

**Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta**

Studijní program:
Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Zuzana Slámová

**Záchyt submikroskopických aberací u fenotypově
abnormálních nosičů zjevně balancovaných chromozomových
přestaveb metodou array CGH**

*Detection of submicroscopic chromosomal aberrations in
phenotypically abnormal carriers of apparently balanced
rearrangements using array CGH*

Dizertační práce

Školitel: prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc.

Konzultant: Mgr. Miroslava Hančárová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 06. 06. 2020

Zuzana Slámová

Identifikační záznam

SLÁMOVÁ, Zuzana. *Záchyt submikroskopických aberací u fenotypově abnormálních nosičů zjevně balancovaných chromozomových přestaveb metodou array CGH. [Detection of submicroscopic chromosomal aberrations in phenotypically abnormal carriers of apparently balanced rearrangements using array CGH].* Praha, 2020. 111 s., 5 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol. Školitel Sedláček, Zdeněk, Prof. Ing. DrSc.

Poděkování

Zejména bych na tomto místě chtěla poděkovat svému školiteli prof. Ing. Zdeňkovi Sedláčkovi, DrSc. za nekonečnou trpělivost, věnovaný čas a motivaci k dokončení studia i vypracování závěrečné práce, za lidskost, pochopení a množství cenných rad. Neméně bych chtěla poděkovat mé drahé přítelkyni a vedoucí cytogenetického oddělení ÚBLG 2. LF UK a FN Motol, RNDr. Drahuší Novotné za nevyčerpatelný zájem a podporu. Rovněž děkuji mé konzultantce Mgr. Miroslavě Hančárové, Ph.D. za veškerou pomoc.

Děkuji všem kolegům z genetických laboratoří ÚBLG za pomoc a přátelskou podporu při vypracování této studie, kolektivu lékařů a sester genetické poradny pod vedením paní primářky MUDr. Markéty Havlovicové za spolupráci.

Velký dík patří i mé rodině, zejména manželovi, za podporu a důvěru po čas studia.

Tato dizertační práce by nevznikla bez podpory výzkumného záměru *0006420* a grantu *AZV 17-29423A*.

Abstrakt

Nosiči balancovaných chromozomových aberací (BCA) jsou obvykle fenotypově normální. Avšak až 27 % *de novo* vzniklých BCA může být spojeno s patologií fenotypu způsobenou nejčastěji submikroskopickou imbalance nebo genovou disrupcí v oblastech zlomových míst, případně vlivem pozičního efektu. Molekulárně cytogenetické techniky oproti karyotypování umožňují detailnější popsání aberace a tím usnadňují korelaci genotypu s fenotypem pacienta.

Cílem práce bylo zhodnocení výskytu variant v počtu kopií (CNV) v místech zlomů aberace i v jiných oblastech genomu u pacientů s abnormálním fenotypem, kteří byli nosiči *de novo* i familiárních BCA.

Metodou array CGH bylo vyšetřeno 54 případů BCA (20 *de novo*, 27 familiárních, 7 bez objasnění původu), z toho 32 recipročných translokací, šest robertsonských translokací, 12 inverzí a čtyři komplexní přestavby. U klinicky významných nálezů, bylo-li to možné, byli vyšetřeni i rodiče pacienta pro objasnění původu CNV. Za účelem upřesnění nálezů či vyloučení genové disrupce byla u vybraných případů použita metoda FISH.

U 31,5 % pacientů (17/54) byla zachycena alespoň jedna (z toho u osmi osob více než jedna) klinicky významná CNV. U čtyř případů byly zjištěny imbalance pouze v oblastech zlomových míst, u deseti pouze CNV jinde v genomu a u tří jedinců v oblastech zlomů i mimo ně. Z celkového počtu 34 relevantních CNV bylo za jasně patogenní označeno osm variant (23,5 %), za pravděpodobně patogenní pět variant (14,5 %) a 16 (47 %) za varianty nejasného klinického významu (VOUS); zbývající CNV byly pravděpodobně benigní, resp. benigní v oblastech zlomů. Ve třech případech byla prokázána vyšší komplexita BCA, vzniklé nejspíše následkem chromotripse. Ačkoli se celkové četnosti nálezů u případů *de novo* a familiárních BCA významně nelišily, byl pozorován rozdíl v lokalizaci a povaze CNV. Patogenní CNV v oblastech zlomových míst byly detekovány výhradně u *de novo* aberací. U pěti pacientů bez nálezu CNV byla kauzální mutace identifikována cíleným molekulárně genetickým vyšetřením, nejčastěji sekvenováním kandidátního genu.

Naše studie ve shodě s předchozími ukazuje, že podstatná část zjevně balancovaných aberací je ve skutečnosti nebalancovaná, a proto by metoda array CGH měla být nedílnou součástí podrobného vyšetření nejen *de novo*, ale i zděděných přestaveb.

Klíčová slova: array CGH, varianta v počtu kopií, zjevně balancovaná chromozomová aberace, abnormální fenotyp, *de novo* a familiární BCA

Abstract

Carriers of apparently balanced chromosomal aberrations (BCA) are usually phenotypically normal. However, it has been estimated that up to 27% of these BCA may be associated with an abnormal phenotype, most often caused by cryptic imbalances at the breakpoints, gene disruption by the breakpoint or via the position effect. In contrast to conventional karyotyping, molecular cytogenetic techniques enable more detailed BCA characterization and better correlation between genotype and phenotype of the patient.

The aim of this thesis was to evaluate the presence of copy number variants (CNVs) at breakpoints or elsewhere in the genome in patients with abnormal phenotype who carry *de novo* or inherited BCA.

54 BCA were investigated using array CGH (20 *de novo* cases, 27 inherited and 7 cases of unknown origin) including 32 reciprocal translocations, 6 robertsonian translocations, 12 inversions and 4 complex chromosomal rearrangements. If possible, the parents were also examined to ascertain the inheritance of the relevant CNVs. In order to specify microarray findings or exclude gene disruption, FISH was used in selected patients.

Among the patients included, in 31,5% (17/54) at least one (in 8 patients more than one) significant CNV was detected. Four cases carried cryptic imbalances only at the breakpoints, ten cases had only CNVs unrelated to the breakpoints, and in three individuals CNVs were detected both at breakpoints and elsewhere in the genome. In 17 patients 34 relevant CNVs were found; eight of them were pathogenic (23,5%), 5 likely pathogenic (14,5%), 16 of unknown significance (47%) and the remaining were likely benign or benign but localized at the breakpoints. In three cases the BCA showed a higher level of complexity, and probably originated from chromothripsis. The frequencies of imbalances detected in carriers of *de novo* and inherited BCA were similar, but there were differences in localization and clinical significance of the CNVs. Pathogenic breakpoint-associated imbalances were found exclusively in *de novo* cases. In five individuals with no CNVs causal monogenic mutation were identified, in most cases using sequencing.

Our results in accordance with previous studies show that a significant part of apparently BCA is in fact unbalanced, and that these rearrangements should be investigated using array CGH in carriers of both *de novo* and inherited BCA.

