *BMP3*, *PRKG2*) и **2 OMIM гена** (112263, 601591).

В научната литература има съобщения, описващи нтерстициалната делеция в 4q21 региона. 4q21 микроделеционният синдром е новоописан синдром с характерен фенотип. Въпреки, че делетираният участък е с различни размери при отделните пациенти, при повечето от тях се наблюдава изоставане в растежа и интелектуална недостатъчност. Описани са други съпровождащи аномалии: долихоцефалия, хипертелоризъм, дълъг филтрум, микростомия, лошо подредени зъби, двустранна сензонеурална глухота със стеноза на ушния канал.

Освен описаните симптоми при нашият пациент бяха установени допълнително брахидактилия и петопръстна клинодактилия, лошо подредени пръсти на краката, разширени терминални фаланги на горни и долни крайници, костен скелет с торако-лумбална кифоза.

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 [Bonnet et al., 2010; Buysse et al., 2009; Friedman et al., 2006b; Harada et al., 2002]. 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. 41).



Фигура 41. 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 [Chelly et al., 2006]. 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 [Newey et al., 2005].

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 [Chikuda et al., 2004; Kugimiya et al., 2005; Pfeifer et al., 1996]. 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 [Uhler, 1993]. Следователно хаплоинсуфициенцията на *PRKG2* гена може има значение за интелектуалните възможности на пациентите [Buysse et al., 2009].

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 са потвърдени данните на Buysse и сътр., че *PRKG2* и *RASGEF1B* са най-обещаващите кандидат гени, асоциирани с клиничните симптоми при пациентите [Buysse et al., 2009].

1.2.9. 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** (*CHRM3, RPS7P5, FMN2, ADH5P3, GREM2, RGS7, FH, KMO, OPN3, CHML, WDR64, EXO1, MAP1LC3C, PLD5, CEP170, SDCCAG8, AKT3, ZNF238, C1orf100, ADSS, C1orf101, PPPDE1, FAM36A, C1orf199, HNRNPU, EFCAB2, KIF26B, SMYD3, TFB2M, C1orf71, SCCPDH, AHCTF1P, AHCTF1, ZNF695, ZNF670, ZNF669, ZNF124, VN1R5, ZNF496, NLRP3, OR2B11, OR2W5, C1orf150, OR2C3, OR2G2, OR2G3, OR13G1, OR6F1, OR14A2, OR14K1, OR1C1, OR9H1P, OR14A16, HSD17B7P1, OR11L1, TRIM58, OR2T8, OR2W3, OR2AJ1, OR2L13, OR2L8, OR2AK2, OR2L1P, OR2L5, OR2L2, OR2L3, OR2M1P, OR2M5, OR2M2, OR2M3, OR2M4, OR2T33, OR2T12, OR2M7, OR14C36, OR2T4, OR2T6, OR2T1, OR2T2, OR2T3, OR2T5, OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T7, OR2T27, OR14I1, SH3BP5L, ZNF672, ZNF692, PGBD2*) и **19 OMIM гена** (118494, 606373, 608832, 602517, 136850, 603538, 606695, 118825, 606063, 609605, 611223, 608433, 103060, 602869, 608783, 607055, 610853, 606416, 611677). Обхванати са OMIM локуси за лейомиоматоза и бъбречноклетъчен рак (OMIM 605839); наследствена множествена кожна лейомиома (OMIM 150800); фумаразен дефицит (OMIM 606812); фамилен автоинфламаторен синдром (OMIM 120100); CINCA синдром (OMIM 607115); MUCKLE-WELLS синдром (OMIM 191900).

Частичната 1q монозомия се характеризира с микроцефалия, физическо и психомоторно изоставане, краниофациални аномалии, агенезия/хипоплазия на корпус калозум [Johnson et al., 1985; Mankinen et al., 1976; Meinecke & Vogtel, 1987; Watson et al., 1986].

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 [Guarguaglini et al., 2005]. Генният продукт на *SDCCAG8* (serologically defined colon cancer antigen 8) също е асоцииран към центрозоите [Kenedy et al., 2003]. Известно е, че центрозомалните протеини регулират размера на мозъка при хората и мишките [Bond et al., 2005; Feng & Walsh, 2004], 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 [Potter et al., 2003; Verdu et al., 1999]. Установено е, че при *AKT3* “knockout” мишки, размерите на мозъка и на корпус калозум са значително редуцирани [Easton et al., 2005], 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 [Roshon & Ruley, 2005].

Възможни са две обяснения за двустранната глухота, установена при пациентката. В делетирия участък е картиран автозомно-рецесивен ген за глухота *DFNB45* [Bhatti et al., 2008]. 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 [Kurima et al., 2000].

Дупликацията в **(6)(q25.3q27)** - района е патологична и покрива **64 HGNC гена** (*TMEM181*, *DYNLT1*, *SYTL3*, *EZR*, *OSTCL*, *C6orf99*, *RSPH3*, *TAGAP*, *FNDCC1*, *SOD2*, *WTAP*, *ACAT2*, *TCP1*, *SNORA20*, *SNORA29*, *MRPL18*, *PNLDC1*, *MAS1*, *IGF2R*, *SLC22A1*,

SLC22A2, SLC22A3, LPAL2, LPA, PLG, MAP3K4, AGPAT4, PARK2, PACRG, QKI, C6orf118, PDE10A, T, PRR18, SFT2D1, BRP44L, RPS6KA2, MIRN1913, RNASET2, FGFR1OP, CCR6, GPR31, TCP10L2, UNC93A, TTLL2, TCP10, C6orf123, C6orf124, MLLT4, KIF25, FRMD1, DACT2, SMOC2, THBS2, WDR27, C6orf120, PHF10, C6orf70, TCTE3, DLL1, FAM120B, PSMB1, TBP, PDCD2) и **40 OMIM гена** (601554, 123900, 609667, 609991, 147460, 605442, 100678, 186980, 611831, 165180, 147280, 602607, 602608, 604842, 611682, 152200, 173350, 602425, 602544, 608427, 609590, 610652, 601397, 601685, 605392, 601835, 602043, 607995, 187020, 159559, 603815, 608966, 607223, 188061, 186977, 606582, 612266, 602017, 600075, 600866). Обхванати са OMIM локуси за ацетил-КоА-ацетилтрансфераза (OMIM 100678); плазминогенен дефицит тип I (217090); тромбофилия (188050); автозомно-рецесивна ювенилна форма на болестта на Паркинсон (600116); предразположение към лепра (607572); дефекти на невралната тръба (OMIM 182940); интервертебрална дискова болест (OMIM 603932); спиноцеребеларна атаксия (OMIM 607136).

Клиничната картина на частичната 6q25→6qter тризомия включва тежка интелектуална недостатъчност, хипертелоризъм, микрогнатия, обърнати надолу устни ъгли, аномалии на зъбите, къса шия, сколиоза, флекссионни контрактури [Clark et al., 1980]. От изброените по-горе OMIM заболявания нямаше съвпадение при пациент 6, тъй като те са автозомно-рецесивен тип на унаследяване, а в случая се касаеше за увеличена генна доза.

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

1.3. 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 [Beckmann et al., 2007; McCarroll & Altshuler, 2007]. 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 [Beckmann et al., 2007; McCarroll & Altshuler, 2007].

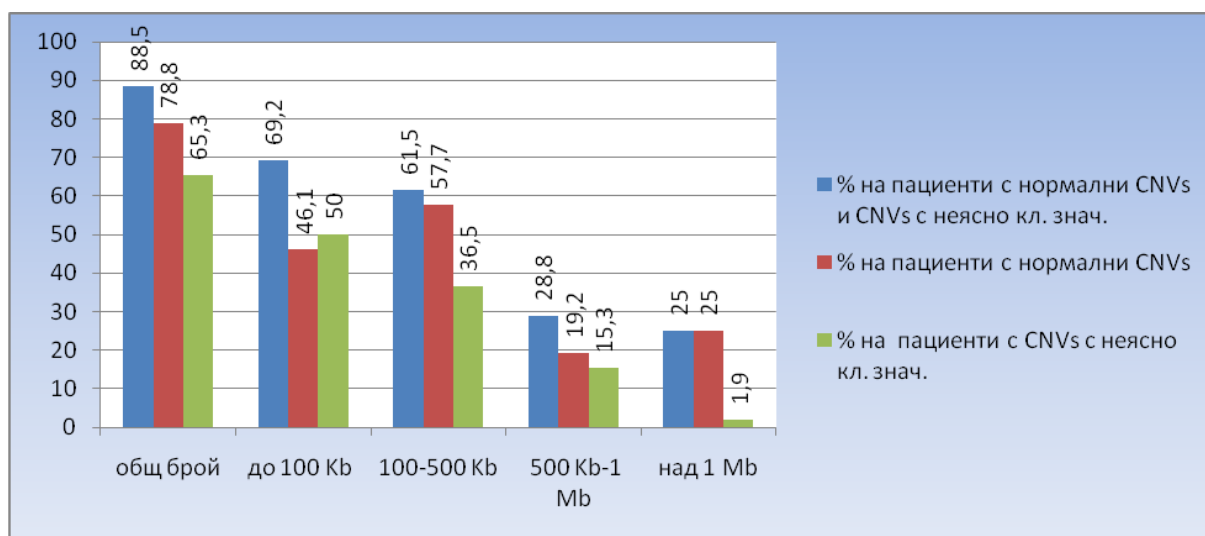
Развитието на микрочиповите технологии за скриниране на целия геном разкрива неочаквано голям брой делеции и дупликации в човешкия геном. Това налага щателно изследване на CNVs в здрави популации и болни индивиди. Редица авторски колективи от различни страни вече докладваха резултати от големи популационни проучвания при здрави и болни индивиди [Buysse et al., 2009; Craddock et al., 2010; Iafrate et al., 2004; Itsara et al., 2009; Pinto et al., 2007; Sebat et al., 2004]. За съжаление в това отношение България изостава от останалите европейски народи.

В нашето проучване, при молекулярното 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.

През 2004 две големи проучвания установяват, че средно в генома на всеки човек има по 12 CNVs [Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004]. По-късно през 2009 г. Itsara и сътр. при анализа на 2500 контролни индивиди намират среден брой CNVs на един човек между 3 и 7 варианта [Itsara et al., 2009]. Нашите данни (4,5 вариации на пациент) в най-голяма степен се приближават до резултатите на Itsara и сътр. За много по-нисък

среден брой CNVs на пациент докладват [Buysse et al., 2009]. При анализа на 603 пациента с вродени малформации с 44K олиго - чипове те намират общо 1538 вариации или средно 2,55 вариации на пациент. Също така те съобщават за 14% пациенти без CNVs, докато при нас този процент е 11,5%. Възможно обяснение за тази разлика е, че ние приложихме олигонуклеотидни чипове с по-голяма резолюция (формат 2x105K, геномна резолюция 35 Kb).

Itsara и сътр. при анализа на 2500 контролни индивиди установяват при 65-80% от изследваните наличие на CNVs > 100 Kb, при 5-10% CNVs > 500 Kb и при 1-2% CNVs > 1 Mb [Itsara et al., 2009]. 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. 42). Прави впечатление, че в нашата извадка се срещат с по-голяма честота вариантите с размери над 500 Mb.

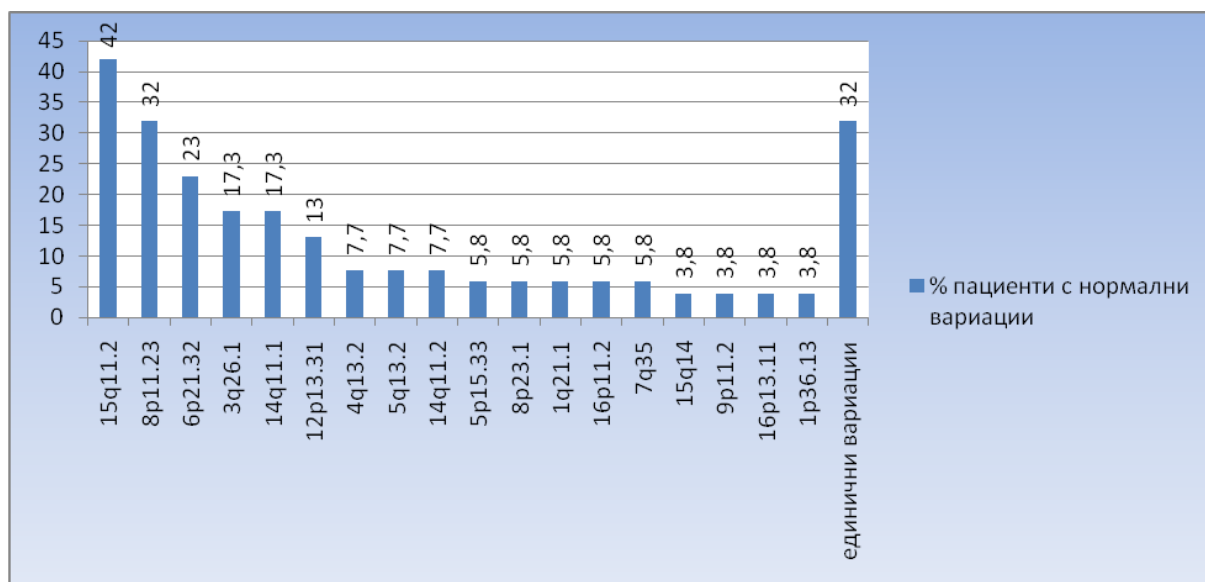


Фигура 42. Честота на установените CNVs, разпределени по размер и вариант.

1.3.1. 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. 43).



Фигура 43. 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. 44). Прави впечатление, че при част от изследваните се касае за делетиран материал, а при други за дублициран, 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 44. Нормални вариации в броя копия, установени при над 10% от изследваните пациенти.

Червените региони, отговарят на делетиран генетичен материал, а зелените на дублициран генетичен материал.

Кооу и сътр. смятат, че полиморфните CNVs са част от естествените генетични разлики при хората, докато редките варианти по-скоро могат да имат принос при определени заболявания [Кооу, 2010]. При мащабно популационно проучване проведено от Wellcome Trust Consortium, е установено, че най-вероятно полиморфните CNVs нямат голям дял в генетичната етиология на повечето мултифакторни заболявания, а по-скоро са част от нормалните генетични вариации между отделните индивиди [Wellcome Trust Case Control Consortium et al., 2010]. Те установяват асоциация само между три локуса и определени мултифакторни заболявания, а именно *IRGM* гена при болестта на Крон; *HLA* при болестта на Крон, ревматоидния артрит и диабет тип 1; *TSPAN8* гена при диабет тип 2.

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.

1.3.2. 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 [Lee et al., 2007a].

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 [Conrad et al., 2006; Cooper et al., 2008; de Smith et al., 2007; Kidd et al., 2008; Kim et al., 2009; Levy et al., 2007; Locke et al., 2006; McCarroll et al., 2008; Perry et al., 2008; Pinto et al., 2007; Redon et al., 2006; Shaikh et al., 2009; Sharp et al., 2005; Wang et al., 2007; Wheeler et al., 2008; Wong et al., 2007; Zogopoulos et al., 2007].

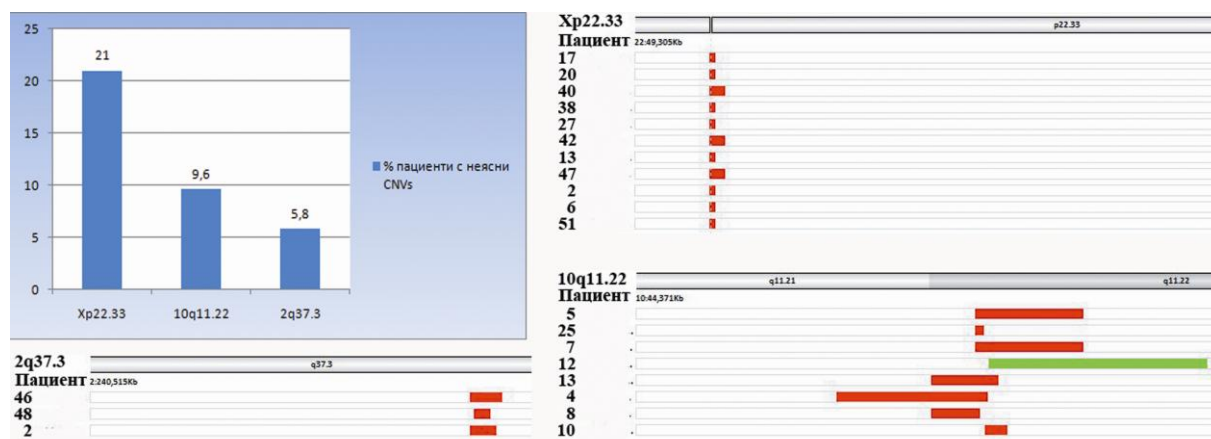
От установените 108 вариации с неясно клинично значение при повече от един пациент се срещат вариации в следните цитогенетични локуси: Xq23, 2q37.3, Xp22.33, 22q11.23, Xq21.1, 10q11.22, 8p23.1, 1q43, Xq23, 2p11.2, 1q44, 12p13.31, 22q11.21, Xq26.3, 1q21.3, 6q14.1, 1q31.3. При 26 пациента се намериха общо 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, Xp22.33 (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. 45).



Фигура 45. 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, Xq28, 10q11.21, 15q13.3, 18p11.21, 21q22.3, Xq21.2, 1p34.2, 1p31.1, 1p21.1, 15q26.2, 16p13.11, Xp22.2, 10q23.2, Xq23, 22q11.23, Xq21.1, 10q11.22, 8p23.1, 1q43, 2p11.2 са намерени при пациенти с установени големи патологични аберации, свързани със специфичният им фенотип. Съгл. Lee и сътр. 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 [Lee et al., 2007a]. 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 [Bonnet et al., 2010; Buysse et al., 2009; Friedman et al., 2006b; Harada et al., 2002], 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. 13).

Таблица 13. 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)

продължена

Па-циент	Локус	Брой OMIM гени	Размер	Тип аберация	OMIM заболявания
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	
10	10q11.22	1 (OMIM 601790)	136,905	делеция	
10	10q11.22	2 (OMIM 610630, 610631)	466,265	делеция	
13	10q11.22	3 (OMIM 608081, 611240, 601790)	404,978	делеция	
25	10q11.22	2 (OMIM 608081, 611240)	60,352	делеция	
50	10q11.22	2 (OMIM 610630, 610631)	527,093	дупликация	
50	12p13.31	2 (OMIM 611039, 138170)	114,563	дупликация	
40	12q24.33	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	22q11.21	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 ОМІМ заболявания са с автозомно - рецесивно унаследяване (дихидропиримидин-дехидрогеназен дефицит, мускулна атрофия ІІ тип, спинална мускулна атрофия ІV тип, спинална мускулна атрофия І тип, спинална мускулна атрофия ІІІ 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.