Key words: array CGH, copy number variant, apparently balanced chromosomal aberration, abnormal phenotype, *de novo* and familiar BCA

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam použitých zkratek.....	9
Úvod	11
Balancované chromozomové aberace	11
Komplexní chromozomové přestavby.....	12
Mechanismy vzniku BCA	14
Mechanismy patogenního působení BCA	16
Zdánlivě balancované aberace a CNV v oblastech zlomů.....	17
Genové disrupce.....	18
Poziční efekt a topologicky asociované domény (TADs).....	19
Somatické (získané) chromozomové přestavby a kancerogeneze	20
Metody pro vyšetřování BCA.....	21
Karyotypování.....	21
Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	22
Break-apart FISH (BA FISH)	22
Mnohobarevná FISH (mFISH)a mnohobarevné pruhování (mBAND).....	23
Komparativní genomová hybridizace (CGH).....	24
Microarray komparativní genomová hybridizace (aCGH)	24
Interpretace dat z array CGH.....	25
SNP array (SNPa)	27
Array painting	28
Sekvenování nové generace (NGS)	29
Cíle práce.....	32
Materiál a metody.....	33
Soubor pacientů	33
Skupina T	35
Skupina R.....	37
Skupina I	37
Skupina C.....	38
Metody.....	39
Postup vyšetřování souboru	39

Vyšetřované vzorky	42
Vyšetření karyotypu.....	42
Array komparativní genomová hybridizace (array CGH)	42
Stanovení klinické významnosti CNV	43
Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	44
FISH typu break-apart (BA FISH)	45
Doplňující vyšetření.....	46
Karyotypování buněk kostní dřeně	46
Methylation-Specific Multiplex ligation-dependent probe amplification (MS MLPA).....	46
Sekvenování Sangerovou metodou	46
Sekvenování nové generace (NGS).....	47
Výsledky a diskuze.....	48
Celkové rozdělení nálezů.....	48
Nálezy na zlomových místech a mimo ně	53
Patogenita/klinický význam CNV	55
Výsledky vyšetření array CGH - rozbor vybraných variant.....	58
Patogenní varianty	58
CNV související s přestavbou	58
CNV nesouvisející s přestavbou	61
Pravděpodobně patogenní varianty	70
CNV související s přestavbou	70
CNV nesouvisející s přestavbou	77
Vybrané varianty nejasného významu	79
CNV související s přestavbou	79
CNV nesouvisející s přestavbou	81
Výsledky vyšetření pacientů bez nálezu kauzální CNV	82
Disrupce genu zlomem chromozomu	82
Uniparentální heterodizomie chromozomu 15.....	86
Molekulárně genetické nálezy nezávislé na primární aberaci	87
Závěr.....	89
Použitá literatura	91
Přílohy- publikace z projektu postgraduálního studia autorky.....	111

Seznam použitých zkratek

AD	autozomálně dominantní
ADHD	porucha pozornosti a hyperaktivita (attention deficit hyperactivity disorder)
AR	autozomálně recesivní
ASO	alelově specifické oligonukleotidy (allele-specific oligonucleotide)
BA FISH	break-apart fluorescenční in situ hybridizace
BAC	umělý bakteriální chromozom (bacterial artificial chromosome)
BCA	balancované chromozomové aberace
BEN	benigní
CCR	komplexní chromozomová přestavba (complex chromosomal rearrangement)
CF	cystická fibróza
CFD	vrozená porucha tvorby fibrinogenu
CGH	komparativní genomová hybridizace (comparative genome hybridization)
ClinGen	Clinical Genome Resource
CML	chronická myeloidní leukémie
CNV	varianta v počtu kopií (copy number variation)
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
del	delece
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dup	duplikace
dUTP	deoxyuridin trifosfát
DWM	Dandy-Walkerova malformace
ES	exomové sekvenování
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FoSTeS	blokování replikační vidlice se záměnou templátu (fork stalling and template switching)
GCID	GeneCards identifikační číslo genu
GIT	gastrointestinální soustava
IGV	Integrative Genomics Viewer
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays
ISCN	The International System for human Cytogenomic Nomenclature
IUGR	intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retardation)
kb	kilobáze
LCR	repetice s nízkým počtem opakování (low copy repeat)
Mb	megabáze
mBAND	mnohobarevné pruhování (multicolor banding)
mFISH	mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace
MIM	Mendelian Inheritance in Man (katalog genetických chorob a genů)

MLPA	mnohonásobná na ligaci závislá amplifikace prób (multiplex ligation dependent probe amplification)
MMBIR	mikrohomologií zprostředkovaná a zlomem indukovaná replikace (microhomology-mediated break-induced replication)
MMEJ	mikrohomologií zprostředkované spojování konců (microhomology-mediated end joining)
MPS	mate-pair sekvenování
MR (LMR / SMR / TMR)	mentální retardace (lehká / střední / těžká mentální retardace)
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
MS MLPA	metylačně specifická mnohonásobná na ligaci závislá amplifikace prób
NAHR	nealelická homologní rekombinace (non-allelic homologous recombination)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NHEJ	spojování nehomologních konců (non-homologous end joining)
OI	Osteogenesis imperfecta
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAS	poruchy autistického spektra
PAT	patogenní
P BEN	pravděpodobně benigní
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PMR	psychomotorická retardace
P PAT	pravděpodobně patogenní
PWACR	kritický region pro syndrom Prader – Willi / Angelman (PWA critical region)
RA	rodinná anamnéza
RBM	mechanismus založený na replikaci (recombination based mechanism)
SKY	spektrální karyotypování
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SV	strukturní varianty
T8MS	syndrom mozaikové trizomie chromozomu 8 (trisomy 8 mosaic syndrome)
TAD	topologicky asociovaná doména
UPD	uniparentální dizomie
UCSC	University of California Santa Cruz (genomový prohlížeč)
VCC	vrozené vývojové vady srdce (vitium cordis congenitum)
VOUS	varianta nejasného významu (variant of unknown significance)
VVV	vrozená vývojová vada
WGS	celogenomové sekvenování (whole-genome sequencing)
WBS	syndrom Williams – Beuren
XLD	X vázaná dominantní (X-linked dominant)
XLR	X vázaná recesivní (X-linked recessive)

Úvod

Strukturní varianty (SV) jsou odchylky od normální struktury chromozomů. Některé SV mohou být patogenní, jiné i zcela benigní, představující součást přirozené variability genomu. Pokud při vzniku SV dochází ke změně množství genetického materiálu, označujeme je za nebalancované. Jedná se o delece a duplikace, jinak též varianty v počtu kopií (copy number variation; CNV), které jsou často asociované s abnormálním fenotypem [Feuk a kol., 2006]. Balancované chromozomové aberace (BCA) jsou strukturní přestavby úseků chromozomů se změnou lokalizace a/nebo orientace bez doprovodné ztráty či zmnožení genetického materiálu, zahrnující translokace, inverze a inserce.

Pokud jsou u jedinců s abnormálním fenotypem při karyotypování zaznamenány mikroskopicky pozorovatelné nebalancované chromozomové aberace, jsou obvykle pro velký rozsah a vysoký počet zasažených genů považovány za kauzální. Spojitost mezi postižením pacienta a zjevně balancovanou strukturní přestavbou (tedy takovou, co se při karyotypování jeví jako balancovaná) je mnohem obtížněji prokazatelná. Bylo popsáno mnoho mechanismů, kterými může i zcela balancovaná přestavba negativně ovlivnit fenotyp nosiče, zároveň však může být tato zjištěná aberace náhodným nálezem bez vztahu k postižení. Vyhodnocení nálezu zjevně balancované chromozomové přestavby je také značně limitováno rozlišovací schopností karyotypování a komplikováno vzájemnou podobností G – pruhů, což může vést již na samém počátku vyšetření k zavádějícím předpokladům.