Патологичните геномни дисбаланси, установени с микрочипов анализ, най-често впоследствие се валидират с втори молекулен метод. Дисбалансите (делеции или дупликации с размери под 40 Kb) могат да бъдат валидирани с MLPA, количествени PCR (Polymerase Chain Reaction) методи, микросателитно генотипиране или в някои случаи с друга микрочипова CGX платформа [Feuk et al., 2006]. Делеции с размер по-голям от 40 Kb могат да бъдат потвърдени със стандартен метафазен или интерфазен FISH анализ като се използва клон от района на делецията. С FISH на метафази могат да бъдат потвърдени и големи дупликации (повече от 10 Mb), а при по-малки размери информативен може да бъде интерфазния FISH. Дупликации с размери под 40 Kb също могат да бъдат доказани с метафазен FISH, но само ако дуплицирания участък се намира върху различни хромозоми [Lee et al., 2007a]. Fiber-FISH методите могат да бъдат изключително информативни, особено при определяне на локализацията на CNVs върху хромозомите, но е технически трудно за изпълнение, времеемко е и извън възможностите на повечето цитогенетични лаборатории.

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. 46).

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

Кариотип на Пациент 5:

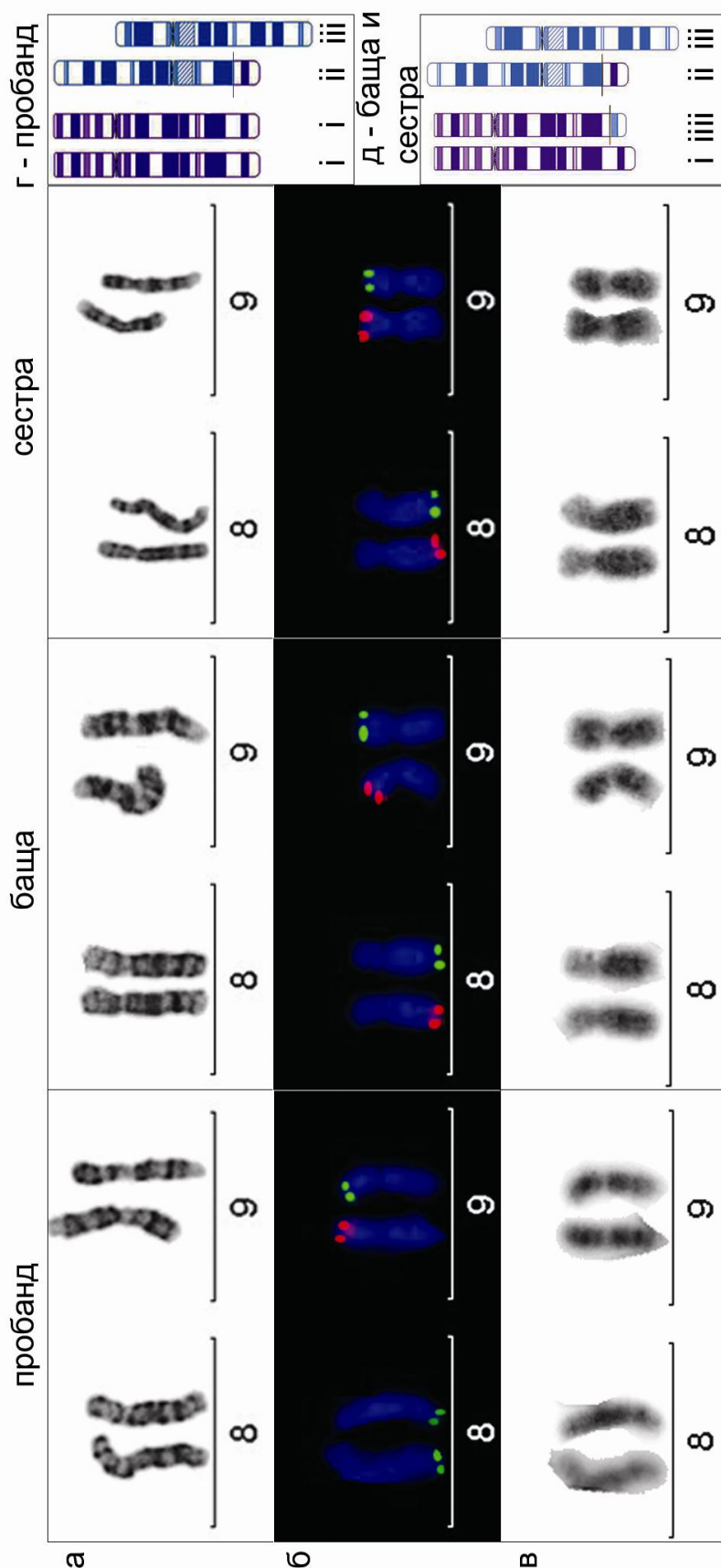
46,XY,der(9)inv(9)(p11q13)t(8;9)(q24.13;p22.2).

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 46. 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 перицентрична 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 [Cicccone et al., 2005; Giglio et al., 2002]. 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.

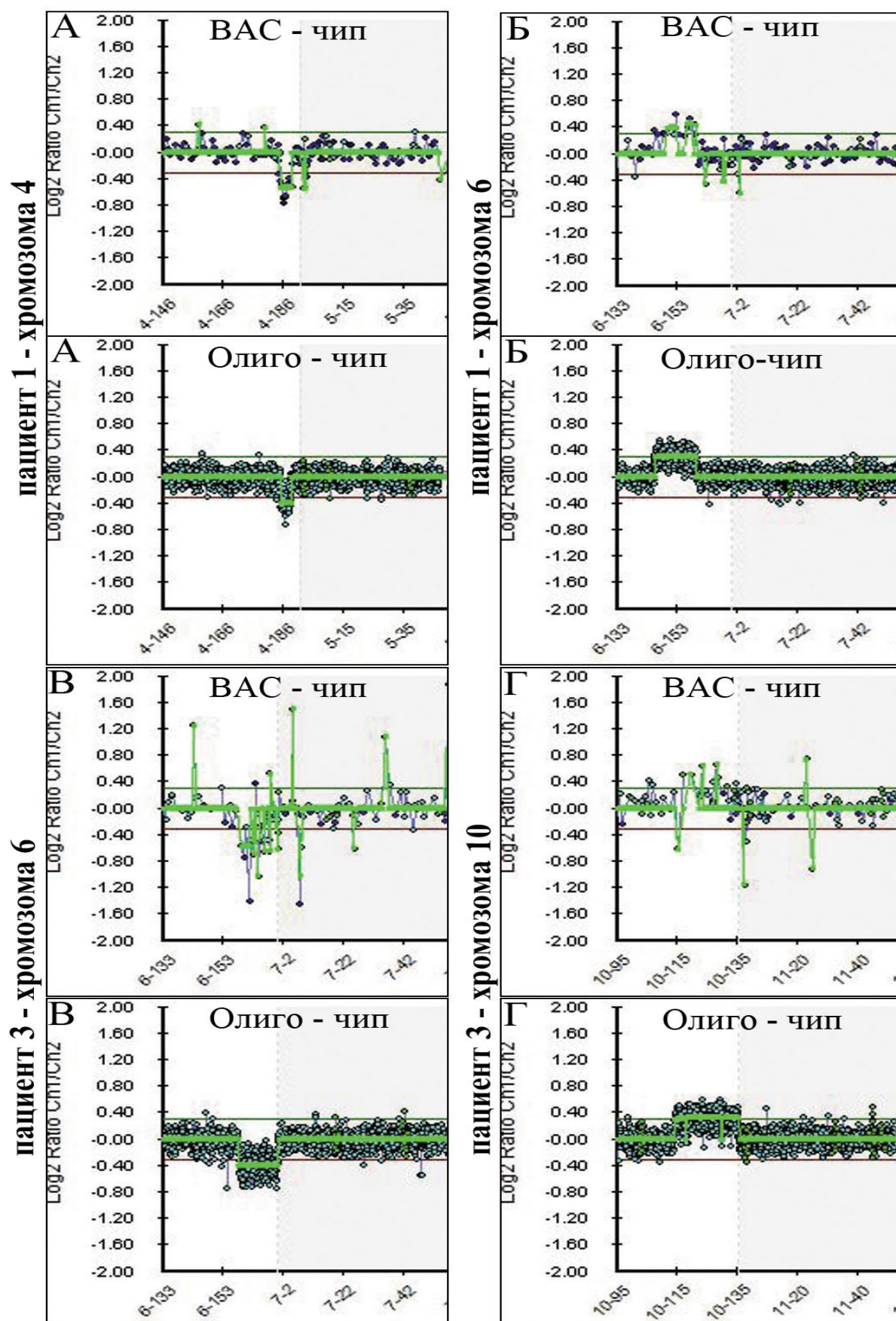
4. Анализ на диагностичните възможности на 2 различни микрочипови платформи - ВАС - чипове срещу олиго - микрочипове

ВАС - микрочиповете са сред първите геномни чипове, използвани за CNVs - скрининг [Pinkel et al., 1998] и се прилагат рутинно в практиката. Производството на ВАС - клонове за микрочипова СГХ е скъпо, времеемко и резолюцията на ВАС - микрочиповете е достигнала горната си граница, поради големия размер на ВАС - клоновете. Олиго-базираните чипове позволяват по-голяма флексибилност при дизайна на пробите, по-голямо покритие на генома и много по-висока резолюция [Brennan et al., 2004; Pollack et al., 1999]. Както отбелязват Ylstra B. и сътр. ако един ВАС - клон с размер 150 Kb се раздели на 60 bp (колкото е размерът на олиго-клоновете) се получават 2500 олиго - клона, съдържащи се в един ВАС - клон. Това теоретично би довело до 2500 пъти по-висока резолюция [Ylstra et al., 2006]. На практика тъй като при изработването на олиго - чиповете за избягване на крос-хибридизацията се подбират само уникални олигонуклеотиди от региони без високо-повторени участъци, се постига резолюция около 500 пъти по-висока в сравнение с ВАС - микрочиповете. Препокриването на ВАС - клоновете (tiling) може да подобри резолюцията им, но все пак остава доста под разрешителните възможности на олиго - чиповете. Данни от проучване на Ou et al. категорично сочат, че олиго - микрочиповете представляват добра алтернатива на ВАС - чиповете още повече, че не се налага прилагането на експеримент с размяна на флуорохромите [Ou et al., 2008]. При изследване на 42 пациента, тествани върху ВАС - и олиго - платформи се установява несъвпадение при 6 случая, при които ВАС - платформата не регистрира геномните дисбаланси [Ahn et al., 2010]. Данните на други автори [Wicker et al., 2007] от последователния анализ на 19 пациента с двата вида платформи показват по-висока откриваемост с олиго-платформата. С ВАС - анализ са открити 71 делеции и 74 амплификации, а с олиго-анализ 314 делеции и 209 амплификации със средна дължина от 12 Mb и 3,5 Mb съответно [Wicker et al., 2007]. Neill и сътр. при високо-резолютивния скрининг откриват по-голяма честота на CNVs с потенциално клинично значение с олиго платформата в сравнение с ВАС - платформата. Те анализират 3443 случая с ВАС - чипове и 3096 случая с олиго - чипове, при което установяват 17,6% CNVs с

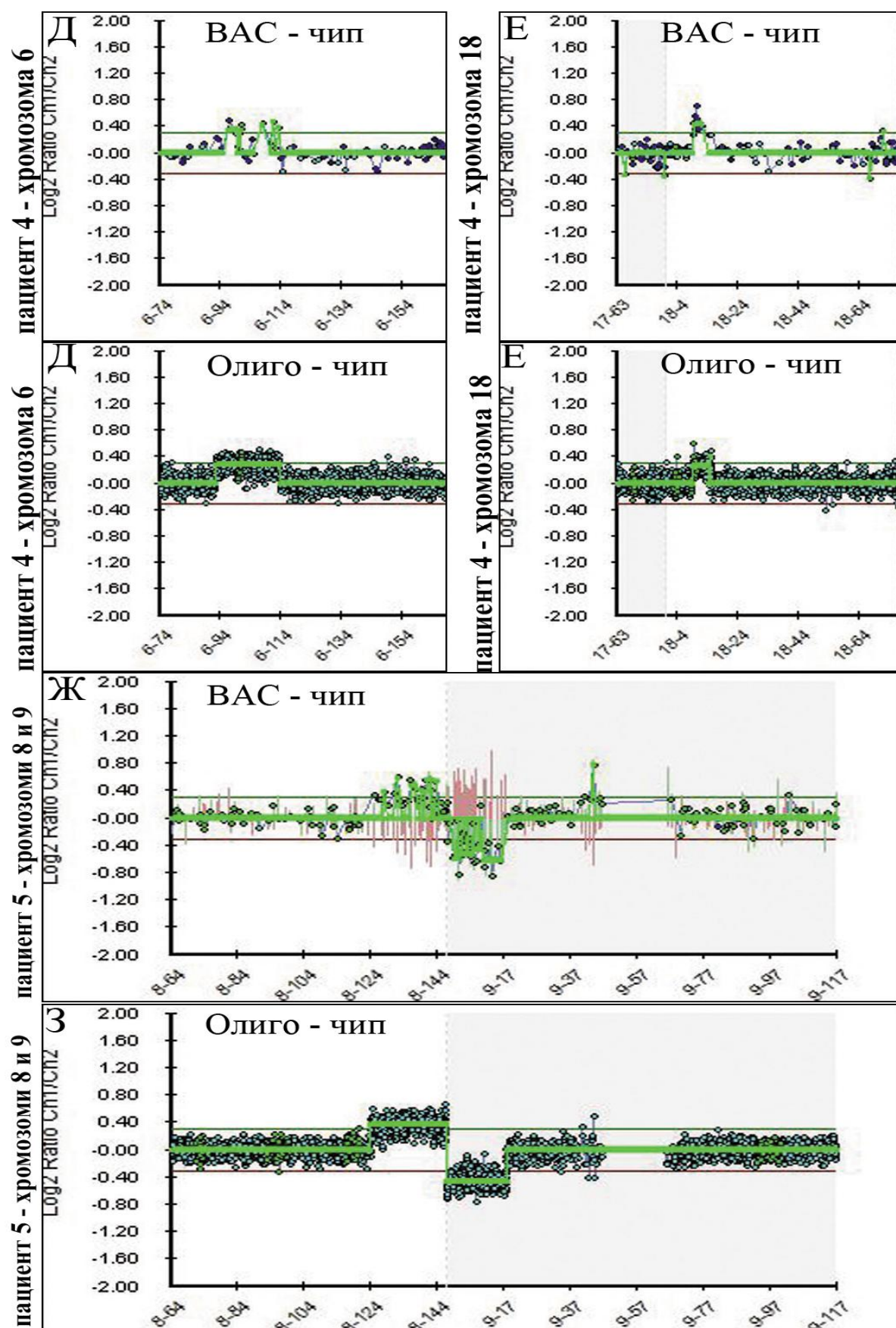
потенциално клинично значение от анализа с ВАС - платформата срещу 22,5% от олиго - анализа [Neill et al., 2010].

В нашето проучване 6 пациента са изследвани последователно с ВАС - 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 ВАС - 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. 12). Всички патологични региони са валидирани посредством FISH анализ със специфична ВАС - сонда. При Пациент 3 ВАС - 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 ВАС - 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 47 е показано сравнение на геномните профили на установените патологични CNVs между ВАС и олигочиповата платформа.

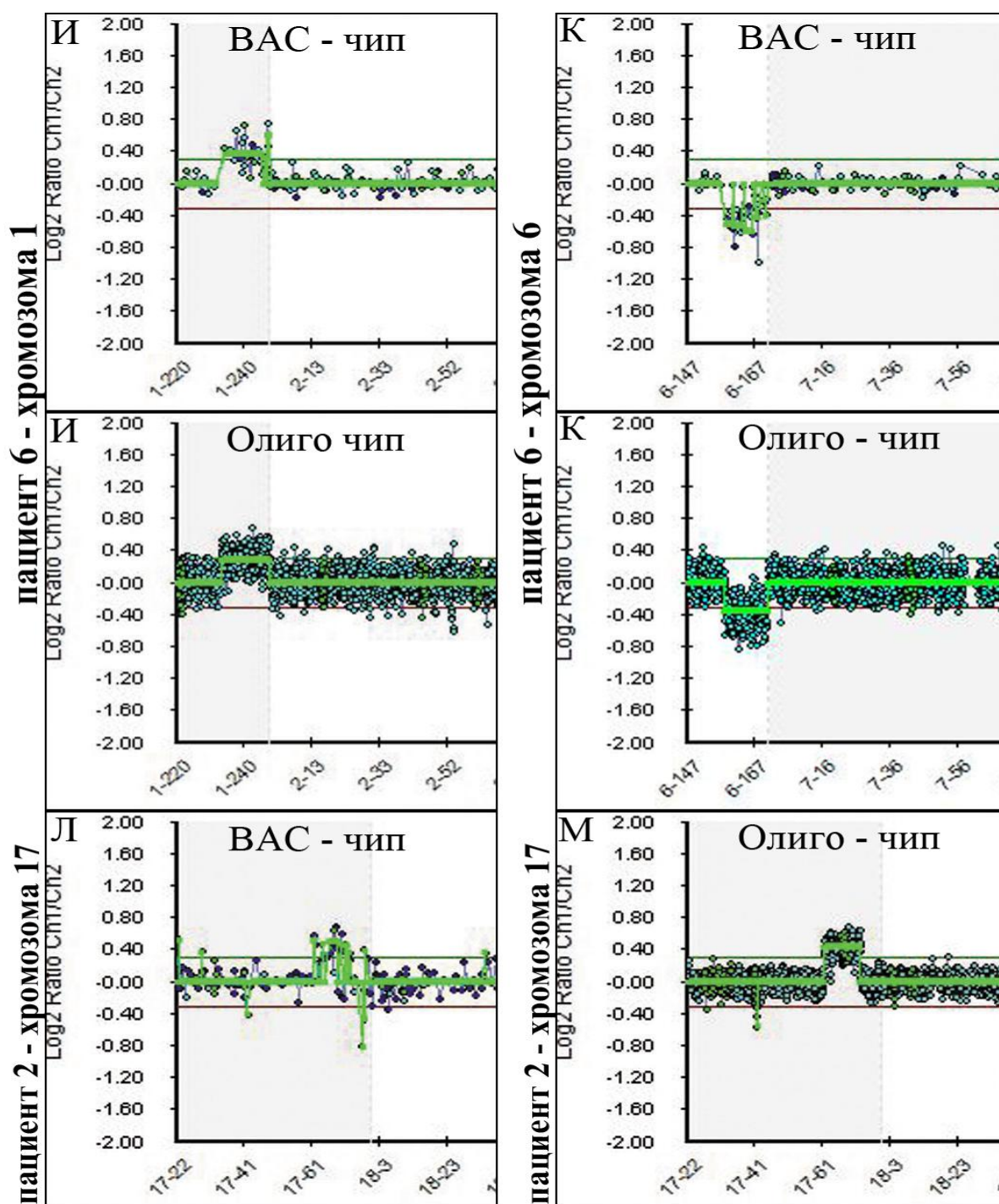
При всички случаи олигочиповата платформа показва по-висок процент на хибридизация, по-добро съотношение на интензитета на сигнала (SBR) спрямо фоновия шум, по-ясно определяне на стартовата и крайната позиция на засегнатите региони.



продължена



продължена



Фигура 47. 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 3: В) Геномен профил за патологичните варианти в 6-та от двата вида анализ; Г) Геномен профил за патологичния вариант в 10-та хромозома. Поради силният фон

шум и ниския процент на хибридизация ВАС чипът не регистрира дупликацията в 10 хромозома.

Пациент 4: Д) Геномен профил от ВАС - чипа за 6-та хромозома от двете платформи - силният фон шум доведе до погрешна интерпретация на размера на патологичните варианти; Е) 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: Ж) Геномен профил за патологичните варианти в 8 и 9 хромозома от ВАС анализа - фонният шум възпрепятства определянето на точния размер на установените патологични CNVs; 3) 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. И) Геномен профил на патологичните региони от ВАС и олиго - анализа на 1-ва хромозома; К) Геномен профил на патологичния регион в 6 хромозома от двата вида анализа.

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. Л) ВАС - чип; М) Олиго - чип.

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. Както отбелязват Ylstra и сътр. днес микрочиповите технологии вървят в посока на олиго - чиповете [Ylstra et al., 2006], макар че ВАС - чиповете все още ще намират приложение при метилационните проучвания [Ching et al., 2005].

В заключение 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. Преминаването към олиго - микрочипов анализ ще осигури по-голяма резолюция, позволяваща детекцията на по-малки геномни дисбаланси и ще подобри качеството на молекулярното кариотипиране за целите на клиничното му приложение.

VII. 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 ВАС - 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 ВАС - 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.

VIII. 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*, *CER112*, *CER170*, *SDCCAG8*, *AKT3*, *HNRPU* и хипоплазията на корпус калозум и микроцефалията; *DOCK8*, *KANK1*, *RASGEF1*, *PRKG2*, *STXBP5*, *PPP1R14C*, *PRKC*, *EXOC7*, *POUZF2*, *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 замени 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.

IX. 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.

Х. Приложения

Приложение 1. Информация за пациента.

МИКРОЧИПОВ ДНК АНАЛИЗ

*Офис на изследователския екип: София 1431, СБАЛАГ “Майчин Дом”, ет. 6,
Катедра по медицинска генетика, тел: 02 9520357
Лице за контакти:*

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПАЦИЕНТА

Това изследване има за цел да открие генетични фактори, свързани с причините за вродените малформации чрез прилагането на нова техника на микрочипов ДНК анализ (микрочипова СГХ). Ние се надяваме, че откриването на микроструктурни геномни изменения (малки промени в генетичния материал) ще подобри нашите познания за причините за вродените малформации и ще допринесе за развитието на по-добри профилактични стратегии. Генетичните изследвания се провеждат с венозна кръв, получена чрез венепункция от деца с малформации и родителите на дете с вродени малформации. Пробите от родителите са необходими с оглед да се интерпретират резултатите от микрочиповия анализ на детето. Трябва да се има предвид, че при разрешителните възможности на метода, сравняването на резултатите на родителите и детето може да докаже или отхвърли бащинство.

Ние ще оценим високо Вашето съгласие за участие и принос към проучването. Участието Ви ще включва попълването на кратък въпросник. Името Ви ще се запази в тайна. Веднага след вземането на кръвта, епруветките и въпросника, с който се провежда интервюто ще бъдат означени с кодов номер, така че няма да съдържат името Ви, инициали, или други данни, по които можете да бъдете идентифицирани. Кръвта ще служи за изолиране на ДНК (генетичния материал) и за култивиране.

Участниците в изследването вероятно няма да имат директна полза от него, но биха могли да имат полза, ако това изследване допринесе за откриването на причините за вродените малформации и развитието на по-добри профилактични стратегии в бъдеще.

Участието в този проект е напълно доброволно. Вие можете да се откажете по всяко време, без да посочвате някаква причина и без никакви последици за по-нататъшното лечение и проследяване на детето Ви. Ако искате да получите по-подробна писмена информация за проекта, или да дискутирате някои въпроси, можете да пишете до горния адрес.

Приложение 2. Информирано съгласие за пациента.

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ПАЦИЕНТА

Получих информацията за това изследване и имах възможност да дискутирам изследването с:

.....

Давам разрешение от името на детето ми:

.....

(име на лекаря)

.....

(месторабота)

за изследване на ДНК от венозна кръв, получена чрез венепункция за анализ с високорезолютивна микрочипова технология (агау CGH). Имах възможност да задам допълнителни въпроси и да дискутирам следните параграфи:

- | | | | |
|----|---|----|--------------------------|
| 1. | Осведомен/а съм, че ДНК- анализът има за цел да установи има ли генетична причина за малформацията на детето ми, която не може да бъде диагностицирана с използваните рутинни методи. | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| 2. | След верифициране на резултата в генетичната лаборатория, бих искал да науча резултата от генетичния анализ от клинично-генетичния екип. | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| 3. | Съгласен/а съм: | | |
| | • Да предоставя анонимни клинични и генетични данни, отнасящи се до детето ми за регистриране в база данни | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| | • Да предоставя снимки на детето ми | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| 4. | Прочетох приложението „Информация за пациента” | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |

Разбирам, че:

- Името на детето ми няма да бъде публикувано.
- Резултатите ще бъдат достъпни и използвани от лекари и учени.
- Всички снимки ще бъдат достъпни само за лекарите и учените, участващи в проекта.

- Проби от родителите могат да бъдат поискани с оглед да се интерпретират резултатите от микрочиповия анализ на детето. При разрешителните възможности на метода сравняването на резултатите на родителите и детето може да докаже или отхвърли бащинство. Имах възможността да дискутирам тези въпроси с лекуващия ми лекар.
- В някои случаи резултатът, който ще получа може да е с определен процент на вероятност.
- Наличните ДНК методи могат да се окажат неинформативни в моето семейство.
- Ако роднинските връзки, които съм заявил/а не са верни, могат да се появят грешки в интерпретацията на резултатите.
- В някои случаи взетият материал за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на материал.

Име на пациента/родителя:

Име на детето:

Подпис на пациента/родителя:

Подпис на лекаря:

.....

.....

Дата:

Дата:

Моля, подпишете две копия и запазете едното за Вас!

Приложение 3. Информирано съгласие за родителите.

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ПАЦИЕНТА

Получих информацията за това изследване и имах възможност да дискутирам изследването с:

.....

Давам разрешение на:

.....

(име на лекаря)

.....

(месторабота)

за изследване на ДНК от венозна кръв, получена чрез венепункция за анализ с високорезолютивна микрочипова технология (агау CGH). Имах възможност да задам допълнителни въпроси и да дискутирам следните параграфи:

- | | | | |
|----|--|----|--------------------------|
| 1. | Осведомен/а съм , че ДНК- анализът ще се проведе с оглед да се интерпретират резултатите от микрочиповия анализ на детето ми | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| 2. | След верифициране на резултата в генетичната лаборатория, бих искал да науча резултата от генетичния анализ от клинично-генетичния екип. | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| 3. | Съгласен/а съм: | | |
| | • Да предоставя анонимни клинични и генетични данни, отнасящи се до детето ми за регистриране в база данни | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| | • Да бъде фотографиран/а | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |
| 4. | Прочетох приложението „Информация за пациента” | ДА | ☐ |
| | | НЕ | ☐ |

Разбирам, че:

- Името ми няма да бъде публикувано.
- Резултатите ще бъдат достъпни и използвани от лекари и учени.
- Всички снимки ще бъдат достъпни само за лекарите и учените, участващи в проекта.

- При разрешителните възможности на метода сравняването на резултатите на родителите и детето може да докаже или отхвърли бащинство. Имах възможността да дискутирам тези въпроси с лекуващия ми лекар.
- В някои случаи резултатът, който ще получа може да е с определен процент на вероятност.
- Наличните ДНК методи могат да се окажат неинформативни в моето семейство.
- Ако роднинските връзки, които съм заявил/а не са верни, могат да се появят грешки в интерпретацията на резултатите.
- В някои случаи взетият материал за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на материал.

Име на пациента/родителя:

Подпис на пациента/родителя:

.....

Подпис на лекаря:

.....

Дата:

Дата:

Моля, подпишете две копия и запазете едното за Вас!

Приложение 4. Установени CNVs с нормален характер и неясно клинично значение (Таблица 14).

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
1	46,XX, add(4) (q35)	8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.76	8	39356625	39499782	143,157	0.06	7	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.40	15	19970717	20042699	71,983	0.01	4	100.00
2	46, XX, add(17) (q25)	2q37.3	2q37.3	с неясно кл. зн. ⁴	делеция	-0.67	2	242514623	242656003	141,38	0.10	7	100.00
		4q13.2	4q13.2	нормален	делеция	-1.24	4	69057765	69165843	108,079	0.29	5	100.00
		5p15.33	5p15.33	нормален	дупликация	0.57	5	826074	873446	47,372	0.00	3	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.77	6	32558700	32660112	101,413	0.17	5	100.00
		8p23.1	8p23.1	нормален	делеция	-0.33	8	7226931	7359070	132,139	0.01	5	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.39	8	39356625	39464607	107,982	0.05	6	100.00
		17q21.32	17q21.32	нормален	делеция	-0.56	17	41983437	42114095	130,658	0.08	3	100.00
		21p11.2	21p11.1	нормален	дупликация	0.50	21	9896657	10080686	184,029	0.07	9	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.43	X	702	32362	31,66	0.30	3	100.00
		Xq28	Xq28	с неясно кл. зн.	дупликация	0.47	X	148694302	148834729	140,428	0.06	5	100.00
3	46,XX	5q13.2	5q13.2	нормален	дупликация	0.65	5	70405686	70622745	217,059	0.04	3	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.63	15	18654240	19886366	1,232,126	0.17	32	100.00
4	46,XX, 18p+	1q21.1	1q21.1	нормален	делеция	-0.38	1	147203307	147551674	348,368	0.07	9	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.61	3	163997258	164077318	80,06	0.04	3	100.00
		5p15.33	5p15.33	нормален	дупликация	0.65	5	745881	826074	80,193	0.28	5	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.71	6	32595429	32633716	38,287	0.06	3	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.40	8	39356625	39499782	143,157	0.08	7	100.00

продължена

Х. Приложения

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
		10q11.21	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.59	10	45554747	46453421	898,674	0.14	6	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	дупликация	1.293	12	9528620	9613096	84,477	0.18	3	100.00
		15q13.3	15q13.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.40	15	30405652	30648889	243,237	0.03	5	100.00
		15q14	15q14	нормален	делеция	-0.40	15	32482488	32590673	108,185	0.09	6	100.00
		18p11.21	18p11.21	с неясно кл. зн.	дупликация	0.41	18	14738610	14821709	83,099	0.06	4	100.00
		21q22.3	21q22.3	с неясно кл. зн.	дупликация	0.28	21	45063532	45686633	623,101	0.08	28	100.00
		22q11.23	22q11.23	с неясно кл. зн.	делеция	-0.46	22	24079594	24204619	125,025	0.01	6	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-0.54	X	1104383	1182380	77,997	0.12	5	100.00
		Xq21.1	Xq21.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.51	X	79517947	79577719	59,772	0.07	3	100.00
		Xq21.2	Xq21.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.43	X	85656048	85706668	50,62	0.10	4	100.00
5	46,XY, der(9) inv(9) (p11q13) t(8;9) (q24.13;p 22.2)	5q13.2	5q13.2	нормален	дупликация	0.32	5	69741348	70422327	680,979	0.09	5	100.00
		10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.32	10	46371268	47017628	646,36	0.06	10	100.00
		14q11.1	14q11.1	нормален	делеция	-0.37	14	18537207	18798671	261,464	0.06	8	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.44	15	19305324	19338213	32,889	0.00	3	100.00
		16p11.2	16p11.2	нормален	дупликация	0.43	16	33373032	33517397	144,365	0.05	6	100.00
6	46,XX	6p21.33	6p21.33	нормален	дупликация	0.51	6	29962879	30062938	100,059	0.06	5	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.63	6	32595429	32660112	64,684	0.18	4	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.96	8	39356625	39499782	143,157	0.17	7	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.53	X	702	32362	31,66	0.30	3	100.00
7	46,XX	4q13.2	4q13.2	нормален	делеция	-0.96	4	69057765	69165843	108,079	0.12	5	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	делеция	-0.62	6	32595429	32660112	64,684	0.12	4	100.00

продължена

Х. Приложения

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
8		8p23.1	8p23.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.40	8	8466597	8598680	132,083	0.04	5	100.00
		10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.40	10	46371268	47017628	646,36	0.05	10	100.00
		14q11.1	14q11.2	нормален	делеция	-0.36	14	18671648	19484043	812,395	0.18	20	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.43	15	18741745	20042699	1,300,955	0.16	35	100.00
		16p11.2	16p11.2	нормален	делеция	-0.35	16	33433088	33561829	128,742	0.01	6	100.00
	46,XY	1p34.2	1p34.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.52	1	41867232	41957658	90,426	0.14	4	100.00
		1p31.1	1p31.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.55	1	74138750	74232868	94,118	0.00	4	100.00
		1p21.1	1p21.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.64	1	104012550	104109202	96,652	0.08	3	100.00
		1q43	1q43	с неясно кл. зн.	дупликация	0.53	1	238605509	238637631	32,122	0.01	3	100.00
		4q21.21	4q21.21	с неясно кл. зн.	делеция	-0.47	4	82048224	82431297	383,073	0.11	14	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.92	6	32595429	32660112	64,684	0.24	4	100.00
		9p11.2	9p11.2	нормален	делеция	-0.32	9	43626945	44167298	540,353	0.07	9	100.00
		10q11.22	10q11.22	нормален	делеция	-0.50	10	46111635	46404949	293,314	0.00	3	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	дупликация	1.213	12	9528620	9613096	84,477	0.13	3	100.00
		14q11.1	14q11.1	нормален	делеция	-0.56	14	18671648	18798671	127,023	0.08	4	100.00
		14q32.33	14q32.33	нормален	дупликация	0.46	14	105708239	105799291	91,052	0.07	5	100.00
		15q26.2	15q26.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.61	15	92584093	92629055	44,962	0.08	3	100.00
		Xp22.2	Xp22.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.47	X	16324585	16407169	82,584	0.03	3	100.00
		Xq21.1	Xq21.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.51	X	78102755	78145467	42,712	0.02	3	100.00
		Xq21.1	Xq21.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.42	X	83003077	83076049	72,972	0.05	4	100.00
		Xq23	Xq23	с неясно кл. зн.	дупликация	0.49	X	113037872	113109794	71,923	0.02	3	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
9	46,XX	2p11.2	2p11.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.40	2	90999034	91158299	159,265	0.04	5	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	делеция	-0.58	6	32595429	32633716	38,287	0.03	3	100.00
		8p23.1	8p23.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.45	8	7290622	7789967	499,345	0.13	8	100.00
		8p23.1	8p23.1	нормален	делеция	-0.53	8	12077361	12448404	371,043	0.07	4	100.00
		10q23.2	10q23.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.49	10	88988588	89148084	159,497	0.02	4	100.00
		14q11.1	14q11.2	нормален	делеция	-0.39	14	18624413	19323609	699,196	0.13	16	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.42	15	19934022	20010589	76,567	0.02	4	100.00
		16p13.11	16p13.11	с неясно кл. зн.	делеция	-0.49	16	14876379	15023878	147,499	0.08	5	100.00
10	46,XY	1q44	1q44	с неясно кл. зн.	дупликация	0.45	1	246911281	246951397	40,116	0.05	3	100.00
		5q21.2	5q21.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.65	5	103738159	103797970	59,811	0.07	3	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-1.20	8	39356625	39499782	143,157	0.09	7	100.00
		9p13.1	9p13.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.46	9	39062259	39167093	104,834	0.13	5	100.00
		9p11.1	9q12	pathogenic?	делеция	-0.43	9	47002212	66032256	19,030,044	0.00	3	100.00
		10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.41	10	46431620	46568524	136,905	0.06	7	100.00
		10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.50	10	48405290	48871555	466,265	0.05	3	100.00
		12p13.31	12p13.31	с неясно кл. зн.	дупликация	0.47	12	9510821	9613096	102,276	0.25	4	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.73	15	18683140	20199832	1,516,692	0.26	39	100.00
		16p11.2	16p11.2	нормален	дупликация	0.26	16	32004608	33280789	1,276,181	0.12	16	100.00
		21q21.2	21q21.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.52	21	23393557	23820079	426,522	0.12	13	100.00
		22q11.21	22q11.21	с неясно кл. зн.	дупликация	0.87	22	17041749	17193961	152,213	0.15	4	100.00
		22q11.21	22q11.21	с неясно кл. зн.	дупликация	1.03	22	18782655	18989577	206,922	0.22	3	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
		Yp11.31	Yp11.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.43	Y	3182881	3318491	135,61	0.00	3	100.00
11	46,XX	15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.54	15	19235423	19765882	530,459	0.07	12	100.00
12	46,XY, inv(9) (p11q13)	1q31.2	1q31.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.34	1	189564319	189725401	161,082	0.03	5	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.68	3	163997258	164101806	104,548	0.13	4	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.71	8	39356625	39499782	143,157	0.41	7	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	дупликация	1.292	12	9528620	9613096	84,477	0.44	3	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.89	15	18654240	20317022	1,662,782	0.24	45	100.00
		16p11.2	16p11.2	нормален	дупликация	0.35	16	33280789	33517397	236,608	0.17	10	100.00
		Yp11.2	Yp11.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.41	Y	5546360	5672471	126,111	0.02	5	100.00
13	46,XY	1q21.1	1q21.1	нормален	делеция	-0.46	1	146603245	147541755	938,511	0.11	11	100.00
		1q44	1q44	с неясно кл. зн.	делеция	-0.35	1	246794552	246875022	80,47	0.01	5	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.87	3	163997258	164077318	80,06	0.04	3	100.00
		5q13.2	5q13.2	нормален	дупликация	0.40	5	69462034	70622745	1,160,711	0.09	7	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	1.752	6	32595429	32689805	94,376	0.64	5	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-1.14	8	39356625	39499782	143,157	0.32	7	100.00
		10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.39	10	46111635	46516612	404,978	0.10	8	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	дупликация	1.085	12	9528620	9613096	84,477	0.19	3	100.00
		14q11.1	14q11.2	нормален	делеция	-0.28	14	18671648	19484043	812,395	0.13	20	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.45	15	18752161	20091146	1,338,985	0.14	36	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-0.62	X	702	32362	31,66	0.01	3	100.00
14	46,XY	15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.58	15	18654240	20091146	1,436,906	0.18	40	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
16	46,XX	8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.46	8	39356625	39464607	107,982	0.05	6	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.44	15	19833572	20091146	257,574	0.12	12	100.00
		17q11.1	17q11.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.50	17	22614509	22651139	36,63	0.00	3	100.00
17	46,XX	1q43	1q43	с неясно кл. зн.	делеция	-0.39	1	235389827	235500531	110,704	0.06	5	100.00
		2q31.3	2q31.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.52	2	181677112	181831483	154,371	0.10	5	100.00
		2q33.1	2q33.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.57	2	198366545	198441012	74,467	0.06	4	100.00
		11p14.1	11p14.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.55	11	29218172	29275741	57,569	0.04	3	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.44	15	18668327	19109154	440,827	0.09	10	100.00
		18p11.32	18p11.32	с неясно кл. зн.	делеция	-0.57	18	1616858	1674975	58,117	0.00	3	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.52	X	702	85790	85,088	0.54	4	100.00
		Xq13.3	Xq13.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.58	X	74149322	74223007	73,685	0.01	3	100.00
18	46,XX	14q11.1	14q11.1	нормален	делеция	-0.33	14	18624413	18883056	258,643	0.02	8	100.00
19	46,XX	1p36.13	1p36.13	нормален	дупликация	0.37	1	16763392	16921349	157,957	0.03	5	100.00
		4q13.2	4q13.2	нормален	делеция	-0.89	4	69114098	69165843	51,745	0.11	3	100.00
20	46,XX	Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.26	X	702	32362	31,66	0.22	3	100.00
21	46,XX	14q11.1	14q11.1	нормален	делеция	-0.53	14	18713241	18883056	169,815	0.02	5	100.00
22	46,XX	1p36.32	1p36.32	с неясно кл. зн.	дупликация	0.35	1	3597111	4483286	886,175	0.10	32	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	делеция	-0.56	3	163997258	164101806	104,548	0.04	4	100.00
		14q11.2	14q11.2	нормален	делеция	-0.49	14	19446078	19484043	37,965	0.00	3	100.00
		14q31.1	14q31.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.32	14	78816250	78897852	81,602	0.01	5	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.39	15	18741745	19879691	1,137,946	0.10	28	100.00