Pro korelaci genotypu s fenotypem nosičů balancovaných chromozomových aberací je proto často nezbytné využití vyšetřovacích postupů a metod z různých odvětví klinické a laboratorní genetiky.

Ačkoliv bylo náplní postgraduálního studia autorky práce použití metody array CGH k detailnímu charakterizování obou typů strukturních přestaveb (nebalancovaných i balancovaných), k vypracování dizertační práce byly pro jejich jedinečnost a specifitu vybrány pouze balancované chromozomové aberace.

Balancované chromozomové aberace

BCA, které, jak bylo uvedeno výše, nezahrnují ztrátu či zmnožení genetického materiálu, mohou být jednoduché jako reciproké translokace, robertsonské translokace a inverze, ale i složité komplexní přestavby, viz dále. Prevalence celkového výskytu mikroskopicky pozorovatelných BCA v běžné populaci je stanovena na 1:500 – 1:1000 [Jacobs a kol., 1974; Nielsen a kol., 1991; Ravel a kol., 2006], u *de novo* vzniklých přestaveb

dosahuje hodnot 1:2000, u robertsonských translokací až 1:9000 [Warburton, 1991]. Odhadovaná frekvence translokací je přitom oproti inverzím a robertsonským translokacím (oboje ~ 1:1100) vyšší (~ 1:560) [Forabosco a kol., 2009].

Balancované chromozomové přestavby nejsou obvykle doprovázeny abnormitami fenotypu a jsou často v rodině inaparentně děděny. Jediným zřejmým příznakem přenašečství BCA bývají poruchy reprodukce v důsledku vzniku nebalancovaných gamet. Přítomnost BCA může být případně odhalena až poté, co se nosiči narodí postižený potomek s nebalancovanou formou aberace. Incidence výskytu abnormálního fenotypu u nosičů *de novo* vzniklé BCA byla donedávna odhadována na 6 % (u translokací) – 9 % (u inverzí) [Warburton, 1991]. Nyní se předpokládá, že až 27 % všech zjevně balancovaných aberací může být spojeno s patologií, a ta se navíc nemusí projevit pre- či perinatálně, ale až později, ve vyšším věku nosiče [Halgren a kol., 2018].

Vývoj molekulárně cytogenetických metod s rozlišením převyšujícím konvenční G – pruhování, tedy fluorescenční in situ hybridizace (FISH) [Fantes a kol., 2008] a microarray [Gribble a kol., 2005], přispěl k pochopení mechanismů patogenního působení zjevně balancovaných přestaveb [Wilch a Morton, 2018]. V současné době je pro přesné určení zlomových míst BCA doprovázených abnormálním fenotypem nosiče využíváno také sekvenování nové generace (NGS) [Chen a kol., 2008, 2010; Alkan a kol., 2011; Suzuki a kol., 2014; Redin a kol., 2017; Schluth-Bolard a kol., 2019]. Tato metoda dále významně rozšířila znalosti o vzniku, patofyziologii, ale i o skutečných frekvencích výskytu a vzájemných poměrech typů submikroskopických BCA. Na základě zmíněných studií bylo zjištěno, že značná část všech cytogeneticky identifikovaných BCA (až 21 % podle Redin a kol., 2017 a až 28,5 % podle Schluth-Bolard a kol., 2019) je ve skutečnosti komplexnější, než se původně předpokládalo. Studium nosičů BCA s postižením fenotypu a nyní i přesné stanovení zlomového místa přestavby narušujícího konkrétní oblast genomu přispívá k poznání nových genů, jejich funkcí a případně morbidity [Tommerup, 1993; McKusick a kol., 1993; Bugge a kol., 2000; Higgins a kol., 2008; Vandeweyer a Kooy, 2009; Weischenfeldt a kol., 2013; Hofmeister a kol., 2015].

Komplexní chromozomové přestavby

Komplexní chromozomové přestavby (complex chromosome rearrangement; CCR) jsou definovány jako strukturní aberace, pro jejichž vznik bylo potřeba více než dvou chromozomových zlomů. Mezi komplexní přestavby lze tedy zařadit translokace s inzercí a aberace sestávající z různých kombinací jednodušších typů strukturních přestaveb.

V minulosti byly CCR považovány za extrémně vzácné, ale s rozvojem citlivější detekce pomocí molekulárních metod se ukazuje, že jejich výskyt byl značně podhodnocen.

Komplexní přestavby jsou častěji než jednoduché aberace doprovázeny imbalancemi v místech zlomů, genovými disrupcemi a jinými patogenními jevy, které se navíc mohou v rámci jedné CCR kombinovat [Poot a Haaf, 2015]. Se zvyšující se komplexitou přestavby a tedy rostoucím počtem chromozomových zlomů klesá pravděpodobnost, že bude aberace balancovaná a nosič bude bez postižení. Zároveň se snižuje pravděpodobnost balancovaného potomstva nosiče a tím přenos CCR do další generace; mužští nosiči balancovaných komplexních aberací bývají navíc často sterilní v důsledku poruchy spermatogeneze [Pellestor a kol., 2011; Nguyen a kol., 2015]. Proto jsou aberace s vysokou komplexitou obvykle *de novo* původu a jejich skutečně balancovaná forma velice vzácná.

V souladu s výše zmíněným lze komplexní aberace rozdělit do tří skupin [Kausch a kol., 1988]. První skupinu tvoří CCR představované dvěma nebo více nezávislými reciprokými translokacemi, které v meióze vytvoří dva nebo více kvadrivalentů. Normální a derivované chromozomy pak segregují obvyklým způsobem, vytvářejíce tak balancované a nebalancované formy gamet. Tato forma CCR, ačkoli je také doprovázena poruchami fertility a rizikem narození postiženého potomka, může být familiární a při mezigeneračním přenosu je vzácně i zjednodušena o jeden pár translokačních derivátů. Druhou skupinu představují komplexní přestavby formované z více než dvou chromozomů, z nichž každý je přerušen pouze jedním zlomem. V meióze se chromozomy párují do podoby multivalentu a poměr balancovaných gamet oproti nebalancovaným je již podstatně snížený. Třetím typem CCR jsou přestavby vzniklé jako důsledek zlomů, jejichž celkový počet je vyšší než počet participujících chromozomů. Tyto přestavby obsahují inzertované a invertované úseky zvyšující jejich komplexitu i složitost meiotického párování do té míry, že balancované gamety nejsou prakticky vytvářeny. Původ těchto CCR bývá nejčastěji *de novo*, ve vzácných případech však může dojít i k familiárnímu přenosu aberace a vlivem meiotické rekombinace derivovaného chromozomu s normálním může být dokonce zjednodušena o inzertované úseky [Madan a kol., 1997; Madan, 2012].

Zvláštním typem zjevně balancovaných CCR jsou komplexní intrachromozomové přestavby postihující pouze jeden chromozom. Jedná se o komplexní inverze a translokace s inzercí v rámci jednoho chromozomu. Intrachromozomové CCR, stejně jako interchromozomové přestavby, charakterizované vysokým počtem zlomů, jsou často důsledkem chromozomové katastrofy, tzv. chromotripse (viz dále).

Mechanismy vzniku BCA

De novo balancované přestavby mají obvykle paternální původ a vznikají během mitotické fáze spermatogeneze [Thomas a kol., 2010] s výjimkou robertsonských translokací, které jsou převážně maternálního původu [Page a kol., 1996; Bandyopadhyay a kol., 2002, Thomas a kol., 2010]. Bylo popsáno několik mechanismů, které se mohou spolupodílet na formování balancovaných strukturních aberací. U jednoduchých přestaveb se nejčastěji jedná o dva reparační mechanismy využívané k opravě dvouřetězcových zlomů, tj. spojování nehomologních konců (non-homologous end joining; NHEJ) [Chiang a kol., 2012; Redin a kol., 2017; Schluth-Bolard a kol., 2019] a spojování konců zprostředkované mikrohomologií (microhomology-mediated end joining; MMEJ) [Gu a kol., 2008; Lieber, 2010; Nilsson a kol., 2017; Schluth-Bolard a kol., 2019]. U komplexních přestaveb se často jedná o kombinaci NHEJ a MMEJ s jinými, dále zmíněnými mechanismy.

Rekurentní translokace mohou vzácně vznikat mechanismem nealelické homologní rekombinace (non-allelic homologous recombination; NAHR) [Giglio a kol., 2002; Ou a kol., 2011; Lupski, 2015], indukované sekvenční podobností segmentálních repetitivních nebo LCR (low copy repeat) oblastí [Stankiewicz a Lupski, 2002].

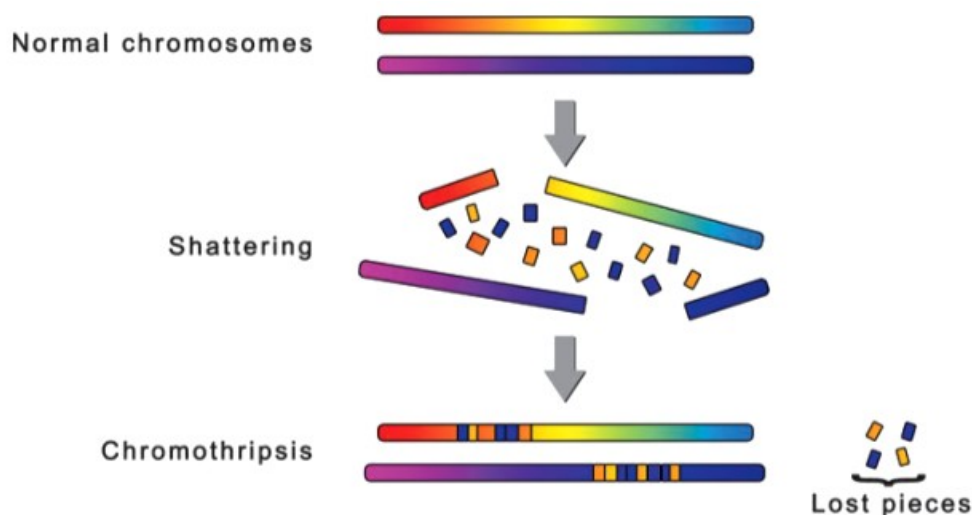
Mechanismy založené na replikaci (replication based mechanism; RBM) [Hastings a kol., 2009], tj. mikrohomologií mediovaná a zlomem indukovaná replikace (microhomology-mediated break-induced replication; MMBIR) a blokování replikační vidlice se záměnou templátu (fork stalling and template switching; FoSTeS) se mohou podílet na vzniku intra- a interchromozomových komplexních přestaveb [Carvalho a kol., 2011; Liu a kol., 2012] i rekurentních zjevně balancovaných translokací [Kato a kol., 2012].

Robertsonské translokace pravděpodobně vznikají homologní rekombinací v oblastech repetitivních sekvencí krátkých ramen sdílených všemi akrocentrickými chromozomy. Proto se až na vzácné výjimky zlomy nacházejí v oblastech krátkých ramen obou zúčastněných chromozomů. Výjimečně je zlom jednoho nebo obou akrocentrických chromozomů lokalizován v blízkosti centromery na dlouhých ramenech nebo v oblasti satelitu. V těchto případech je možné zvažovat odlišný mechanismus vzniku derivovaného chromozomu, a sice náhodné zlomy a následné chyby při reparaci v období, kdy jsou proximální oblasti akrocentrů seskupeny při formaci jádérka [Page a kol., 1996].

Komplexní chromozomové přestavby vznikají mechanismem chromoanageneze [Holland a Cleveland, 2012]. Tento termín zastřešuje všechny dosud popsané způsoby

formování CCR, z nichž nejběžnější jsou chromotripse, chromoanasyntéza a chromoplexe [Masset a kol., 2016; Collins a kol., 2017, Marcozzi a kol., 2018, Pellestor, 2019].

Nejdéle známým a nejvíce prostudovaným způsobem vzniku CCR je chromotripse [Stephens a kol., 2011; Maciejowski a kol., 2015] (Obr. 1). Tento jev předpokládá jedinou katastrofickou událost doprovázenou rozpadem chromozomového materiálu na mnoho segmentů, které jsou následně přestavěny a pospojovány v náhodném pořadí i orientaci, přičemž některé fragmenty mohou být ztraceny. Tato událost se může týkat pouze jediného chromozomu [Genesio a kol., 2015] anebo i více chromozomů [Kloosterman a kol., 2011; 2012; 2013; Chiang a kol., 2012; Nazaryan a kol., 2014; Eisfeldt a kol., 2019], mezi nimiž při reparaci obvykle dochází k translokacím a inzercím.



Obr. 1. Mechanismus chromotripse. Převzato z Marcozzi a kol. [2018].

Pokud komplexní přestavba není doprovázena výhradně delecemi, ale i amplifikacemi, lze uvažovat spíše o druhém typu chromoanageneze, kterým je chromoanasyntéza. Ke vzniku duplikací a triplikací dochází pravděpodobně cestou RBM.

Chromoplexe je charakterizována především vysokým počtem derivovaných chromozomů, ale oproti chromotripsí menším počtem zlomů a intrachromozomových přestaveb, a také obvykle bez doprovodu CNV. Nevzniká náhle během jedné chromozomové katastrofy, ale nejspíše postupně během několika buněčných cyklů. Zásadní rozdíly mezi třemi výše popsanými způsoby vzniku CCR shrnuje tabulka 1.

Tab. 1. Přehled typů chromoanageneze CCR. Převzato z Marcozzi a kol. [2018], upraveno.

	Chromotripse	Chromoanasyntéza	Chromoplexe
Počet událostí vedoucích ke vzniku CCR	Jedna	Jedna či více	Více
Strukturní varianty	Balancované nebo delece	Balancované, delece, duplikace/triplikace	Balancované, příležitostně delece
Počet zúčastněných chromozomů	Málo (1 – 4)	Málo (často jeden)	Mnoho (více než pět)
Množství zlomů	Mnoho (více v nádorových než v zárodečných CCR)	Méně (obvykle 5 – 25)	Méně (obvykle 5 – 25)
Zlomová místa (breakpoint signature)	Tupé konce (malé inserce)	Mikrohomologie	Tupé konce
Mechanismus vzniku CCR	NHEJ	MMBIR/FoSTes	NHEJ

Mechanismy patogenního působení BCA

Bylo popsáno mnoho různých mechanismů, kterými může být způsoben abnormální fenotyp nosičů zjevně balancované přestavby (odhlédneme-li od skutečnosti, že může být náhodně zapříčiněn negenetickými faktory). Zastoupení jednotlivých mechanismů u případů BCA se odlišuje v závislosti na tom, zda se jedná o familiární nebo *de novo* vzniklou aberaci.