продължена

Х. Приложения

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
24	46,XX	8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.43	8	39356625	39499782	143,157	0.04	7	100.00
25	46,XY	10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	делеция	-0.55	10	46371268	46431620	60,352	0.01	3	100.00
		14q11.1	14q11.1	нормален	дупликация	0.40	14	18759326	18919621	160,295	0.01	5	100.00
26	46,XY	7p14.1	7p14.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.82	7	40082178	40127928	45,75	0.00	3	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.49	15	18654240	20091146	1,436,906	0.13	40	100.00
27	46,XY	5q13.2	5q13.2	нормален	дупликация	0.56	5	69741348	70422327	680,979	0.04	5	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.91	8	39356625	39428776	72,151	0.15	4	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-0.75	X	702	32362	31,66	0.00	3	100.00
28	46,XY	4q13.2	4q13.2	нормален	делеция	-1.04	4	69114098	69165843	51,746	0.13	3	100.00
30	46,XY	5q11.2	5q11.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.84	5	57253708	57313242	59,534	0.02	3	100.00
		8q12.1	8q12.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.73	8	57170422	57215396	44,974	0.05	3	100.00
31	46,XY	1q21.1	1q21.1	нормален	делеция	-0.41	1	143918723	144003084	84,361	0.02	5	100.00
		Yq12	Yq12	с неясно кл. зн.	дупликация	0.50	Y	57411762	57428316	16,554	0.01	5	100.00
33	46,XY	8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.58	8	39356625	39428776	72,151	0.07	4	100.00
34	46,XX	1q21.3	1q21.3	с неясно кл. зн.	делеция	-1.08	1	150805590	150852882	47,292	0.20	3	100.00
		2q32.1	2q32.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.52	2	187984396	188069980	85,584	0.10	5	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-0.51	X	2185439	2276701	91,262	0.02	5	100.00
35	46,XX	8p11.23	8p11.23	нормален	делеция	-0.60	8	39356625	39464607	107,982	0.08	6	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.30	15	18654240	19418630	764,39	0.10	23	100.00
38	46,XY	6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.68	6	32595429	32660112	64,683	0.09	4	100.00
		22q11.21	22q11.21	с неясно кл. зн.	дупликация	0.59	22	17119280	17274865	155,585	0.15	3	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.36	X	702	32362	31,66	0.15	3	100.00
39	46,XY	Xp22.13	Xp22.13	с неясно кл. зн.	дупликация	0.49	X	18073837	18174759	100,922	0.05	5	100.00
40	46,XY	2p11.2	2p11.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.53	2	89810743	89895596	84,853	0.08	5	100.00
		3q24	3q24	с неясно кл. зн.	дупликация	0.53	3	147769338	147899637	130,299	0.32	5	100.00
		12q24.33	12q24.33	с неясно кл. зн.	дупликация	0.92	12	128711311	128765683	54,372	0.03	3	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.43	X	702	85790	85,088	0.41	4	100.00
41	46,XX	1p21.3	1p21.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.47	1	97483627	97544604	60,977	0.00	3	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	делеция	-0.50	6	32558700	32660112	101,413	0.07	5	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.48	15	18752161	20060091	1,307,930	0.10	35	100.00
42	46,XX, t(13;18) (q13;q23)	3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.65	3	163997258	164077318	80,06	0.11	3	100.00
		6q14.1	6q14.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.79	6	79011239	79058574	47,335	0.12	3	100.00
		10q11.22	10q11.22	нормален	дупликация	0.34	10	47074854	47172564	97,71	0.02	6	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-0.40	X	702	85790	85,089	0.05	4	100.00
43	46,XX	4p15.1	4p15.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.55	4	33068748	33197179	128,431	0.05	5	100.00
		8p23.1	8p23.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.35	8	7040626	7729341	688,715	0.04	10	100.00
		8p23.1	8p23.1	нормален	делеция	-0.48	8	12077361	12285494	208,133	0.01	3	100.00
		9p11.2	9p11.2	нормален	делеция	-0.34	9	43340883	44120083	779,2	0.17	13	100.00
		11q25	11q25	с неясно кл. зн.	дупликация	0.35	11	133886872	134159982	273,11	0.05	10	100.00
		14q11.1	14q11.1	нормален	делеция	-0.42	14	18713241	18919621	206,38	0.05	6	100.00
		14q11.2	14q11.2	нормален	делеция	-0.59	14	19216393	19484043	267,65	0.20	10	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.55	15	19465389	19879691	414,302	0.12	8	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
44	46,XY	7q35	7q35	нормален	делеция	-0.55	7	143097036	143178810	81,774	0.03	3	100.00
		7q35	7q35	нормален	дупликация	0.55	7	143514987	143682183	167,196	0.08	4	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.64	8	39356625	39499782	143,157	0.08	7	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.41	15	18668327	20091146	1,422,819	0.14	39	100.00
		15q13.1	15q13.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.43	15	26884911	27599929	715,018	0.09	25	100.00
		15q13.1	15q13.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.40	15	27841845	28013509	171,664	0.02	8	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	дупликация	0.37	X	804831	1182380	377,549	0.16	17	100.00
		Xq11.1	Xq11.1	нормален	дупликация	0.58	X	62390103	62416426	26,323	0.05	3	100.00
45	46,XY	1p36.33	1p36.33	с неясно кл. зн.	дупликация	0.49	1	554298	639611	85,313	0.01	3	100.00
		1q21.3	1q21.3	с неясно кл. зн.	делеция	-1.64	1	150839784	150885960	46,176	0.65	3	100.00
		1q31.3	1q31.3	с неясно кл. зн.	дупликация	0.62	1	195065896	195149992	84,096	0.14	4	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.96	6	32605330	32660112	54,783	0.29	3	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.37	8	39356625	39449654	93,029	0.01	5	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	делеция	-0.67	12	9528620	9613096	84,477	0.00	3	100.00
		12p11.21	12p11.21	нормален	дупликация	0.47	12	31226559	31284261	57,702	0.00	3	100.00
		14q11.2	14q11.2	нормален	делеция	-0.58	14	19216393	19484043	267,65	0.13	10	100.00
		14q13.2	14q13.2	с неясно кл. зн.	дупликация	0.51	14	34386436	34474070	87,634	0.02	4	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.38	15	18450592	19805990	1,355,398	0.16	29	100.00
		16p11.2	16p11.2	нормален	дупликация	0.46	16	33280789	33316670	35,881	0.00	3	100.00
		19q13.31	19q13.31	нормален	дупликация	0.37	19	47952719	48205993	253,274	0.04	9	100.00
46	46,XX	2p11.2	2p11.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.62	2	90999034	91323509	324,475	0.15	10	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
47	46,XX	2q37.3	2q37.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.71	2	242514623	242690008	175,385	0.12	8	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	делеция	-1.41	3	163997258	164101806	104,548	0.30	4	100.00
		2q24.3	2q24.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.44	2	165204033	165325753	121,72	0.02	5	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.55	3	163997258	164101806	104,548	0.04	4	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.43	15	19786685	20060091	273,406	0.14	13	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.35	15	20199832	20851704	651,872	0.10	27	100.00
48	46,XX	Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-0.97	X	702	85790	85,089	0.25	4	100.00
		1q31.3	1q31.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.52	1	192637377	192739233	101,856	0.04	4	100.00
		1q31.3	1q31.3	нормален	делеция	-0.73	1	195011374	195104237	92,863	0.21	4	100.00
		2q37.3	2q37.3	с неясно кл. зн.	делеция	-0.46	2	242535089	242624628	89,539	0.14	5	100.00
		3q26.1	3q26.1	с неясно кл. зн.	делеция	-1.17	3	163966062	164101806	135,744	0.30	5	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	0.82	6	32595429	32660112	64,684	0.25	4	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	дупликация	0.92	12	9528620	9613096	84,477	0.12	3	100.00
		22q11.21	22q11.21	с неясно кл. зн.	делеция	-0.71	22	17041749	17193961	152,213	0.15	4	100.00
49	46,XY	22q11.23	22q12.1	с неясно кл. зн.	дупликация	0.37	22	24204619	24322697	118,078	0.00	5	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.71	3	163997258	164077318	80,06	0.00	3	100.00
		6p21.32	6p21.32	нормален	дупликация	1.302	6	32595429	32660112	64,684	0.05	4	100.00
50	46,XY	15q11.2	15q11.2	нормален	делеция	-0.35	15	18654240	20060091	1,405,851	0.15	39	100.00
		3q26.1	3q26.1	нормален	дупликация	0.87	3	163997258	164101806	104,548	0.09	4	100.00
		5p15.33	5p15.33	нормален	делеция	-0.46	5	812199	848774	36,575	0.00	3	100.00
50	46,XY	7q31.1	7q31.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.79	7	110818240	110854002	35,762	0.02	3	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в bp		Размер в (bp)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.62	8	39356625	39499782	143,157	0.11	7	100.00
		10q11.22	10q11.22	с неясно кл. зн.	дупликация	0.62	10	48405290	48932383	527,093	0.13	4	100.00
		12p13.31	12p13.31	с неясно кл. зн.	дупликация	0.34	12	7894711	8009274	114,563	0.04	6	100.00
		12p13.31	12p13.31	нормален	дупликация	1.348	12	9528620	9613096	84,477	0.44	3	100.00
		14q11.2	14q11.2	нормален	делеция	-0.40	14	19414742	19484043	69,301	0.04	4	100.00
		15q11.2	15q11.2	нормален	дупликация	0.36	15	18654240	19886366	1,232,126	0.16	32	100.00
		15q14	15q14	нормален	делеция	-0.63	15	32511505	32572345	60,84	0.13	4	100.00
51	46,XX	2p11.2	2p11.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.39	2	87260253	87926491	666,238	0.13	19	100.00
		5q13.2	5q13.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.53	5	69741348	70698824	957,476	0.20	8	100.00
		6q14.1	6q14.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.88	6	79011239	79102008	90,769	0.21	4	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.42	8	39356625	39464607	107,982	0.04	6	100.00
		13q22.1	13q22.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.59	13	73725761	73784340	58,579	0.04	3	100.00
		16p13.11	16p13.11	нормален	делеция	-0.41	16	14956207	15023878	67,671	0.03	4	100.00
		Xp22.33	Xp22.33	с неясно кл. зн.	делеция	-1.28	X	702	32362	31,66	0.33	3	100.00
52	46,XY	1p36.13	1p36.13	нормален	делеция	-0.34	1	16884708	17124582	239,875	0.02	8	100.00
		4p13	4p13	с неясно кл. зн.	делеция	-0.40	4	41636172	41735717	99,545	0.02	5	100.00
		7q35	7q35	нормален	дупликация	0.78	7	143582894	143682183	99,289	0.15	3	100.00
		8p11.23	8p11.23	нормален	дупликация	0.56	8	39356625	39402463	45,838	0.00	3	100.00
		8q24.23	8q24.23	нормален	делеция	-0.62	8	137762448	137919338	156,89	0.07	5	100.00
		15q24.1	15q24.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.49	15	71841810	71969869	128,059	0.07	5	100.00
		Xq21.1	Xq21.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.58	X	82986582	83049919	63,337	0.08	4	100.00

продължена

Па- циент №	Карио- тип	Цитолента		Вариант	Тип на аберацията	Log ₂ ¹	Хро- мозо ма	Позиция в бр		Размер в (бр)	SD ²	Бр. вкл. кло- нове	% на хибр. ³
		Начало	Край					Начало	Край				
		Xq21.31	Xq21.31	с неясно кл. зн.	делеция	-0.48	X	91502057	91587810	85,753	0.01	4	100.00
		Xq22.1	Xq22.1	с неясно кл. зн.	делеция	-0.69	X	99812937	99860375	47,438	0.09	3	100.00
		Yp11.31	Yp11.2	с неясно кл. зн.	делеция	-0.61	Y	3162415	3379792	217,377	0.03	5	100.00

¹ Log₂ – двоичен логаритъм от флуоресцентното съотношение Cy3/Cy5; ² SD – стандартно отклонение; ³ % на хибр – процент на хибридизация; ⁴ с неясно кл. зн. – с неясно клинично значение

XI. Литературни източници

1. Димитрова, В., Марков, Д., Чернев, Т. Правила за оценка на носната кост на плода между 11-14 гестационна седмица. - Бълг. спис. ултразвук акуш. гинекол. 2, 2009, 12-16.
2. Калайджиева, М., Праматарова, Т., Вакрилова, Л. Честота и структура на вродените аномалии в ДУП "Майчин дом, София за периода " 1992-1996 година. - Акушерство и гинекология. 37, 1998, 15-18.
3. Калайджиева, М., А. Попиванова & Е. Дойчева. Клинико-епидемиологично проучване на дефектите на невралната тръба при новородени деца. - Акушерство и гинекология. 39, 2000, 16-19.
4. Симеонов, Е. Ранна диагноза и профилактика на вродени аномалии. Докторска дисертация (автореферат). 1995.
5. Ковачева, К. (2009). Диагностични, профилактични и епидемиологични аспекти на регистрацията на вродените аномалии. Дисертация, Плевен.
6. Мумджиев, Х., Петрова, Н., Добрева, А. Честота и форми на вродените аномалии в Старозагорски регион за тригодишен период. - Педиатрия. 33, 1994, 12-15.
7. Симеонов, Е. Г. Проблеми на клиничната дисморфология в педиатрията. Научен обзор, София, Медицинска академия. Център за научна информация по медицина и здравеопазване, 1989.
8. Симеонов, Е., Бояджиев, С. Регистрация на вродените аномалии при новородени деца. - Педиатрия. 30(4), 1991, 13-20.
9. Симеонов, Е., Бояджиев, С. Диагноза и профилактика на дисморфичните синдроми. - Педиатрия. 32, 1993, 10-16.
10. Тинчева, Р., М. Малинова & Д. Захариев. Летална форма на артрогрипоза у новородено- Рена- Shokeir type I синдром. - Педиатрия. 1, 2006, 41-43.
11. Тончева, Д., С. Лалчев, Г. Ефремов, В. Баранов, В. Горбунова, И. Кременски, Т. Иващенко, Т. Кузнецова & Т. Кашеева. Медицинска генетика, , София, Сиела, 1999.
12. Abyzov, A., A. E. Urban, M. Snyder & M. Gerstein. CNVnator: An approach to discover, genotype and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. - Genome Res. 2011.
13. Affymetrix www.affymetrix.com.
14. Ahn, J. W., K. Mann, S. Walsh, M. Shehab, S. Hoang, Z. Docherty, S. Mohammed & C. Mackie Ogilvie. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. - Mol Cytogenet. 3, 2010, 9.
15. Aitman, T. J., R. Dong, T. J. Vyse, P. J. Norsworthy, M. D. Johnson, J. Smith, et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. - Nature. 439(7078), 2006, 851-855.
16. Alaerts, M.J. Del-Favero. Searching genetic risk factors for schizophrenia and bipolar disorder: learn from the past and back to the future. - Hum Mutat. 30(8), 2009, 1139-1152.

17. Aldred, P. M., E. J. Hollox & J. A. Armour. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. - *Hum Mol Genet.* 14(14), 2005, 2045-2052.
18. Alfarawati, S., E. Fragouli, P. Colls & D. Wells. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. - *Hum Reprod.* 2011.
19. Alfi, O., G. N. Donnell, B. F. Crandall, A. Derencsenyi & R. Menon. Deletion of the short arm of chromosome no.9 (46,9p-): a new deletion syndrome. - *Ann Genet.* 16(1), 1973, 17-22.
20. Arriola, E., M. B. Lambros, C. Jones, T. Dexter, A. Mackay, D. S. Tan, et al. Evaluation of Phi29-based whole-genome amplification for microarray-based comparative genomic hybridisation. - *Lab Invest.* 87(1), 2007, 75-83.
21. Astbury, C., L. A. Christ, D. J. Aughton, S. B. Cassidy, A. Kumar, E. E. Eichler & S. Schwartz. Detection of deletions in de novo "balanced" chromosome rearrangements: further evidence for their role in phenotypic abnormalities. - *Genet Med.* 6(2), 2004, 81-89.
22. Atanasoski, S., S. S. Toldo, U. Malipiero, E. Schreiber, R. Fries & A. Fontana. Isolation of the human genomic brain-2/N-Oct 3 gene (POUF3) and assignment to chromosome 6q16. - *Genomics.* 26(2), 1995, 272-280.
23. Aviel-Ronen, S., C. Qi Zhu, B. P. Coe, N. Liu, S. K. Watson, W. L. Lam & M. S. Tsao. Large fragment Bst DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. - *BMC Genomics.* 7, 2006, 312.
24. Ballif, B. C., S. A. Hornor, E. Jenkins, S. Madan-Khetarpal, U. Surti, K. E. Jackson, et al. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. - *Nat Genet.* 39(9), 2007, 1071-1073.
25. Ballif, B. C., E. A. Rorem, K. Sundin, M. Lincicum, S. Gaskin, J. Coppinger, C. D. Kashork, L. G. Shaffer & B. A. Bejjani. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. - *Am J Med Genet A.* 140(24), 2006, 2757-2767.
26. Baptista, J., C. Mercer, E. Prigmore, S. M. Gribble, N. P. Carter, V. Maloney, N. S. Thomas, P. A. Jacobs & J. A. Crolla. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. - *Am J Hum Genet.* 82(4), 2008, 927-936.
27. Bar-Shira, A., G. Rosner, S. Rosner, M. Goldstein & A. Orr-Urtreger. Array-based comparative genome hybridization in clinical genetics. - *Pediatr Res.* 60(3), 2006, 353-358.
28. Barber, J. C., V. K. Maloney, S. Huang, D. J. Bunyan, L. Cresswell, E. Kinning, et al. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. - *Eur J Hum Genet.* 16(1), 2008, 18-27.
29. Barlow, A. L. M. A. Hulten. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. - *Chromosome Res.* 4(8), 1996, 562-573.
30. Barrett, M. T., A. Scheffer, A. Ben-Dor, N. Sampas, D. Lipson, R. Kincaid, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. - *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(51), 2004, 17765-17770.
31. Bauld, R., G. R. Sutherland & A. D. Bain. Chromosome studies in investigation of stillbirths and neonatal deaths. - *Arch Dis Child.* 49(10), 1974, 782-788.

32. Beckmann, J. S., X. Estivill & S. E. Antonarakis. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. - *Nat Rev Genet.* 8(8), 2007, 639-646.
33. Belligni, E. F., E. Biamino, C. Molinatto, J. Messa, M. Pierluigi, F. Faravelli, O. Zuffardi, G. B. Ferrero & M. C. Silengo. Subtelomeric FISH analysis in 76 patients with syndromic developmental delay/intellectual disability. - *Riv Ital Pediatr.* 35(1), 2009, 9.
34. Bernheim, A., R. Berger, G. Vaugier, J. C. Thieffry & Y. Matet. Partial trisomy 6p. - *Hum Genet.* 48(1), 1979, 13-16.
35. Bhatti, A., K. Lee, M. L. McDonald, M. J. Hassan, R. Gutala, M. Ansar, W. Ahmad & S. M. Leal. Mapping of a new autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB45) to chromosome 1q43-q44. - *Clin Genet.* 73(4), 2008, 395-398.
36. Birnbaum, S. G., P. X. Yuan, M. Wang, S. Vijayraghavan, A. K. Bloom, D. J. Davis, et al. Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory. - *Science.* 306(5697), 2004, 882-884.
37. Blouin, J. L., D. H. Christie, A. Gos, A. Lynn, M. A. Morris, D. H. Ledbetter, A. Chakravarti & S. E. Antonarakis. A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. - *Am J Hum Genet.* 57(2), 1995, 388-394.
38. Bond, J., E. Roberts, K. Springell, S. B. Lizaraga, S. Scott, J. Higgins, et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. - *Nat Genet.* 37(4), 2005, 353-355.
39. Bonnet, C., J. Andrieux, M. Beri-Dexheimer, B. Leheup, O. Boute, S. Manouvrier, et al. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. - *J Med Genet.* 47(6), 2010, 377-384.
40. Branzei, D.M. Foiani. Template switching: from replication fork repair to genome rearrangements. - *Cell.* 131(7), 2007, 1228-1230.
41. Brennan, C., Y. Zhang, C. Leo, B. Feng, C. Cauwels, A. J. Aguirre, M. Kim, A. Protopopov & L. Chin. High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. - *Cancer Res.* 64(14), 2004, 4744-4748.
42. Brothman, A. R., N. R. Schneider, I. Saikevych, L. D. Cooley, M. G. Butler, S. Patil, et al. Cytogenetic heteromorphisms: survey results and reporting practices of giemsa-band regions that we have pondered for years. - *Arch Pathol Lab Med.* 130(7), 2006, 947-949.
43. Brown, W. R., P. J. MacKinnon, A. Villasante, N. Spurr, V. J. Buckle & M. J. Dobson. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. - *Cell.* 63(1), 1990, 119-132.
44. Brunetti-Pierri, N., D. K. Grange, Z. Ou, D. A. Peiffer, S. K. Peacock, M. L. Cooper, et al. Characterization of de novo microdeletions involving 17q11.2q12 identified through chromosomal comparative genomic hybridization. - *Clin Genet.* 72(5), 2007, 411-419.
45. Bunney, W. E., B. G. Bunney, M. P. Vawter, H. Tomita, J. Li, S. J. Evans, et al. Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. - *Am J Psychiatry.* 160(4), 2003, 657-666.
46. Burton, B. K.K. Praveen. Dysmorphology, In "Congenital malformation", 2007. 3-11.
47. Buysse, K., B. Delle Chiaie, R. Van Coster, B. Loeys, A. De Paepe, G. Mortier, F. Speleman & B. Menten. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular

- karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. - Eur J Med Genet. 52(6), 2009, 398-403.
48. CAC <http://www.som.soton.ac.uk/research/geneticsdiv/Anomaly%20Register/>.
49. CAD <http://www.ukcad.org.uk/cocoon/ukcad/>.
50. Caine, A., D. M. Knapton, R. F. Mueller, P. J. Congdon & D. Haigh. Duplication of distal 17q from a maternal translocation: an additional case with some unique features. - J Med Genet. 26(9), 1989, 577-579.
51. Caliebe, A., S. Waltz & J. Jenderny. Mild phenotypic manifestations of terminal deletion of the long arm of chromosome 4: clinical description of a new patient. - Clin Genet. 52(2), 1997, 116-119.
52. Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. - Proc Natl Acad Sci U S A. 99(24), 2002, 15524-15529.
53. Calin, G. A., C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. - Proc Natl Acad Sci U S A. 101(9), 2004, 2999-3004.
54. Campbell, C. D., N. Sampas, A. Tsalenko, P. H. Sudmant, J. M. Kidd, M. Malig, et al. Population-genetic properties of differentiated human copy-number polymorphisms. - Am J Hum Genet. 88(3), 2011, 317-332.
55. Carter, N. P. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. - Nat Genet. 39(7 Suppl), 2007, S16-21.
56. Caspersson, T., S. Farber, G. E. Foley, J. Kudynowski, E. J. Modest, E. Simonsson, U. Wagh & L. Zech. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. - Exp Cell Res. 49(1), 1968, 219-222.
57. Caspersson, T., L. Zech & C. Johansson. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. - Exp Cell Res. 60(3), 1970, 315-319.
58. Castillo, T. C. Services for the care of prevention of birth defects. Reduced report of a World Health Organization and March of Dimes Foundation meeting. - Rev Meed Chil. 135, 2007, 806-813.
59. CDC www.cdc.gov/ncbddd/bd/monitoring.htm.
60. Chabchoub, E., J. R. Vermeesch, T. de Ravel, P. de Cock & J. P. Fryns. The facial dysmorphism in the newly recognised microdeletion 2p15-p16.1 refined to a 570 kb region in 2p15. - J Med Genet. 45(3), 2008, 189-192.
61. Chelly, J., M. Khelifaoui, F. Francis, B. Cherif & T. Bienvenu. Genetics and pathophysiology of mental retardation. - Eur J Hum Genet. 14(6), 2006, 701-713.
62. Chen, C. P., S. P. Lin, C. C. Lee, D. D. Town & W. Wang. Partial trisomy 1p (1p36.22-->pter) and partial monosomy 9p (9p22.2-->pter) associated with achalasia, flexion deformity of the fingers and epilepsy in a girl. - Genet Couns. 17(3), 2006, 301-306.
63. Chen, H., S. J. Libertini, M. George, S. Dandekar, C. G. Tepper, B. Al-Bataina, H. J. Kung, P. M. Ghosh & M. Mudryj. Genome-wide analysis of androgen receptor binding and gene regulation in two CWR22-derived prostate cancer cell lines. - Endocr Relat Cancer. 17(4), 2010, 857-873.
64. Chen, J. M., P. D. Stenson, D. N. Cooper & C. Ferec. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. - Hum Genet. 117(5), 2005, 411-427.

65. Cheung, S. W., C. A. Shaw, D. A. Scott, A. Patel, T. Sahoo, C. A. Bacino, et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. - *Am J Med Genet A*. 143A(15), 2007, 1679-1686.
66. Cheung, S. W., C. A. Shaw, W. Yu, J. Li, Z. Ou, A. Patel, et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. - *Genet Med*. 7(6), 2005, 422-432.
67. Cheung, V. G., M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati & G. Childs. Making and reading microarrays. - *Nat Genet*. 21(1 Suppl), 1999, 15-19.
68. Chia, N., L. Bousfield, C. Poon & B. Trudinger. Trisomy (1q)(q42----qter): confirmation of a syndrome. - *Clin Genet*. 34(4), 1998, 224-229.
69. Chikuda, H., F. Kugimiya, K. Hoshi, T. Ikeda, T. Ogasawara, T. Shimoaka, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. - *Genes Dev*. 18(19), 2004, 2418-2429.
70. Ching, T. T., A. K. Maunakea, P. Jun, C. Hong, G. Zardo, D. Pinkel, et al. Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3. - *Nat Genet*. 37(6), 2005, 645-651.
71. Christ, L. A., C. A. Crowe, M. A. Micale, J. M. Conroy & S. Schwartz. Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. - *Am J Hum Genet*. 65(5), 1999, 1387-1395.
72. Ciccone, R., R. Giorda, G. Gregato, R. Guerrini, S. Giglio, R. Carrozzo, et al. Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists? - *Hum Genet*. 117(6), 2005, 571-582.
73. Clark, C. E., H. R. Cowell, M. A. Telfer & P. A. Casey. Trisomy 6q25 leads to 6qter in two sisters resulting from maternal 6;11 translocation. - *Am J Med Genet*. 5(2), 1980, 171-178.
74. CNVProject <http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/help/>.
75. Cohen, J. Genomics. DNA duplications and deletions help determine health. - *Science*. 317(5843), 2007, 1315-1317.
76. Cohen, M. The child with multiple birth defects New York, Raven Press, 1982.
77. Concolino, D., R. Cinti, L. Ferraro, M. T. Moricca & P. Strisciuglio. Partial trisomy 1(q42->qter): a new case with a mild phenotype. - *J Med Genet*. 35(1), 1998, 75-77.
78. Conrad, D. F., T. D. Andrews, N. P. Carter, M. E. Hurles & J. K. Pritchard. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. - *Nat Genet*. 38(1), 2006, 75-81.
79. Cooper, G. M., D. A. Nickerson & E. E. Eichler. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. - *Nat Genet*. 39(7 Suppl), 2007, S22-29.
80. Cooper, G. M., T. Zerr, J. M. Kidd, E. E. Eichler & D. A. Nickerson. Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide SNP genotyping. - *Nat Genet*. 40(10), 2008, 1199-1203.
81. Coppinger, J., S. Alliman, A. N. Lamb, B. S. Torchia, B. A. Bejjani & L. G. Shaffer. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. - *Prenat Diagn*. 29(12), 2009, 1156-1166.
82. Costa, C. M., S. G. da Gama & C. Leal Mdo. Congenital malformations in Rio de Janeiro, Brazil: prevalence and associated factors. - *Cad Saude Publica*. 22(11), 2006, 2423-2431.

83. Craddock, N. & M. E. Hurles & N. Cardin & R. D. Pearson & V. Plagnol & S. Robson, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. - *Nature*. 464(7289), 2010, 713-720.
84. Craig-Holmes, A. P.M. W. Shaw. Polymorphism of human constitutive heterochromatin. - *Science*. 174(10), 1971, 702-704.
85. Cunniff, C., S. J. Hassed, A. E. Hendon & V. I. Rickert. Health care utilization and perceptions of health among adolescents and adults with Turner syndrome. - *Clin Genet*. 48(1), 1995, 17-22.
86. Czeizel, A. Prevention of developmental abnormalities with particular emphasis of primary prevention. - *Tsitologija i Genetika*. 36, 2002, 56-71.
87. Czeizel, A.K. Sankaranarayanan. The load of genetic and partially genetic disorders in man. I. Congenital anomalies: estimates of detriment in terms of years of life lost and years of impaired life. - *Mutat Res*. 128(1), 1984, 73-103.
88. Czeizel, A. E. Birth defects are preventable. - *Int J Med Sci*. 2(3), 2005, 91-92.
89. Czeizel, A. E., Z. Intody & B. Modell. What proportion of congenital abnormalities can be prevented? - *BMJ*. 306(6876), 1993, 499-503.
90. D'Amours, G., Z. Kibar, G. Mathonnet, R. Fetni, F. Tihi, V. Desilets, S. Nizard, J. L. Michaud & E. Lemyre. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. - *Clin Genet*. 2011.
91. Davies, J. J., I. M. Wilson & W. L. Lam. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. - *Chromosome Res*. 13(3), 2005, 237-248.
92. De Gregori, M., R. Ciccone, P. Magini, T. Pramparo, S. Gimelli, J. Messa, et al. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. - *J Med Genet*. 44(12), 2007, 750-762.
93. de Quervain, D. J.A. Papassotiropoulos. Identification of a genetic cluster influencing memory performance and hippocampal activity in humans. - *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(11), 2006, 4270-4274.
94. de Ravel, T. J., K. Devriendt, J. P. Fryns & J. R. Vermeesch. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). - *Eur J Pediatr*. 166(7), 2007, 637-643.
95. de Smith, A. J., A. Tsalenko, N. Sampas, A. Scheffer, N. A. Yamada, P. Tsang, et al. Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. - *Hum Mol Genet*. 16(23), 2007, 2783-2794.
96. de Vries, B. B., R. Pfundt, M. Leisink, D. A. Koolen, L. E. Vissers, I. M. Janssen, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. - *Am J Hum Genet*. 77(4), 2005, 606-616.
97. DECHIPER <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>.
98. DGV <http://projects.tcag.ca/variation/>.
99. Dhami, P., A. J. Coffey, S. Abbs, J. R. Vermeesch, J. P. Dumanski, K. J. Woodward, R. M. Andrews, C. Langford & D. Vetrie. Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. - *Am J Hum Genet*. 76(5), 2005, 750-762.
100. Diaz, E.G. A. Barisone. DNA microarrays: sample quality control, array hybridization and scanning. - *J Vis Exp*.(49), 2011.

101. Dimova, I., R. Vazharova, D. Nikolova, R. Tincheva, D. Nesheva & D. Toncheva. Whole genome analysis by array-based comparative genomic hybridization in patients with congenital malformations. - BJMG. 11(1), 2008, 33-40.
102. Dolk, H., B. Armstrong, K. Lachowycz, M. Vrijheid, J. Rankin, L. Abramsky, P. A. Boyd & D. Wellesley. Ambient air pollution and risk of congenital anomalies in England, 1991-1999. - Occup Environ Med. 67(4), 2010, 223-227.
103. Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer & J. M. Trent. Expression profiling using cDNA microarrays. - Nat Genet. 21(1 Suppl), 1999, 10-14.
104. Dupont, J. M., L. Cuisset, M. Cartigny, D. Le Tessier, C. Vasseur, D. Rabineau & M. Jeanpierre. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. - Am J Med Genet. 111(4), 2002, 405-408.
105. Easton, R. M., H. Cho, K. Roovers, D. W. Shineman, M. Mizrahi, M. S. Forman, et al. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. - Mol Cell Biol. 25(5), 2005, 1869-1878.
106. Eberle, M. A., P. C. Ng, K. Kuhn, L. Zhou, D. A. Peiffer, L. Galver, et al. Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. - PLoS Genet. 3(10), 2007, 1827-1837.
107. ECARUCA www.ecaruca.net.
108. Edwards, J. H., D. G. Harnden, A. H. Cameron, V. M. Crosse & O. H. Wolff. A new trisomic syndrome. - Lancet. 1(7128), 1960, 787-790.
109. Egger, G., G. Liang, A. Aparicio & P. A. Jones. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. - Nature. 429(6990), 2004, 457-463.
110. Eggermann, K., C. Bergmann, I. Heil, T. Eggermann, K. Zerres & H. M. Schuler. Rare proximal interstitial deletion of chromosome 4q, del(4)(q13.2q21.22): New case and comparison with the literature. - Am J Med Genet A. 134A(2), 2005, 226-228.
111. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. - Oncogene. 21(35), 2002, 5400-5413.
112. Eichler, E. E. A. W. Zimmerman. A hot spot of genetic instability in autism. - N Engl J Med. 358(7), 2008, 737-739.
113. Emberger, W., E. Petek, P. M. Kroisel, H. Zierler & K. Wagner. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with partial trisomy 1q41-qter: further delineation of partial trisomy 1q syndrome. - Am J Med Genet. 104(4), 2001, 312-318.
114. Ensembl <http://www.ensembl.org>.
115. Erdogan, F., R. Ullmann, W. Chen, M. Schubert, S. Adolph, C. Hultschig, et al. Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. - Am J Med Genet A. 143(2), 2007, 172-178.
116. Estivill, X. L. Armengol. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. - PLoS Genet. 3(10), 2007, 1787-1799.
117. EUROCAT. <http://www.eurocat.ulster.ac.uk>.
118. Evangelidou, P., C. Sismani, M. Ioannides, C. Christodoulou, G. Koumbaris, I. Kallikas, I. Georgiou, V. Velissariou & P. C. Patsalis. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. - Mol Cytogenet. 3, 2010, 24.