U nově vzniklých přestaveb bývá abnormální fenotyp nosiče nejčastěji zapříčiněn kryptickými imbalancemi v místech zlomů, popřípadě přímou disrupcí protein kódujících genů citlivých na haploinsuficienci. Mimoto může být přestavbou ovlivněna intergenová oblast uplatňující se v expresní regulaci blízkého či vzdáleného genu. Zmíněné tři převažující mechanismy, tj. patogenní CNV, genové disrupce a poziční efekt, budou dále v textu samostatně rozvedeny.

Mezi vzácněji zaznamenané příčiny patologického fenotypu nosiče *de novo* BCA lze zařadit porušení funkce genu s gonozomálně recesivní dědičností (X-linked recessive, XLR) zlomem translokace t(X;autozom) [Imai a kol., 2006] či odmaskování mutace v XLR genu na derivovaném chromozomu X [Ledig a kol., 2015] v důsledku současné nenáhodné inaktivace normálního chromozomu X, dále disrupci imprintované oblasti genomu zlomem BCA [Conroy a kol., 1997], vznik nefunkčního (příp. malfunkčního) proteinu fúzí genů na spoji přestavby [Backx a kol., 2011; Córdova-Fletes a kol., 2015] nebo odhalení patogenní varianty v genu pro autozomálně recesivní (AR) poruchu, u něhož porušení druhé alely

zlomem aberace vede k funkční homozygotitě [Naritomi a kol., 1989]. Abnormální fenotyp probanda také nemusí s přestavbou nijak souviset a může být zapříčiněn patogenní *de novo* CNV či variantou v genu s autozomálně dominantní dědičností (AD) jinde v genomu [Aristidou a kol., 2017].

V případech, kdy je u probanda s abnormálním fenotypem nalezena BCA zděděná od nepostiženého rodiče, je kromě možného mechanismu patogeneze přestavby nutno objasnit i diskordanci fenotypu obou nosičů. Nejčastěji bývá příčinou nově vzniklá patogenní CNV, nezávislá na zděděné benigní přestavbě. Kauzální imbalance může být zjištěna i v místě zlomu/ů [Sismani a kol., 2008], ale se sníženou penetrancí projevu [Cooper a kol., 2013], případně v podobě kryptické CCR vzniklé následkem rekombinace mezi rodičovským normálním a derivovaným chromozomem [Patsalis a kol., 2004; South a kol., 2010]. Abnormální fenotyp nosiče familiární BCA může být, podobně jako u *de novo* přestaveb, způsoben funkční homozygotitou genu s autozomálně recesivní dědičností (AR), jehož jedna alela je inaktivní v důsledku zlomu zděděné aberace a funkce druhé je narušena patogenní variantou zděděnou od druhého rodiče, případně vzniklou *de novo* [Bühler, 1983]. U familiárních přestaveb, kde participující chromozomy nesou imprintované oblasti, může chybou meiotické segregace docházet u potomků k uniparentální dizomii a s ní spojenými abnormitami fenotypu [Dupont a kol., 2002; Calounova a kol., 2006; Moradkhani a kol., 2019].

Zdánlivě balancované aberace a CNV v oblastech zlomů

Studie založené na metodě array CGH, které se zabývaly soubory nosičů *de novo* i familiárních zjevně balancovaných aberací s postižením fenotypu, uvádějí celkový nález abnormálních CNV v genomu u 30 – 50 % případů [Kirchhoff a kol., 2000; Gribble a kol., 2005; Ciccone a kol., 2005; Bisgaard a kol., 2006; De Gregori a kol., 2007; Sismani a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009; Gijssbers a kol., 2010; Feenstra a kol., 2011]. Nebyl zjištěn významný rozdíl v celkovém zachytu CNV u familiárních a *de novo* aberací [Ciccone a kol., 2005; Bisgaard a kol., 2006; Sismani a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009].

Odlišnost zjištěných CNV v obou skupinách spočívá v jejich lokalizaci a patogenitě [Aristidou a kol., 2017 a 2018]. U případů familiárních BCA bývají patogenními obvykle další zjištěné CNV, nezávislé na primárně zkoumané aberaci. Zděděné CNV v oblastech zlomů jsou u nich méně časté, a pokud tam jsou, bývají obvykle benigní. U *de novo* aberací jsou CNV v místech zlomů nacházeny oproti familiárním až dvakrát častěji (u 40 %, u CCR

až 75 % případů) a převažujícími CNV jsou delecce, často hodnocené jako patogenní [Sismani a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009; Feenstra a kol., 2011].

Příkladem z literatury, kdy imbalance v oblasti zlomového místa *de novo* přestavby způsobila patologii fenotypu, může být nosička translokace t(6;13)(q23;q32) s kryptickou delecí v oblasti zlomu 13q32 [Mademont-Soler a kol., 2010]. Dívka byla vyšetřovaná pro Dandy-Walkerovu malformaci (DWM) mozku, kolobom duhovky, hluchotu a hyperlaxicitu kůže a kloubů. Array CGH u ní odhalila 2,47 megabázovou (Mb) delecí 13q32 oblasti, která byla již dříve popsána ve spojitosti s DWM a kolobomem duhovky. Tato delecce patřila k nejmenším v té době popsaným a zúžila stanovený kritický region pro DWM a kolobom v této oblasti. Ve spojitosti s hluchotou, která se u pacientů s delecemi 13q32 obvykle nevyskytuje, byla metodou FISH ověřována možná disrupce kandidátního genu *EYAA4* v oblasti zlomového místa 6q23.2. Toto podezření se však nepotvrdilo.

Genové disrupce

Ze studií BCA založených na celogenomovém sekvenování vyplývá, že ke zlomům DNA, vedoucím ke vzniku nerecurrentních strukturních přestaveb, dochází náhodně bez zásadního vlivu architektury DNA a repetitivních sekvencí [Erdogan a kol., 2006; Chen a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2019]. Navíc zřejmě není rozdíl ve frekvenci, se kterou dochází ke genovým disrupcím následkem zlomů u bezpříznakových a fenotypově abnormálních nosičů BCA [Baptista a kol., 2008; Nilsson a kol., 2017] a která činí 35 – 50 % [Baptista a kol., 2008; Fantes a kol., 2008; Nilsson a kol., 2017; Schluth-Bolard a kol., 2019]. Zatímco u nosičů s normálním fenotypem dochází k disrupcím mimo geny nebo v genech bez asociace s poruchami, případně spojených s AR onemocněními [Nilsson a kol., 2017], u přestaveb doprovázených abnormálním fenotypem jsou významně častěji postiženy geny citlivé na dávku spojené s AD poruchou či geny exprimované v embryogenezi. Xu a kol. [2016] popsali případ pacienta se vzácným typem osteogenesis imperfecta (OI), u něhož byla identifikována translokace t(5;7)(q32;q21.3). Zlomovým místem 7q21.3 je disruptován gen *COL1A2*, jehož mutace jsou spojeny s AD OI typu 2. Jednalo se o první popsany případ této poruchy zapříčiněný BCA.

Genovými disrupcemi lze odůvodnit postižení u podstatné části nosičů bez nálezů patogenní CNV, Redin a kolektiv [2017] udávají 20 %, Schluth-Bolard a kol. [2019] až 30 %.

Mimoto, většina analýz zlomů u zjevně balancovaných aberací se zabývá nosiči s postižením fenotypu, které je patrné perinatálně, případně s časným nástupem. Avšak mnohé přestavby mohou být doprovázeny disrupcemi genů zapříčiňujících poruchy, jejichž projev

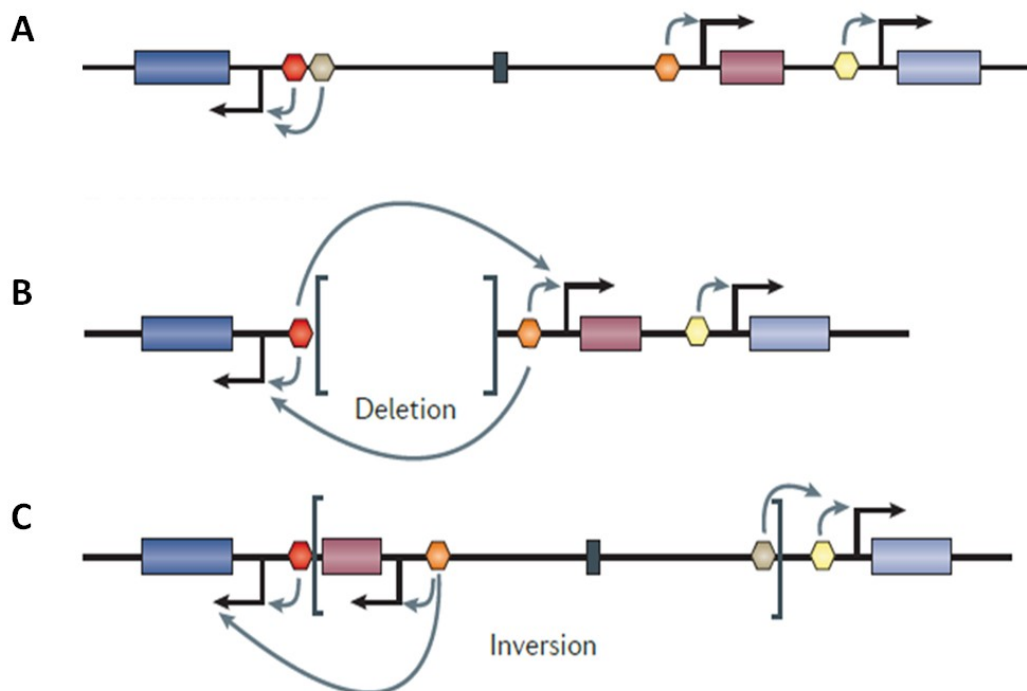
může mít pozdní nástup, jak dokládá identifikace kandidátních genů pro schizofrenii [Blackwood a kol., 2001], diabetes [Gloyn a kol., 2002], dyslexii [Taipale a kol., 2003] a psoriázu [Tzschach a kol., 2006]. Proto je u těchto původně zdravých nosičů BCA nejpozději v době projevu choroby rovněž vhodné doplnění analýzy zlomových míst [Bache a kol., 2006].

Poziční efekt a topologicky asociované domény (TADs)

BCA může narušit funkci genu nejen přímou disrupcí zlomem, ale i narušením jeho správné exprese různými mechanismy pozičního efektu (Obr. 2). Prvním je znemožnění kontaktu promotoru genu a transkripční jednotky s příslušnými *cis*-regulátory, ať už přímou disrupcí některé z oblastí zlomem či jejich disociací vlivem translokace (inverze) [Kleinjan a van Heyningen, 2005; Benko a kol., 2009]. Regulátor může také přenesením v rámci přestavby uplatnit svůj vliv na promotor genu přítomného v nové oblasti a ovlivnit jeho expresi. Trembath a kol. [2004] popisují případ dvou pacientek s fenotypem typickým pro AD Riegerův syndrom (anomálie očí, dentice a pupku) a s odlišnou balancovanou translokací $t(4;16)(q26;q22)$ a $t(4;11)(q27;q21)$, sdílející zlomové místo na 4q v blízkosti genu *PITX2*, jehož mutace způsobují tento syndrom. V obou případech byl tento gen intaktní, jeho exprese však byla silně utlumena vlivem regulátoru z translokované oblasti.

Druhým mechanismem je změna struktury chromatinu, jehož správná konformace je nezbytná pro interakci promotorů některých genů se vzdálenými regulátory a tím pro jejich bezchybnou expresi. V rámci organizace savčího genomu byly popsány vysoce konzervované úseky DNA, jejichž chromatinové uspořádání umožňuje vzájemné prostorově vymezené funkční interakce [Dixon a kol., 2012; Rao a kol., 2014]. Tyto topologicky asociované domény (TADs), obvykle v délce několika Mb, lze považovat za základní regulační jednotky genomu [Dixon a kol., 2016] ovlivňující transkripci genů, které do příslušné domény spadají. Smyčky chromatinu v rámci domény umožňují fyzický kontakt promotorů s příslušnými regulačními elementy, které tak mohou být vzdálené stovky kilobází, až megabáze od regulovaných genů [de Laat a Duboule, 2013]. TADs jsou definovány hranicemi, které znemožňují vzájemné ovlivnění genů regulačními mechanismy jiné domény. Tyto hranice jsou zřejmě nezbytné pro správnou funkci domén a jejich disrupce a změna topologie zapříčiněná strukturními přestavbami může vést k deregulaci genové exprese [Lupiáñez a kol., 2015], ať již ve smyslu jejího posílení nebo utlumení. Navíc má balancovaná přestavba vliv na pozici derivovaných chromozomů v rámci organizace jádra, což může také změnit míru exprese některých genů [Harewood a kol., 2010]. Těmito jevy lze odůvodnit mnohé

přestavby s intergenovými zlomy doprovázené patologickým fenotypem nosiče [Lupiáñez a kol., 2016; Redin a kol., 2017]. Nicméně definovat klinický význam BCA, která nepůsobuje přímou disrupci konkrétního genu, není snadné. Zepeda-Mendoza a kol. [2017] se pomocí speciálního algoritmu snažili o identifikaci kauzálních genů u pacientů s balancovanými přestavbami, jejichž zlomy se nacházejí v extragenových oblastech. Výsledkem bylo odhalení mnoha složitých interakcí mezi geny a jejich regulátory, vzdálenými i několik megabází, jejichž přerušení aberacemi může vést ke genové dysfunkci.



Obr. 2. Ovlivnění exprese genů pozičním efektem. **A.** Normální oblast genomu bez strukturních přestaveb, barevnými obdélníky jsou vyznačeny geny s regulačními elementy (šestiúhelníky znázorňují tkáňově specifické enhancery, působící na šipkami označený gen, a černý obdélník represor blokující aktivitu regulačních elementů). **B.** Delece represoru změní možnosti působení enhancerů na blízké geny. **C.** Přemístění enhancerů vlivem inverze ovlivní expresi genů v cílové oblasti. Převzato z Weischenfeldt a kol. [2013], upraveno.