119. Evers, L. J., C. T. Schrandt-Stumpel, J. J. Engelen, T. M. Hoorntje, C. F. Pulles-Heintzberger, J. J. Schrandt, J. C. Albrechts, J. Peters & J. P. Fryns. Deletion of the long arm of chromosome 6: two new patients and literature review. - *Clin Genet*. 50(3), 1996, 138-144.
120. Fan, C. M., E. Kuwana, A. Bulfone, C. F. Fletcher, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, et al. Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila* single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. - *Mol Cell Neurosci*. 7(1), 1996, 1-16.
121. Fan, J. B., M. S. Chee & K. L. Gunderson. Highly parallel genomic assays. - *Nat Rev Genet*. 7(8), 2006, 632-644.
122. Fanciulli, M., P. J. Norsworthy, E. Petretto, R. Dong, L. Harper, L. Kamesh, et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. - *Nat Genet*. 39(6), 2007, 721-723.
123. Fantes, J., B. Redeker, M. Breen, S. Boyle, J. Brown, J. Fletcher, et al. Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. - *Hum Mol Genet*. 4(3), 1995, 415-422.
124. Fellermann, K., D. E. Stange, E. Schaeffeler, H. Schmalzl, J. Wehkamp, C. L. Bevins, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. - *Am J Hum Genet*. 79(3), 2006, 439-448.
125. Feng, Y. C. A. Walsh. Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. - *Neuron*. 44(2), 2004, 279-293.
126. Feuk, L., A. R. Carson & S. W. Scherer. Structural variation in the human genome. - *Nat Rev Genet*. 7(2), 2006, 85-97.
127. Fiegler, H., J. B. Geigl, S. Langer, D. Rigler, K. Porter, K. Unger, N. P. Carter & M. R. Speicher. High resolution array-CGH analysis of single cells. - *Nucleic Acids Res*. 35(3), 2007, e15.
128. Findlay, I., T. Toth, P. Matthews, T. Marton, P. Quirke & Z. Papp. Rapid trisomy diagnosis (21, 18, and 13) using fluorescent PCR and short tandem repeats: applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. - *J Assist Reprod Genet*. 15(5), 1998, 266-275.
129. Fiorentino, F., L. Spizzichino, S. Bono, A. Biricik, G. Kokkali, L. Rienzi, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. - *Hum Reprod*. 2011.
130. Fishel, S., A. Gordon, C. Lynch, K. Dowell, G. Ndukwe, E. Kelada, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? - *Fertil Steril*. 93(3), 2010, 1006 e1007-1006 e1010.
131. Fitch, N. Partial trisomy 6. - *Clin Genet*. 14(3), 1978, 181-185.
132. Flint, J., G. P. Bates, K. Clark, A. Dorman, D. Willingham, B. A. Roe, G. Micklem, D. R. Higgs & E. J. Louis. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. - *Hum Mol Genet*. 6(8), 1997, 1305-1313.
133. Flint, J., J. Rochette, C. F. Craddock, C. Dode, B. Vignes, S. W. Horsley, et al. Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related Alu elements. - *Hum Mol Genet*. 5(8), 1996, 1163-1169.
134. Ford, C. E., K. W. Jones, P. E. Polani, J. C. De Almeida & J. H. Briggs. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). - *Lancet*. 1(7075), 1959, 711-713.

135. Freeman, J. L., G. H. Perry, L. Feuk, R. Redon, S. A. McCarroll, D. M. Altshuler, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. - *Genome Res.* 16(8), 2006, 949-961.
136. Friedman, J. M., A. Baross, A. D. Delaney, A. Ally, L. Arbour, L. Armstrong, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. - *Am J Hum Genet.* 79(3), 2006a, 500-513.
137. Friedman, J. M., B. Baross, A. D. Delaney, A. Ally, L. Arbour, J. Asano, et al. Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation. - *The American Journal of Human Genetics.* 79(3), 2006b, 500-513.
138. Fryns, J. P., C. Parloir & H. Van den Berghe. Partial trisomy 17q. Karyotype: 46,XY,der(21),t(17;21)(q22;p13). - *Hum Genet.* 49(3), 1979, 361-364.
139. Fu, Y., Z. Chen, A. I. Blakemore, E. Orwoll & D. M. Cohen. Absence of AVPR2 copy number variation in eunatremic and dysnatremic subjects in non-Hispanic Caucasian populations. - *Physiol Genomics.* 40(3), 2010, 121-127.
140. Gamazon, E. R., D. L. Nicolae & N. J. Cox. A study of CNVs as trait-associated polymorphisms and as expression quantitative trait loci. - *PLoS Genet.* 7(2), 2011, e1001292.
141. Gao, X., E. LeProust, H. Zhang, O. Srivannavit, E. Gulari, P. Yu, C. Nishiguchi, Q. Xiang & X. Zhou. A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. - *Nucleic Acids Res.* 29(22), 2001, 4744-4750.
142. Giglio, S., K. W. Broman, N. Matsumoto, V. Calvari, G. Gimelli, T. Neumann, et al. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. - *Am J Hum Genet.* 68(4), 2001, 874-883.
143. Giglio, S., V. Calvari, G. Gregato, G. Gimelli, S. Camanini, R. Giorda, et al. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. - *Am J Hum Genet.* 71(2), 2002, 276-285.
144. Gillis, L. A., J. McCallum, M. Kaur, C. DeScipio, D. Yaeger, A. Mariani, et al. NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations. - *Am J Hum Genet.* 75(4), 2004, 610-623.
145. Gonzalez, E., H. Kulkarni, H. Bolivar, A. Mangano, R. Sanchez, G. Catano, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. - *Science.* 307(5714), 2005, 1434-1440.
146. Graham, B. H., K. G. Waymire, B. Cottrell, I. A. Trounce, G. R. MacGregor & D. C. Wallace. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. - *Nat Genet.* 16(3), 1997, 226-234.
147. Gregg, N. M. Congenital cataract following German measles in the mother. - *Trans Ophthalmol Soc Aust.* 3, 1941, 35-46.
148. Gribble, S. M., E. Prigmore, D. C. Burford, K. M. Porter, B. L. Ng, E. J. Douglas, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. - *J Med Genet.* 42(1), 2005, 8-16.
149. Griggs, B. L., S. Ladd, R. A. Saul, B. R. DuPont & A. K. Srivastava. Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. - *Genomics.* 91(2), 2008, 195-202.

150. Gu, W., F. Zhang & J. R. Lupski. Mechanisms for human genomic rearrangements. - *Pathogenetics*. 1(1), 2008, 4.
151. Guarguaglini, G., P. I. Duncan, Y. D. Stierhof, T. Holmstrom, S. Duensing & E. A. Nigg. The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. - *Mol Biol Cell*. 16(3), 2005, 1095-1107.
152. Halliday, J. L., O. C. Ukoumunne, H. W. Baker, S. Breheny, A. M. Jaques, C. Garrett, D. Healy & D. Amor. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. - *Hum Reprod*. 25(1), 2010, 59-65.
153. Handyside, A. H., G. L. Harton, B. Mariani, A. R. Thornhill, N. Affara, M. A. Shaw & D. K. Griffin. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. - *J Med Genet*. 47(10), 2009, 651-658.
154. Hansson, K., K. Szuhai, J. Knijnenburg, A. van Haeringen & J. de Pater. Interstitial deletion of 6q without phenotypic effect. - *Am J Med Genet A*. 143A(12), 2007, 1354-1357.
155. Hansteen, I. L., K. Varslot, J. Steen-Johnsen & S. Langard. Cytogenetic screening of a new-born population. - *Clin Genet*. 21(5), 1982, 309-314.
156. HapMap <http://www.hapmap.org>.
157. Harada, N., T. Nagai, O. Shimokawa, N. Niikawa & N. Matsumoto. A 4q21-q22 deletion in a girl with severe growth retardation. - *Clin Genet*. 61(3), 2002, 226-228.
158. Henrichsen, C. N., E. Chaignat & A. Reymond. Copy number variants, diseases and gene expression. - *Hum Mol Genet*. 18(R1), 2009a, R1-8.
159. Henrichsen, C. N., N. Vinckenbosch, S. Zollner, E. Chaignat, S. Pradervand, F. Schutz, M. Ruedi, H. Kaessmann & A. Reymond. Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. - *Nat Genet*. 41(4), 2009b, 424-429.
160. Higgins, A. W., F. S. Alkuraya, A. F. Bosco, K. K. Brown, G. A. Bruns, D. J. Donovan, et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. - *Am J Hum Genet*. 82(3), 2008, 712-722.
161. Hollox, E. J., J. A. Armour & J. C. Barber. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. - *Am J Hum Genet*. 73(3), 2003, 591-600.
162. Hollox, E. J., U. Huffmeier, P. L. Zeeuwen, R. Palla, J. Lascorz, D. Rodijk-Olthuis, et al. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. - *Nat Genet*. 40(1), 2008, 23-25.
163. Hopkin, R. J., E. Schorry, M. Bofinger, A. Milatovich, H. J. Stern, C. Jayne & H. M. Saal. New insights into the phenotypes of 6q deletions. - *Am J Med Genet*. 70(4), 1997, 377-386.
164. Howard, P. N., G. R. Stoddard, M. W. Goddard & J. R. Seely. Giemsa banding of chromosome 1qh+ and linkage analysis. - *J Med Genet*. 12(1), 1975, 44-48.
165. HSVDatabase <http://humanparalogy.gs.washington.edu/structuralvariation/>.
166. Huret, J. L., C. Leonard, B. Forestier, M. O. Rethore & J. Lejeune. Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. - *J Med Genet*. 25(11), 1988, 741-749.
167. Iafrate, A. J., L. Feuk, M. N. Rivera, M. L. Listewnik, P. K. Donahoe, Y. Qi, S. W. Scherer & C. Lee. Detection of large-scale variation in the human genome. - *Nat Genet*. 36(9), 2004, 949-951.
168. Illumina www.illumina.com.

169. Ireland, M., C. English, I. Cross, W. T. Houlshy & J. Burn. A de novo translocation t(3;7)(q26.3;q23.1) in a child with Cornelia de Lange syndrome. - J Med Genet. 28, 1991, 639-640.
170. Ishkanian, A. S., C. A. Malloff, S. K. Watson, R. J. DeLeeuw, B. Chi, B. P. Coe, et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. - Nat Genet. 36(3), 2004, 299-303.
171. Itsara, A., G. M. Cooper, C. Baker, S. Girirajan, J. Li, D. Absher, et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. - Am J Hum Genet. 84(2), 2009, 148-161.
172. J. L. Hamerton, N. C. M. R. S. S. (1975). A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants, Vol. 8, pp. 223-243.
173. Jacobs, P. A cytogenetic survey of 1 1,680 newborn infants. - Ann. Hum. Genet. 37, 1974, 359.
174. Jacobs, P. A. J. A. Strong. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. - Nature. 183(4657), 1959, 302-303.
175. Jia, J., A. Pekowska, S. Jaeger, T. Benoukraf, P. Ferrier & S. Spicuglia. Assessing the efficiency and significance of Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) assays in using in vitro methylated genomic DNA. - BMC Res Notes. 3, 2010, 240.
176. Johnson, V. P., L. J. Heck, G. A. Carter & J. O. Flom. Deletion of the distal long arm of chromosome 1: a definable syndrome. - Am J Med Genet. 22(4), 1985, 685-694.
177. Jones, P. A. S. B. Baylin. The fundamental role of epigenetic events in cancer. - Nat Rev Genet. 3(6), 2002, 415-428.
178. Jonsson, G., T. L. Naylor, J. Vallon-Christersson, J. Staaf, J. Huang, M. R. Ward, et al. Distinct genomic profiles in hereditary breast tumors identified by array-based comparative genomic hybridization. - Cancer Res. 65(17), 2005, 7612-7621.
179. Jorde, L., J. Carey, M. Bamshad & R. White. Clinical genetics and genetic counseling., In "Medical Genetics", Missouri, Mosby, an affiliate of Elsevier, 2003. 305-325.
180. Kallioniemi, A., T. Visakorpi, R. Karhu, D. Pinkel & O. P. Kallioniemi. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization. - Methods. 9(1), 1996, 113-121.
181. Kalscheuer, V. M., J. Tao, A. Donnelly, G. Hollway, E. Schwinger, S. Kubart, et al. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. - Am J Hum Genet. 72(6), 2003, 1401-1411.
182. Kalter, H. J. Warkany. Congenital malformations (second of two parts). - N Engl J Med. 308(9), 1983a, 491-497.
183. Kalter, H. J. Warkany. Medical progress. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention (first of two parts). - N Engl J Med. 308(8), 1983b, 424-431.
184. Kaufman, L., M. Ayub & J. B. Vincent. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. - J Neurodev Disord. 2(4), 182-209.
185. Kawara, H., T. Yamamoto, N. Harada, K. Yoshiura, N. Niikawa, A. Nishimura, T. Mizuguchi & N. Matsumoto. Narrowing candidate region for monosomy 9p syndrome to a 4.7-Mb segment at 9p22.2-p23. - Am J Med Genet A. 140(4), 2006, 373-377.
186. Kearney, L. Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. - Cytogenet Genome Res. 114(3-4), 2006, 189-198.
187. Kenedy, A. A., K. J. Cohen, D. A. Loveys, G. J. Kato & C. V. Dang. Identification and characterization of the novel centrosome-associated protein CCCAP. - Gene. 303, 2003, 35-46.

188. Kenue, R. K., A. K. Raj, P. F. Harris & M. S. el-Bualy. Cytogenetic analysis of children suspected of chromosomal abnormalities. - *J Trop Pediatr.* 41(2), 1995, 77-80.
189. Kenwrick, S., M. Patterson, A. Speer, K. Fischbeck & K. Davies. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy region using pulsed field gel electrophoresis. - *Cell.* 48(2), 1987, 351-357.
190. Khaja, R., J. Zhang, J. R. MacDonald, Y. He, A. M. Joseph-George, J. Wei, et al. Genome assembly comparison identifies structural variants in the human genome. - *Nat Genet.* 38(12), 2006, 1413-1418.
191. Kidd, J. M., G. M. Cooper, W. F. Donahue, H. S. Hayden, N. Sampas, T. Graves, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. - *Nature.* 453(7191), 2008, 56-64.
192. Kikuno, R., T. Nagase, K. Ishikawa, M. Hirose, N. Miyajima, A. Tanaka, H. Kotani, N. Nomura & O. Ohara. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. - *DNA Res.* 6(3), 1999, 197-205.
193. Kim, K. Y., G. Y. Lee, J. Kim, H. C. Jeung, H. C. Chung & S. Y. Rha. Identification of significant regional genetic variations using continuous CNV values in aCGH data. - *Genomics.* 94(5), 2009, 317-323.
194. Kirchhoff, M., H. Rose, J. Maahr, T. Gerdes, M. Bugge, N. Tommerup, et al. High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. - *Eur J Hum Genet.* 8(9), 2000, 661-668.
195. Klein, O. D., P. D. Cotter, M. W. Moore, A. Zanko, M. Gilats, C. J. Epstein, F. Conte & K. A. Rauen. Interstitial deletions of chromosome 6q: genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. - *Clin Genet.* 71(3), 2007, 260-266.
196. Kleinjan, D. J.V. van Heyningen. Position effect in human genetic disease. - *Hum Mol Genet.* 7(10), 1998, 1611-1618.
197. Knight, S. J.J. Flint. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. - *J Med Genet.* 37(6), 2000, 401-409.
198. Koolen, D. A., L. E. Vissers, R. Pfundt, N. de Leeuw, S. J. Knight, R. Regan, et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. - *Nat Genet.* 38(9), 2006, 999-1001.
199. Kooy, R. F. Distinct disorders affecting the brain share common genetic origins. - *F1000 Biol Rep.* 2, 2010.
200. Krantz, I. D., J. McCallum, C. DeScipio, M. Kaur, L. A. Gillis, D. Yaeger, et al. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. - *Nat Genet.* 36(6), 2004, 631-635.
201. Krebs, I., I. Weis, M. Hudler, J. M. Rommens, H. Roth, S. W. Scherer, et al. Translocation breakpoint maps 5 kb 3' from TWIST in a patient affected with Saethre-Chotzen syndrome. - *Hum Mol Genet.* 6(7), 1997, 1079-1086.
202. Kruglyak, L.D. A. Nickerson. Variation is the spice of life. - *Nat Genet.* 27(3), 2001, 234-236.
203. Kugimiya, F., H. Chikuda, S. Kamekura, T. Ikeda, K. Hoshi, T. Ogasawara, K. Nakamura, U. I. Chung & H. Kawaguchi. Involvement of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase II in chondrocyte hypertrophy during endochondral ossification. - *Mod Rheumatol.* 15(6), 2005, 391-396.

204. Kumar, A. DNA chip technology: a review. - *Inter. J. Curr. Trends Sci. Tech.* 2(1), 2011, 1-24.
205. Kurima, K., Y. Szymko, S. Rudi, R. Morell, T. Friedman & A. Griffith. Genetic map localization of DFNA34 and DFNA36, two autosomal dominant nonsyndromic deafness loci. - *Am J Hum Genet.* 67(suppl 2), 2000, 300.
206. Le Caignec, C., M. Boceno, P. Saugier-Veber, S. Jacquemont, M. Joubert, A. David, T. Frebourg & J. M. Rival. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. - *J Med Genet.* 42(2), 2005, 121-128.
207. Le Caignec, C., C. Spits, K. Sermon, M. De Rycke, B. Thienpont, S. Debrock, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. - *Nucleic Acids Res.* 34(9), 2006, e68.
208. Lee, C., A. J. Iafrate & A. R. Brothman. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. - *Nat Genet.* 39(7 Suppl), 2007a, S48-54.
209. Lee, J. A., C. M. Carvalho & J. R. Lupski. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. - *Cell.* 131(7), 2007b, 1235-1247.
210. Lee, J. A., K. Inoue, S. W. Cheung, C. A. Shaw, P. Stankiewicz & J. R. Lupski. Role of genomic architecture in PLP1 duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. - *Hum Mol Genet.* 15(14), 2006a, 2250-2265.
211. Lee, J. A., R. E. Madrid, K. Sperle, C. M. Ritterson, G. M. Hobson, J. Garbern, J. R. Lupski & K. Inoue. Spastic paraplegia type 2 associated with axonal neuropathy and apparent PLP1 position effect. - *Ann Neurol.* 59(2), 2006b, 398-403.
212. Lejeune, J., M. Gautier & R. Turpin. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]. - *C R Hebd Seances Acad Sci.* 248(11), 1959, 1721-1722.
213. Lejeune, J., M. O. Rethore, B. Dutrillaux & G. Martin. [Translocation 8-22 with no length change and partial trisomy for 8q. Detection by heat denaturation]. - *Exp Cell Res.* 74(1), 1972, 293-295.
214. Lerer, I., M. Sagi, V. Meiner, T. Cohen, J. Zlotogora & D. Abeliovich. Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. - *Hum Mol Genet.* 14(24), 2005, 3911-3920.
215. Levy, S., G. Sutton, P. C. Ng, L. Feuk, A. L. Halpern, B. P. Walenz, et al. The diploid genome sequence of an individual human. - *PLoS Biol.* 5(10), 2007, e254.
216. Lieber, M. R., Y. Ma, U. Pannicke & K. Schwarz. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. - *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(9), 2003, 712-720.
217. Lin, A. E., K. L. Garver, G. Diggans, M. Clemens, S. L. Wenger, M. W. Steele, M. C. Jones & J. Israel. Interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4: further delineation of phenotypes. - *Am J Med Genet.* 31(3), 1988, 533-548.
218. Linzmeier, R. M.T. Ganz. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. - *Genomics.* 86(4), 2005, 423-430.
219. Little, S. E., R. Vuononvirta, J. S. Reis-Filho, R. Natrajan, M. Iravani, K. Fenwick, et al. Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tumor DNA. - *Genomics.* 87(2), 2006, 298-306.
220. Liu, Q. R., P. W. Zhang, Q. Zhen, D. Walther, X. B. Wang & G. R. Uhl. KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. - *J Biol Chem.* 277(15), 2002, 13312-13320.