Somatické (získané) chromozomové přestavby a kancerogeneze

Kromě výše uvedených mechanismů a příkladů germinálních přestaveb spojených s postižením je zvláštním typem patogenního působení BCA také zapojení somatických (získaných) přestaveb v buněčné transformaci a onkogenezi. V karyotypu nádorových buněk jsou nacházeny jednak náhodné individuální změny v počtu a ve struktuře chromozomů, ale i specifické chromozomové přestavby, které se konzistentně vyskytují u určitých typů nádorů a

mají často zásadní diagnostický i prognostický význam. Náhodný výskyt specifické přestavby v somatické buňce může započít nádorovou transformaci dvěma možnými mechanismy.

Prvním je genová fúze následkem BCA a vznik chimerického proteinu. Klasickým příkladem je reciproká translokace $t(9;22)(q34;q11)$ [Rowley, 1973], při které vzniká tzv. Philadelphský chromozom (Ph chromozom) [Nowell a Hungerford, 1960], na jehož spoji se nachází fúzní gen *BCR/ABL* [Shtivelman a kol., 1985]. Následkem genové fúze získává protoonkogen *ABL* silný promotor genu *BCR* a díky změněné struktuře nového chimérického proteinu nereaguje na regulaci. Výsledkem je vysoce exprimovaný onkogen stimulující buňky k nekontrolovatelné proliferaci [Konopka a kol., 1984]. Tato přestavba je obvykle nacházena u 95 % nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML).

Druhým mechanismem je aktivace protoonkogenu (nejčastěji transkripčního faktoru), do jehož blízkosti se vlivem přestavby dostal gen pro T-buněčný receptor nebo imunoglobulin. Příkladem je translokace $t(8;14)(q24;q32)$, mající spojitost se vznikem Burkittova lymfomu. Následkem přestavby se protoonkogen *c-MYC*, kódující transkripční faktor zapojený v buněčném cyklu, přesouvá do blízkosti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, který je silně exprimován [Taub a kol., 1982].

Metody pro vyšetřování BCA

Karyotypování

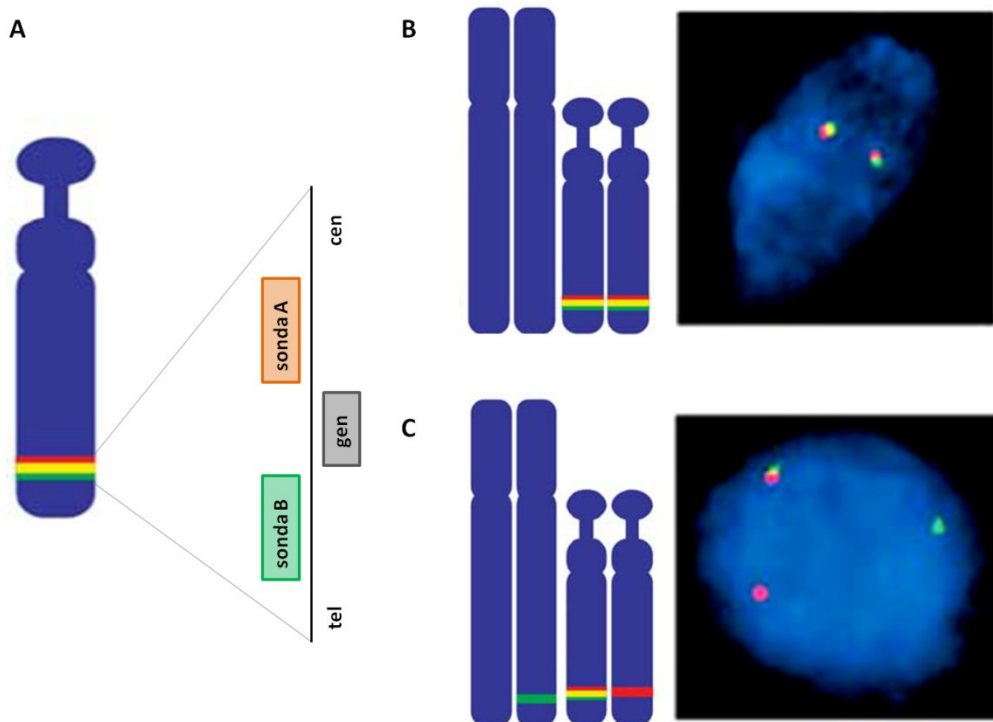
Karyotyp se nejčastěji stanovuje metodou G – pruhování, kdy je preparát s fixovanými interfázními jádry a volnými metafázními chromozomy (tzv. mitózami) vystaven působení trypsinu [Sanchez O a kol., 1973]. Po narušení proteinové struktury chromozomů enzymem je preparát obarven barvivem Giemsa-Romanowski nebo Wrightovým barvivem, čímž na chromozomech dojde k vytvoření příčných tmavých pruhů pozorovatelných ve světelném mikroskopu. Počet a vzorec pruhů je pro každý chromozomový pár specifický a konstantní, lze proto na jeho základě identifikovat a popsat odchylky od normální struktury chromozomu, tedy i balancované přestavby. Popis aberací je sjednocen podle platné verze mezinárodní cytogenetické nomenklatury (The International System for Human Cytogenomic Nomenclature; ISCN). Rozlišovací schopnost metody se odvíjí od kvality preparátu a stupně spiralizace chromozomů v době jeho přípravy, určující počet rozlišitelných pruhů. Při obvyklém rozlišení 400 – 500 pruhů na haploidní chromozomovou sadu lze identifikovat přestavby o minimálním rozsahu 5 – 10 Mb [McGowan-Jordan a kol., 2016].

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Metoda FISH je založena na hybridizaci sond, nejčastěji fluorescenčně značených krátkých úseků DNA, ke komplementárním oblastem metafázních chromozomů a interfázních jader na preparátu [Pinkel a kol., 1986]. Přítomnost a lokalizace signálů sond je hodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Na rozdíl od konvenčního cytogenetického vyšetření lze přítomnost a počet lokus specifických signálů, tedy delece a amplifikace testovaného regionu, hodnotit i na interfázních jádrech. Pro vyšetřování balancovaných přestaveb však musí být i u této metody získány kvalitní mitózy, na kterých je možné s jistotou prokázat změněnou vzájemnou polohu signálů sond na derivovaných chromozomech. Pro účely podrobnějšího hodnocení BCA, zejména CCR, jsou používány speciální modifikace metody FISH a sice break-apart FISH (BA FISH), mnohobarevná FISH (mFISH) a mnohobarevné pruhování (mBAND).

Break-apart FISH (BA FISH)

BA FISH sondy byly navrženy pro detekci translokací coby nejběžnějšího typu přestaveb u nádorových buněk a rutinně jsou využívány k určení diagnózy a prognózy pacientů v onkocytogenetice. Dají se však využít i při vyšetření konstitučních balancovaných přestaveb, zejména pokud je vysloveno podezření na disrupci konkrétního kandidátního genu nacházejícího se v oblasti zlomu aberace. BA sondy sestávají ze dvou dceřiných sond, značených odlišnými fluorochromy, které jsou komplementární k sekvencím přiléhajícím ke 3' a 5' konci testovaného kandidátního genu. Vzhledem k těsné blízkosti obou sond vzniká v případě intaktního genu fúzní signál. Pokud je gen disruptován zlomem přestavby, fúzní signál zmizí a na derivovaných chromozomech je možné pozorovat oddělené, různě barevné signály (Obr. 3).