221. Locke, D. P., A. J. Sharp, S. A. McCarroll, S. D. McGrath, T. L. Newman, Z. Cheng, et al. Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. - *Am J Hum Genet.* 79(2), 2006, 275-290.
222. Lockwood, W. W., R. Chari, B. Chi & W. L. Lam. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. - *Eur J Hum Genet.* 14(2), 2006, 139-148.
223. Lovmar, L.A. C. Syvanen. Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies. - *Hum Mutat.* 27(7), 2006, 603-614.
224. Lubs, H. A., W. J. Kinberling, F. Hecht, S. R. Patil, J. Brown, P. Gerald & R. L. Summitt. Racial differences in the frequency of Q and C chromosomal heteromorphisms. - *Nature.* 268(5621), 1977, 631-633.
225. Lukusa, T.J. P. Fryns. Pure de novo 17q25.3 micro duplication characterized by micro array CGH in a dysmorphic infant with growth retardation, developmental delay and distal arthrogryposis. - *Genet Couns.* 21(1), 2010, 25-34.
226. Lukusa, T., D. Willekens, N. Lukusa, F. De Cock & J. P. Fryns. Terminal 6q25.3 deletion and abnormal behaviour. - *Genet Couns.* 12(3), 2001, 213-221.
227. Lupski, J. R.P. Stankiewicz. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. - *PLoS Genet.* 1(6), 2005, e49.
228. Madan, K., A. W. Nieuwint & Y. van Bever. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. - *Hum Genet.* 99(6), 1997, 806-815.
229. Maeda, T., M. Ohno, A. Matsunobu, K. Yoshihara & N. Yabe. A cytogenetic survey of 14,835 consecutive liveborns. - *Jinrui Idengaku Zasshi.* 36(1), 1991, 117-129.
230. Mankinen, C. B., J. W. Sears & V. R. Alvarez. Terminal (1)(q43) long-arm deletion of chromosome no. 1 in a three-year-old female. - *Birth Defects Orig Artic Ser.* 12(5), 1976, 131-136.
231. Mantripragada, K. K., P. G. Buckley, C. Jarbo, U. Menzel & J. P. Dumanski. Development of NF2 gene specific, strictly sequence defined diagnostic microarray for deletion detection. - *J Mol Med.* 81(7), 2003, 443-451.
232. Marical, H., M. J. L. Bris, N. Douet-Guilbert, P. Parent, J. P. Descourt, F. Morel & M. D. Braekeleer. 18p trisomy: A case of direct 18p duplication characterized by molecular cytogenetic analysis. - *American Journal of Medical Genetics Part A.* 143A(18), 2007, 2192-2195.
233. Marille, E. M. S., S. Annet, F. S. Dominique, E. V. Lisenka, A. V. Joris, P. Rolph, et al. (2008). Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype, Vol. 146A, pp. 1430-1438.
234. McCarroll, S. A.D. M. Altshuler. Copy-number variation and association studies of human disease. - *Nat Genet.* 39(7 Suppl), 2007, S37-42.
235. McCarroll, S. A., T. N. Hadnott, G. H. Perry, P. C. Sabeti, M. C. Zody, J. C. Barrett, et al. Common deletion polymorphisms in the human genome. - *Nat Genet.* 38(1), 2006, 86-92.
236. McCarroll, S. A., F. G. Kuruvilla, J. M. Korn, S. Cawley, J. Nemesh, A. Wysoker, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. - *Nat Genet.* 40(10), 2008, 1166-1174.
237. MCNdb <http://www.mcndb.org/index.jsp>.

238. Meinecke, P.D. Vogtel. A specific syndrome due to deletion of the distal long arm of chromosome 1. - *Am J Med Genet.* 28(2), 1987, 371-376.
239. Meng, J., H. Fujita, N. Nagahara, A. Kashiwai, Y. Yoshioka & M. Funato. Two patients with chromosome 6q terminal deletions with breakpoints at q24.3 and q25.3. - *Am J Med Genet.* 43(4), 1992, 747-750.
240. Menten, B., N. Maas, B. Thienpont, K. Buysse, J. Vandesompele, C. Melotte, et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. - *J Med Genet.* 43(8), 2006, 625-633.
241. Merla, G., C. Howald, C. N. Henrichsen, R. Lyle, C. Wyss, M. T. Zabet, S. E. Antonarakis & A. Reymond. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. - *Am J Hum Genet.* 79(2), 2006, 332-341.
242. Michael, M. Z., O. C. SM, N. G. van Holst Pellekaan, G. P. Young & R. J. James. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. - *Mol Cancer Res.* 1(12), 2003, 882-891.
243. Migliori, M. V., A. M. Ciaschini, G. Discepoli, V. Abbasciano, M. Barbato & E. Pannone. Distal trisomy of 10q. Report of a new case of duplication 10q25.2-25.3→qter defined by FISH. - *Ann Genet.* 45(1), 2002, 9-12.
244. Miller, O. J., Therman, E. *Human Chromosomes*, Springer, 2001.
245. Minino, A. M., M. P. Heron, S. L. Murphy & K. D. Kochanek. Deaths: final data for 2004. - *Natl Vital Stat Rep.* 55(19), 2007, 1-119.
246. Mitelman, F. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Basel, S. Karger, 2009.
247. Mokhtar, M. Chromosomal aberrations in children with suspected genetic disorders. - *East Mediterr Health J.* 3(1), 1997, 114-122.
248. Mueller, R.I. Young. Genetic counselling, In "Emery's Elements of Medical Genetics", London, Churchill Livingstone, 2001. 237-245.
249. Naccache, N. F., A. M. Vianna-Morgante & A. Richieri-Costa. Brief clinical report: duplication of distal 17q: report of an observation. - *Am J Med Genet.* 17(3), 1984, 633-639.
250. Nacheva, E. P., C. D. Grace, M. Bittner, D. H. Ledbetter, R. B. Jenkins & A. R. Green. Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. - *Cancer Genet Cytogenet.* 100(2), 1998, 93-105.
251. Nagamani, S. C., A. Erez, C. Eng, Z. Ou, C. Chinault, L. Workman, et al. Interstitial deletion of 6q25.2-q25.3: a novel microdeletion syndrome associated with microcephaly, developmental delay, dysmorphic features and hearing loss. - *Eur J Hum Genet.* 17(5), 2009, 573-581.
252. Nature. A haplotype map of the human genome. - *Nature.* 437(7063), 2005, 1299-1320.
253. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.
254. Neill, N. J., B. S. Torchia, B. A. Bejjani, L. G. Shaffer & B. C. Ballif. Comparative analysis of copy number detection by whole-genome BAC and oligonucleotide array CGH. - *Mol Cytogenet.* 3, 2010, 11.
255. Nelson, K.L. B. Holmes. Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. - *N Engl J Med.* 320(1), 1989, 19-23.
256. Newey, S. E., V. Velamoor, E. E. Govek & L. Van Aelst. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. - *J Neurobiol.* 64(1), 2005, 58-74.

257. Nguyen, D. Q., C. Webber & C. P. Ponting. Bias of selection on human copy-number variants. - *PLoS Genet.* 2(2), 2006, e20.
258. Nowell, P. C. D. A. Hungerford. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. - *Science.* 132, 1960, 1497-1501.
259. O'Rahilly, R., Mueller, F. Human embryology and teratology, New York, Wiley - Liss, 2001.
260. Okten, G., O. Sezer, S. Gunes, S. Kucukoduk & G. Ogur. Two cases of 9p deletion syndrome and a case of partial trisomy 8 and partial monosomy 9p. - *Genet Couns.* 20(4), 2009, 341-347.
261. OMD (1998). Oxford Medical Database.
262. Oostlander, A. E., G. A. Meijer & B. Ylstra. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. - *Clin Genet.* 66(6), 2004, 488-495.
263. Orye, E. H. van Bever. De novo distal trisomy 17q. - *Ann Genet.* 28(1), 1985, 61-62.
264. Ou, Z., S. H. Kang, C. A. Shaw, C. E. Carmack, L. D. White, A. Patel, A. L. Beaudet, S. W. Cheung & A. C. Chinault. Bacterial artificial chromosome-emulation oligonucleotide arrays for targeted clinical array-comparative genomic hybridization analyses. - *Genet Med.* 10(4), 2008, 278-289.
265. Park, H. K., H. J. Kim, H. J. Kim, S. H. Han, Y. J. Kim & S. H. Kim. Screening of subtelomeric rearrangements in 100 Korean Pediatric patients with unexplained mental retardation and anomalies using subtelomeric FISH (fluorescence in situ hybridization). - *J Korean Med Sci.* 23(4), 2008, 573-578.
266. Park, J., L. Chen, L. Ratnashinge, T. A. Sellers, J. P. Tanner, J. H. Lee, et al. Deletion polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 and risk of prostate cancer in African American and Caucasian men. - *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(8), 2006, 1473-1478.
267. Passarge, E. Color atlas of genetics, In "Color atlas of genetics", Stuttgart Thieme, 2007. 1 - 15.
268. Patau, K., D. W. Smith, E. Therman, S. L. Inhorn & H. P. Wagner. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. - *Lancet.* 1(7128), 1960, 790-793.
269. Patsalis, P. C., P. Evangelidou, S. Charalambous & C. Sismani. Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. - *Eur J Hum Genet.* 12(8), 2004, 647-653.
270. Pease, A. C., D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes & S. P. Fodor. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. - *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(11), 1994, 5022-5026.
271. Pennisi, E. Breakthrough of the year. Human genetic variation. - *Science.* 318(5858), 2007, 1842-1843.
272. Pergament, E., P. X. Chen, M. Thangavelu & M. Fiddler. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. - *Prenat Diagn.* 20(3), 2000, 215-220.
273. Perry, G. H., N. J. Dominy, K. G. Claw, A. S. Lee, H. Fiegler, R. Redon, et al. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. - *Nat Genet.* 39(10), 2007, 1256-1260.
274. Perry, G. H., F. Yang, T. Marques-Bonet, C. Murphy, T. Fitzgerald, A. S. Lee, et al. Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees. - *Genome Res.* 18(11), 2008, 1698-1710.

275. Petrini, J., K. Damus, R. Russell, K. Poschman, M. J. Davidoff & D. Mattison. Contribution of birth defects to infant mortality in the United States. - *Teratology*. 66 Suppl 1, 2002, S3-6.
276. Pfeifer, A., A. Aszodi, U. Seidler, P. Ruth, F. Hofmann & R. Fassler. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. - *Science*. 274(5295), 1996, 2082-2086.
277. Pinkel, D.D. G. Albertson. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. - *Nat Genet*. 37 Suppl, 2005, S11-17.
278. Pinkel, D., R. Seagraves, D. Sudar, S. Clark, I. Poole, D. Kowbel, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. - *Nat Genet*. 20(2), 1998, 207-211.
279. Pinto, D., C. Marshall, L. Feuk & S. W. Scherer. Copy-number variation in control population cohorts. - *Hum Mol Genet*. 16 Spec No. 2, 2007, R168-173.
280. Pirola, B., L. Bortotto, S. Giglio, E. Piovan, A. Janes, R. Guerrini & O. Zuffardi. Agenesis of the corpus callosum with Probst bundles owing to haploinsufficiency for a gene in an 8 cM region of 6q25. - *J Med Genet*. 35(12), 1998, 1031-1033.
281. Pollack, J. R., C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein & P. O. Brown. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. - *Nat Genet*. 23(1), 1999, 41-46.
282. Potter, C. J., L. G. Pedraza, H. Huang & T. Xu. The tuberous sclerosis complex (TSC) pathway and mechanism of size control. - *Biochem Soc Trans*. 31(Pt 3), 2003, 584-586.
283. Puvabanditsin, S., E. Garrow, F. A. Rabi, R. Titapiwatanakun & K. M. Kuniyoshi. Partial trisomy 8q and partial monosomy 18p: a case report. - *Ann Genet*. 47(4), 2004, 399-403.
284. Quackenbush, J. Microarray data normalization and transformation. - *Nat Genet*. 32 Suppl, 2002, 496-501.
285. Rajcan-Separovic, E., C. Harvard, X. Liu, B. McGillivray, J. G. Hall, Y. Qiao, et al. Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. - *J Med Genet*. 44(4), 2007, 269-276.
286. Rankin, J., Pattenden, S., Abramsky, L., Boyd, P., Jordan, H., Stone, D., Vrijheid, M., Wellesley, D., Dolk, H. Prevalence of congenital anomalies in five British regions, 1991-99. - *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 90(5), 2005, F374-F379.
287. Rauch, A., J. Hoyer, S. Guth, C. Zweier, C. Kraus, C. Becker, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. - *Am J Med Genet A*. 140(19), 2006, 2063-2074.
288. Raymond, C. S., C. E. Shamu, M. M. Shen, K. J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin & D. Zarkower. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. - *Nature*. 391(6668), 1998, 691-695.
289. Redon, R., S. Ishikawa, K. R. Fitch, L. Feuk, G. H. Perry, T. D. Andrews, et al. Global variation in copy number in the human genome. - *Nature*. 444(7118), 2006, 444-454.
290. Remme, C. A., M. P. Lombardi, M. J. van den Hoff & R. H. Lekanne dit Deprez. CDNA arrays: the ups and downs. - *Cardiovasc Drugs Ther*. 15(2), 2001, 99-101.
291. Ren, B., F. Robert, J. J. Wyrick, O. Aparicio, E. G. Jennings, I. Simon, et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. - *Science*. 290(5500), 2000, 2306-2309.

292. Rickman, L., H. Fiegler, N. P. Carter & M. Bobrow. Prenatal diagnosis by array-CGH. - *Eur J Med Genet.* 48(3), 2005, 232-240.
293. Rickman, L., H. Fiegler, C. Shaw-Smith, R. Nash, V. Cirigliano, G. Voglino, et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. - *J Med Genet.* 43(4), 2006, 353-361.
294. Riegel, M., A. Baumer, M. Jamar, K. Delbecque, C. Herens, A. Verloes & A. Schinzel. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. - *Hum Genet.* 109(3), 2001, 286-294.
295. Rigby, P. W., M. Dieckmann, C. Rhodes & P. Berg. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. - *J Mol Biol.* 113(1), 1977, 237-251.
296. Rio, M., F. Molinari, S. Heuertz, C. Ozilou, P. Gosset, O. Raoul, et al. Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. - *J Med Genet.* 39(4), 2002, 266-270.
297. Roa, B. B., J. Pulliam, C. M. Eng & S. W. Cheung. Evolution of prenatal genetics: from point mutation testing to chromosomal microarray analysis. - *Expert Rev Mol Diagn.* 5(6), 2005, 883-892.
298. Rodriguez, L., M. L. Martinez-Fernandez, E. Mansilla, J. Mendioroz, R. M. Arteaga, J. F. Toral, et al. Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. - *Clin Dysmorphol.* 17(1), 2008, 5-12.
299. Rosano, A., L. D. Botto, B. Botting & P. Mastroiacovo. Infant mortality and congenital anomalies from 1950 to 1994: an international perspective. - *J Epidemiol Community Health.* 54(9), 2000, 660-666.
300. Rosenberg, C., J. Knijnenburg, E. Bakker, A. M. Vianna-Morgante, W. Sloos, P. A. Otto, et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. - *J Med Genet.* 43(2), 2006, 180-186.
301. Roshon, M. J. H. E. Ruley. Hypomorphic mutation in hnRNP U results in post-implantation lethality. - *Transgenic Res.* 14(2), 2005, 179-192.
302. Rothlisberger, B., D. Kotzot, H. E. Gnehm & A. Schinzel. "Essentially pure" partial trisomy (6)(p23-->pter) in two brothers due to maternal t(6;17)(p23;p13.3). - *Am J Med Genet.* 85(4), 1999, 389-394.
303. Saccone, S., A. De Sario, G. Della Valle & G. Bernardi. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. - *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(11), 1992, 4913-4917.
304. Sachs, E. S. G. van Waveren. Phenotype of partial trisomy 8 (p21 leads to qter) in two unrelated patients with de novo translocation. - *J Med Genet.* 18(3), 1981, 204-208.
305. Sahoo, T., S. W. Cheung, P. Ward, S. Darilek, A. Patel, D. del Gaudio, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. - *Genet Med.* 8(11), 2006, 719-727.
306. Sakic, M. A. Sofradzija. [Occurrence of congenital anomalies in neonates in the Sarajevo region]. - *Med Arh.* 56(3 Suppl 1), 2002, 38-41.
307. Sanlaville, D., J. M. Lapierre, C. Turleau, A. Coquin, G. Borck, L. Colleaux, M. Vekemans & S. P. Romana. Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. - *Eur J Med Genet.* 48(3), 2005, 214-231.
308. Schaeffer, A. J., J. Chung, K. Heretis, A. Wong, D. H. Ledbetter & C. Lese Martin. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of

- aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. - *Am J Hum Genet.* 74(6), 2004, 1168-1174.
309. Schalock, R. L., R. A. Luckasson, K. A. Shogren, S. Borthwick-Duffy, V. Bradley, W. H. Buntinx, et al. The renaming of mental retardation: understanding the change to the term intellectual disability. - *Intellect Dev Disabil.* 45(2), 2007, 116-124.
 310. Schena, M. Microarray Manufacturing, In "Microarray analysis", New Jersey, John Wiley&Sons, 2003. 159-197.
 311. Scherer, S. W., C. Lee, E. Birney, D. M. Altshuler, E. E. Eichler, N. P. Carter, M. E. Hurles & L. Feuk. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. - *Nat Genet.* 39(7 Suppl), 2007, S7-15.
 312. Scherthan, H., S. Weich, H. Schwegler, C. Heyting, M. Harle & T. Cremer. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. - *J Cell Biol.* 134(5), 1996, 1109-1125.
 313. Schimmenti, L. A., R. R. Higgins, N. J. Mendelsohn, T. M. Casey, J. Steinberger, M. C. Mammel & G. L. Wiesner. Monosomy 9p24-->pter and trisomy 5q31-->qter: case report and review of two cases. - *Am J Med Genet.* 57(1), 1995, 52-56.
 314. Schluth-Bolard, C., B. Delobel, D. Sanlaville, O. Boute, J. M. Cuisset, S. Sukno, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. - *Eur J Med Genet.* 52(5), 2009, 291-296.
 315. Schork, N. J. Genetics of complex disease: approaches, problems, and solutions. - *Am J Respir Crit Care Med.* 156(4 Pt 2), 1997, S103-109.
 316. Schoumans, J., C. Ruivenkamp, E. Holmberg, M. Kyllerman, B. M. Anderlid & M. Nordenskjold. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). - *J Med Genet.* 42(9), 2005, 699-705.
 317. Schouten, J. P., C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, F. Diepvens & G. Pals. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. - *Nucleic Acids Res.* 30(12), 2002, e57.
 318. Schrock, E., S. du Manoir, T. Veldman, B. Schoell, J. Wienberg, M. A. Ferguson-Smith, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. - *Science.* 273(5274), 1996, 494-497.
 319. Sebat, J., B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin, T. Walsh, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. - *Science.* 316(5823), 2007, 445-449.
 320. Sebat, J., B. Lakshmi, J. Troge, J. Alexander, J. Young, P. Lundin, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. - *Science.* 305(5683), 2004, 525-528.
 321. Selzer, R. R., T. A. Richmond, N. J. Pofahl, R. D. Green, P. S. Eis, P. Nair, A. R. Brothman & R. L. Stallings. Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. - *Genes Chromosomes Cancer.* 44(3), 2005, 305-319.
 322. Shaffer, L. G. B. A. Bejjani. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. - *Cytogenet Genome Res.* 115(3-4), 2006, 303-309.
 323. Shaffer, L. G., B. A. Bejjani, B. Torchia, S. Kirkpatrick, J. Coppinger & B. C. Ballif. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities:

- cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. - *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 145C(4), 2007, 335-345.
324. Shaffer, L. G., J. Coppinger, S. Alliman, B. A. Torchia, A. Theisen, B. C. Ballif & B. A. Bejjani. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. - *Prenat Diagn.* 28(9), 2008, 789-795.
 325. Shaffer, L. G., C. D. Kashork, R. Saleki, E. Rorem, K. Sundin, B. C. Ballif & B. A. Bejjani. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. - *J Pediatr.* 149(1), 2006, 98-102.
 326. Shaikh, T. H., X. Gai, J. C. Perin, J. T. Glessner, H. Xie, K. Murphy, et al. High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. - *Genome Res.* 19(9), 2009, 1682-1690.
 327. Shalon, D., S. J. Smith & P. O. Brown. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. - *Genome Res.* 6(7), 1996, 639-645.
 328. Sharp, A. J., S. Hansen, R. R. Selzer, Z. Cheng, R. Regan, J. A. Hurst, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. - *Nat Genet.* 38(9), 2006, 1038-1042.
 329. Sharp, A. J., D. P. Locke, S. D. McGrath, Z. Cheng, J. A. Bailey, R. U. Vallente, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. - *Am J Hum Genet.* 77(1), 2005, 78-88.
 330. Shaw-Smith, C., A. M. Pittman, L. Willatt, H. Martin, L. Rickman, S. Gribble, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. - *Nat Genet.* 38(9), 2006, 1032-1037.
 331. Shaw-Smith, C., R. Redon, L. Rickman, M. Rio, L. Willatt, H. Fiegler, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. - *J Med Genet.* 41(4), 2004, 241-248.
 332. Shianna, K. V.H. F. Willard. Human genomics: in search of normality. - *Nature.* 444(7118), 2006, 428-429.
 333. Shin, Y. B., S. O. Nam, E. J. Seo, H. H. Kim, C. L. Chang, E. Y. Lee, H. C. Son & S. H. Hwang. Partial trisomy 1q41 syndrome delineated by whole genomic array comparative genome hybridization. - *J Korean Med Sci.* 23(6), 2008, 1097-1101.
 334. Silveira, I., C. Miranda, L. Guimaraes, M. C. Moreira, I. Alonso, P. Mendonca, et al. Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus. - *Arch Neurol.* 59(4), 2002, 623-629.
 335. Slater, H. R., D. K. Bailey, H. Ren, M. Cao, K. Bell, S. Nasioulas, R. Henke, K. H. Choo & G. C. Kennedy. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. - *Am J Hum Genet.* 77(5), 2005, 709-726.
 336. Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer & P. Lichter. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. - *Genes Chromosomes Cancer.* 20(4), 1997, 399-407.
 337. Speicher, M. R., S. Gwyn Ballard & D. C. Ward. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. - *Nat Genet.* 12(4), 1996, 368-375.

338. Spits, C., C. Le Caignec, M. De Rycke, L. Van Haute, A. Van Steirteghem, I. Liebaers & K. Sermon. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. - *Nat Protoc.* 1(4), 2006, 1965-1970.
339. Staaf, J., G. Jonsson, M. Ringner & J. Vallon-Christersson. Normalization of array-CGH data: influence of copy number imbalances. - *BMC Genomics.* 8, 2007, 382.
340. Stengel-Rutkowski, S., K. Lohse, C. Herzog, C. Apacik, J. Couturier, A. Albert & B. Belohradsky. Partial trisomy 8q. Two case reports with maternal translocation and inverted insertion: phenotype analyses and reflections on the risk. - *Clin Genet.* 42(4), 1992, 178-185.
341. Stevenson, D. A., A. R. Brothman, J. C. Carey, Z. Chen, K. M. Dent, J. F. Bale, Jr. & N. Longo. 6q subtelomeric deletion: is there a recognizable syndrome? - *Clin Dysmorphol.* 13(2), 2004, 103-106.
342. Stranger, B. E., M. S. Forrest, M. Dunning, C. E. Ingle, C. Beazley, N. Thorne, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. - *Science.* 315(5813), 2007, 848-853.
343. Strehle, E. M., O. A. Ahmed, M. Hameed & A. Russell. The 4q-Syndrome. - *Genet Couns.* 12(4), 2001, 327-339.
344. Strehle, E. M. H. M. Bantock. The phenotype of patients with 4q-syndrome. - *Genet Couns.* 14(2), 2003, 195-205.
345. Sukumar, S., S. Wang, K. Hoang, C. M. Vanchiere, K. England, R. Fick, B. Pagon & K. S. Reddy. Subtle overlapping deletions in the terminal region of chromosome 6q24.2-q26: three cases studied using FISH. - *Am J Med Genet.* 87(1), 1999, 17-22.
346. Sun, Y., S. Koo, N. White, E. Peralta, C. Esau, N. M. Dean & R. J. Perera. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. - *Nucleic Acids Res.* 32(22), 2004, e188.
347. Susan, S.-S., M. H. Lydon, S. Urvashi, M. Sandra, M. O. John & F. R. James. Deletion of terminal portion of 6q: Report of a case with unusual malformations. - *Am J Med Genet A.* 32(1), 1989, 81-86.
348. Sutton, V. R. L. G. Shaffer. Search for imprinted regions on chromosome 14: comparison of maternal and paternal UPD cases with cases of chromosome 14 deletion. - *Am J Med Genet.* 93(5), 2000, 381-387.
349. Swinkels, M. E., A. Simons, D. F. Smeets, L. E. Vissers, J. A. Veltman, R. Pfundt, et al. Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. - *Am J Med Genet A.* 146A(11), 2008, 1430-1438.
350. Tagliabue, G., R. Tessandori, F. Caramaschi, S. Fabiano, A. Maghini, A. Tittarelli, et al. Descriptive epidemiology of selected birth defects, areas of Lombardy, Italy, 1999. - *Popul Health Metr.* 5, 2007, 4.
351. Tan, D. S., M. B. Lambros, R. Natrajan & J. S. Reis-Filho. Getting it right: designing microarray (and not 'microawry') comparative genomic hybridization studies for cancer research. - *Lab Invest.* 87(8), 2007, 737-754.
352. Thein, A. T., S. A. Abdel-Fattah, P. M. Kyle & P. W. Soothill. An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. - *Prenat Diagn.* 20(4), 2000, 275-280.
353. Thienpont, B., L. Mertens, T. de Ravel, B. Eyskens, D. Boshoff, N. Maas, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. - *Eur Heart J.* 28(22), 2007, 2778-2784.

354. Tincheva, R. Camera-Marugo-Cohen syndrome-report of a case. - BJMG. 9((1\$2)), 2006, 61-63.
355. Titomanlio, L., I. Giurgea, C. Baumann, M. Elmaleh, P. Sachs, F. Chalard, A. Aboura & A. Verloes. A locus for sacral/anorectal malformations maps to 6q25.3 in a 0.3 Mb interval region. - Eur J Hum Genet. 14(8), 2006, 971-974.
356. Tjio, J. H.A. Levan. The chromosome number in man. - Hereditas. 42, 1956, 1-6.
357. Tonkin, E. T., M. Smith, P. Eichhorn, S. Jones, B. Imamwerdi, S. Lindsay, et al. A giant novel gene undergoing extensive alternative splicing is severed by a Cornelia de Lange-associated translocation breakpoint at 3q26.3. - Hum Genet. 115(2), 2004a, 139-148.
358. Tonkin, E. T., T. J. Wang, S. Lisgo, M. J. Bamshad & T. Strachan. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. - Nat Genet. 36(6), 2004b, 636-641.
359. Tuncbilek, E., K. Boduroglu & M. Alikasifoglu. Results of the Turkish congenital malformation survey. - Turk J Pediatr. 41(3), 1999, 287-297.
360. Turner, D. J., M. Miretti, D. Rajan, H. Fiegler, N. P. Carter, M. L. Blayney, S. Beck & M. E. Hurles. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. - Nat Genet. 40(1), 2008, 90-95.
361. Turnpenny, P. D.S. Ellard. Congenital abnormalities and dysmorphic syndromes, In "Emery's Elements of Medical Genetics", London, Churchill Livingstone 2005. 247-262.
362. Tyson, C., B. McGillivray, C. Chijiwa & E. Rajcan-Separovic. Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH. - Am J Med Genet A. 129A(3), 2004, 254-260.
363. Tzschach, A., C. Menzel, F. Erdogan, M. Schubert, M. Hoeltzenbein, G. Barbi, et al. Characterization of a 16 Mb interstitial chromosome 7q21 deletion by tiling path array CGH. - Am J Med Genet A. 143(4), 2007, 333-337.
364. UCSC <http://genome.ucsc.edu/>.
365. Uhler, M. D. Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. - J Biol Chem. 268(18), 1993, 13586-13591.
366. Valduga, M., C. Philippe, P. Bach Segura, O. Thiebaugeorges, A. Miton, M. Beri, et al. A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. - Prenat Diagn. 30(4), 2010, 333-341.
367. Van Buggenhout, G., N. M. Maas, J. P. Fryns & J. R. Vermeesch. A dysmorphic boy with 4qter deletion and 4q32.3-34.3 duplication: clinical, cytogenetic, and molecular findings. - Am J Med Genet A. 131(2), 2004, 186-189.
368. Veltman, J. A. Genomic microarrays in clinical diagnosis. - Curr Opin Pediatr. 18(6), 2006, 598-603.
369. Veltman, J. A.B. B. de Vries. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? - J Mol Diagn. 8(5), 2006, 534-537; discussion 537-539.
370. Venter, J. C. Multiple personal genomes await. - Nature. 464(7289), 2010, 676-677.
371. Verdu, J., M. A. Buratovich, E. L. Wilder & M. J. Birnbaum. Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in Drosophila by Akt/PKB. - Nat Cell Biol. 1(8), 1999, 500-506.
372. Vermeesch, J. R., C. Melotte, G. Froyen, S. Van Vooren, B. Dutta, N. Maas, et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. - J Histochem Cytochem. 53(3), 2005, 413-422.

373. Vermeesch, J. R.A. Rauch. Reply to Hochstenbach et al. 'Molecular karyotyping'. - *Eur J Hum Genet.* 14(10), 2006, 1063-1064.
374. Vermeulen, S. J., F. Speleman, L. Vanransbeeck, J. Verspeet, B. Menten, M. R. Verschraegen-Spae, et al. Familial pericentric inversion of chromosome 18: behavioral abnormalities in patients heterozygous for either the dup(18p)/del(18q) or dup(18q)/del(18p) recombinant chromosome. - *Eur J Hum Genet.* 13(1), 2005, 52-58.
375. Veronica, B., V. Giuseppe De, C. Rosa, S. Paolo & V. Angelo. Isolated 6q terminal deletions: An emerging new syndrome. - *American Journal of Medical Genetics Part A.* 140A(1), 2006, 74-81.
376. Verschuuren-Bemelmans, C. C., B. Leegte, T. M. Hodenius & J. M. Cobben. Trisomy 1q42 --> qter in a sister and brother: further delineation of the "trisomy 1q42 --> qter syndrome". - *Am J Med Genet.* 58(1), 1995, 83-86.
377. Vialard, F., D. Molina Gomes, B. Leroy, E. Quarello, A. Escalona, C. Le Sciellour, et al. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. - *Fetal Diagn Ther.* 25(2), 2009, 277-284.
378. Vissers, L. E., B. B. de Vries, K. Osoegawa, I. M. Janssen, T. Feuth, C. O. Choy, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. - *Am J Hum Genet.* 73(6), 2003, 1261-1270.
379. Vissers, L. E., J. A. Veltman, A. G. van Kessel & H. G. Brunner. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. - *Hum Mol Genet.* 14 Spec No. 2, 2005, R215-223.
380. Vojtassak, J., J. Malova, L. Demjenova, P. Martanovic, D. Bohmer, M. Korbel, et al. Developmental defects and chromosomal aberrations in spontaneous abortions and stillbirths. - *Gen Physiol Biophys.* 18 Spec No., 1999, 182-188.
381. Wang, K., M. Li, D. Hadley, R. Liu, J. Glessner, S. F. Grant, H. Hakonarson & M. Bucan. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. - *Genome Res.* 17(11), 2007, 1665-1674.
382. Warburton, D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. - *Am J Hum Genet.* 49(5), 1991, 995-1013.
383. Watson, M. S., J. J. Gargus, K. J. Blakemore, S. N. Katz & W. R. Breg. Chromosome deletion 1q42-43. - *Am J Med Genet.* 24(1), 1986, 1-6.
384. Weber, M., J. J. Davies, D. Wittig, E. J. Oakeley, M. Haase, W. L. Lam & D. Schubeler. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. - *Nat Genet.* 37(8), 2005, 853-862.
385. Wellcome Trust Case Control Consortium & N. Craddock & M. E. Hurles & N. Cardin & R. D. Pearson & V. Plagnol, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. - *Nature.* 464(7289), 2010, 713-720.
386. Wellesley, D., P. Boyd, H. Dolk & S. Pattenden. An aetiological classification of birth defects for epidemiological research. - *J Med Genet.* 42(1), 2005, 54-57.
387. Weterings, E.D. C. van Gent. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. - *DNA Repair (Amst).* 3(11), 2004, 1425-1435.

388. Wheeler, D. A., M. Srinivasan, M. Egholm, Y. Shen, L. Chen, A. McGuire, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. - *Nature*. 452(7189), 2008, 872-876.
389. WHO. Management of birth defects and hemoglobin disorders. - Report of a joint WHO-March of dimes meeting. Geneva. Switzerland. 2006.
390. Wicker, N., A. Carles, I. G. Mills, M. Wolf, A. Veerakumarasivam, H. Edgren, et al. A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. - *BMC Genomics*. 8, 2007, 84.
391. Wilson, J. G. Environment and Birth Defects (Environmental Science Series), London, Academic Pr., 1973.
392. Wolff, D. J., L. J. Raffel, M. M. Ferre & S. Schwartz. Prenatal ascertainment of an inherited dup(18p) associated with an apparently normal phenotype. - *Am J Med Genet*. 41(3), 1991, 319-321.
393. Wong, K. K., R. J. deLeeuw, N. S. Dosanjh, L. R. Kimm, Z. Cheng, D. E. Horsman, et al. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. - *Am J Hum Genet*. 80(1), 2007, 91-104.
394. Wu, H., Kerr, M., Cui, X., Churchill, G. MAANOVA: A Software Package for the Analysis of Spotted cDNA Microarray Experiments In "The analysis of gene expression data: methods and software", New York, Springer, 2003. 313-341.
395. Yang, Y., E. K. Chung, Y. L. Wu, S. L. Savelli, H. N. Nagaraja, B. Zhou, et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. - *Am J Hum Genet*. 80(6), 2007, 1037-1054.
396. Yizhar, O., U. Matti, R. Melamed, Y. Hagalili, D. Bruns, J. Rettig & U. Ashery. Tomosyn inhibits priming of large dense-core vesicles in a calcium-dependent manner. - *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(8), 2004, 2578-2583.
397. Ylstra, B., P. van den Ijssel, B. Carvalho, R. H. Brakenhoff & G. A. Meijer. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). - *Nucleic Acids Res*. 34(2), 2006, 445-450.
398. Young, I. D., A. B. Rickett & M. Clarke. Genetic analysis of malformations causing perinatal mortality. - *J Med Genet*. 23(1), 1986, 58-63.
399. Zheng, Y. ChIP-on-chip for FoxP3. - *Methods Mol Biol*. 707, 2011, 71-82.
400. Zogopoulos, G., K. C. Ha, F. Naqib, S. Moore, H. Kim, A. Montpetit, et al. Germ-line DNA copy number variation frequencies in a large North American population. - *Hum Genet*. 122(3-4), 2007, 345-353.
401. Zuo, X., J. Zhang, Y. Zhang, S. C. Hsu, D. Zhou & W. Guo. Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. - *Nat Cell Biol*. 8(12), 2006, 1383-1388.
402. Zweier, C., U. Trautmann, A. Ekici & A. Rauch. A 15Mb duplication of 6q24.1-q25.3 associated with typical but milder features of the duplication 6q syndrome. - *Eur J Med Genet*. 51(4), 2008, 358-361.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:

гр. София

Подпис:

/Савина Хаджидекова/