Obr. 3. Break-apart FISH. **A.** Schéma umístění sond v blízkosti cílového genu. **B.** Dva fúzní signály v případě, že cílový gen nebyl poškozen zlomem translokace. **C.** Oddělení signálů sond při disrupci genu translokací. Převzato z Falzarano a kol. [2010], upraveno.

Mnohobarevná FISH (mFISH) a mnohobarevné pruhování (mBAND)

Rovněž metody mFISH a mBAND jsou modifikacemi FISH používanými převážně v onkocytogenetice k identifikaci všech chromozomů participujících ve složitých přestavbách doprovázejících proces nádorového bujení. Obě tyto metody lze však rovněž využít u konstitučních komplexních aberací vzniklých germinální chromoanagenezí.

Principem metody mFISH je označení každého autozomového páru a gonozomů X a Y jinou falešnou barvou, která je mu příslušným softwarem přidělena na základě konkrétní kombinace pěti různých fluorochromů [Speicher a kol., 1996; Liehr a kol., 2004]. Těmi jsou značeny nejčastěji celochromozomové sondy pro malovací mFISH, využít lze ale i centromerické sondy pro mnohobarevné značení centromerických oblastí chromozomových párů. Stejně kombinatorické značení využívá metoda spektrálního karyotypování (spectral karyotyping; SKY), pro zachycení signálů sond je při ní využíván spektrometr, zatímco u mFISH je to sada optických filtrů.

Metoda mBAND je rovněž založena na kombinaci pěti fluorochromů, kterými jsou označeny malovací sondy komplementární k různým oblastem konkrétního chromozomového

páru. Charakteristický mnohobarevný vzorec pruhování je vytvářen překryvem těchto odlišně značených úseků, přičemž na základě kombinace jednotlivých fluorochromů jsou pruhům opět softwarově přiřazeny falešné barvy. Tato metoda je vhodná pro identifikaci, popřípadě zpřesnění intrachromozomových přestaveb, především inverzí.

Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Metoda je založena na současné hybridizaci odlišně značených genomových DNA dvou vzorků, jednoho testovaného od pacienta a druhého referenčního (tj. normální DNA), s DNA ve struktuře normálních metafázních chromozomů fixovaných na sklíčku ve formě preparátu. Při vyhodnocování pomocí fluorescenčního mikroskopu lze na metafázních chromozomech pozorovat úseky s převažujícím signálem testovaného vzorku (amplifikace dané oblasti u pacienta) nebo kontrolního vzorku (delece dané oblasti u pacienta), popřípadě rovnocennou intenzitu obou vzorků projevující se jako fúzní signál. Pomocí komparativní genomové hybridizace lze jedinou hybridizační reakcí analyzovat celý genom pacienta a odhalit tak najednou všechny odchylky od normálního počtu kopií při rozlišovací schopnosti 5 – 10 Mb. Před zavedením metody array CGH byla využívána mimo jiné pro detekci imbalancí v místech zlomů BCA [Kirchhoff a kol., 2000]. Metoda však neumožňuje identifikaci balancovaných přestaveb.

Microarray komparativní genomová hybridizace (aCGH)

Metoda array CGH byla odvozena od klasické CGH a principem se jí podobá. I zde jsou odlišnými fluorochromy značené genomové DNA pacienta a kontroly hybridizovány s referenční normální genomovou DNA. Metafázní chromozomy však byly nahrazeny velkým množstvím fragmentů DNA, představujících jednotlivé vyšetřované lokusy. Každý fragment je v mnoha kopiích navázán ve formě spotu (tečky) na podložním skle nebo jiném nosiči, tzv. čipu. Konkrétní formát čipu, určující rozlišovací schopnost vyšetření, je charakterizován počtem spotů, tedy vyšetřovaných lokusů, ale i délkou a povahou DNA sond navázaných na nosiči. Jedná-li se o čip typu BAC aCGH, délka sond se pohybuje nejčastěji kolem 150 kilobází (kb) a rozlišovací schopnost vyšetření je udávána v rozmezí 0,5 – 2 Mb. V rutinní diagnostice je však častěji využíván čip typu oligo aCGH, u něhož je obvyklá délka DNA fragmentů 60 nukleotidů a rozlišovací schopnost dosahuje hodnot desítek kilobází. Rozlišovací schopnost oligo čipů však nemusí být ve všech oblastech genomu stejná. Čipy pro rutinní diagnostické využití jsou navrhovány tak, aby lokusy obsahující geny spojené se známými dědičnými poruchami byly pokryty sondami hustěji (s rozlišením 20 – 50 kb)

než oblasti genově chudé (100 – 250 kb), jedná se o tzv. ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays) design [Miller a kol., 2010; Vermeesch a kol., 2012].

Čipy hybridizované s testovanou a kontrolní DNA jsou analyzovány pomocí skeneru, který proměřuje intenzitu obou signálů v každém bodě čipu, viz obr. 5. Příslušný software následně vyhodnotí, zda je daný lokus u pacienta zmnožen, chybí, či je normální.

Interpretace dat z array CGH

CNV nalezené metodou array CGH je nezbytné vyhodnotit z hlediska jejich potenciální patogenity a spojitosti se znaky fenotypu, pro které byl pacient vyšetřován. Důvodem je variabilita genomu, díky níž jsou CNV nacházeny i u fenotypově normálního jedince [Redon a kol., 2006]. Pro určení klinické významnosti CNV byly publikovány různé interpretační postupy [Bruno a kol., 2009; Buysse a kol., 2009; Koolen a kol., 2009; Gijbbers a kol., 2009; 2011], na jejichž základě jsou varianty rozdělovány v rámci pětistupňové škály na patogenní, pravděpodobně patogenní, klinicky nejasné, pravděpodobně benigní a benigní. Děje se tak na základě postupného posouzení různých charakteristik konkrétní varianty, viz obr. 4.

Prvním krokem je odlišení běžných populačních benigních variant od těch potenciálně významných [Whitby a kol., 2008]. K tomuto účelu slouží databáze, sdružující data z populačních studií normálních jedinců bez postižení fenotypu včetně studie 1000 Genomes Project (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>), která obsahuje data z celogenomového sekvenování jedinců z mnoha různých populací [1000 Genomes Project Consortium a kol., 2010]. Nejužívanější je Database of Genomic Variants (DGV), sdílející údaje s databází dbVAR, která kromě CNV obsahuje i inverze, translokace a inserce mobilních elementů. Význam těchto databází je ve shromažďování variant, které jsou nejpravděpodobněji benigní povahy a představují normální genetickou variabilitu zdravé populace. Výjimkou ovšem mohou být varianty popsané ve velmi nízkých počtech případů, které nemusí být zcela benigní, a uvedeny mohou být i varianty představující přenašečství AR chorob. Využít lze i interní databáze, které jsou na každém pracovišti vytvářeny vyšetřováním zdravých rodinných příslušníků probandů a doplňují informace získané z mezinárodních databází o CNV benigního charakteru specifické pro danou populaci.

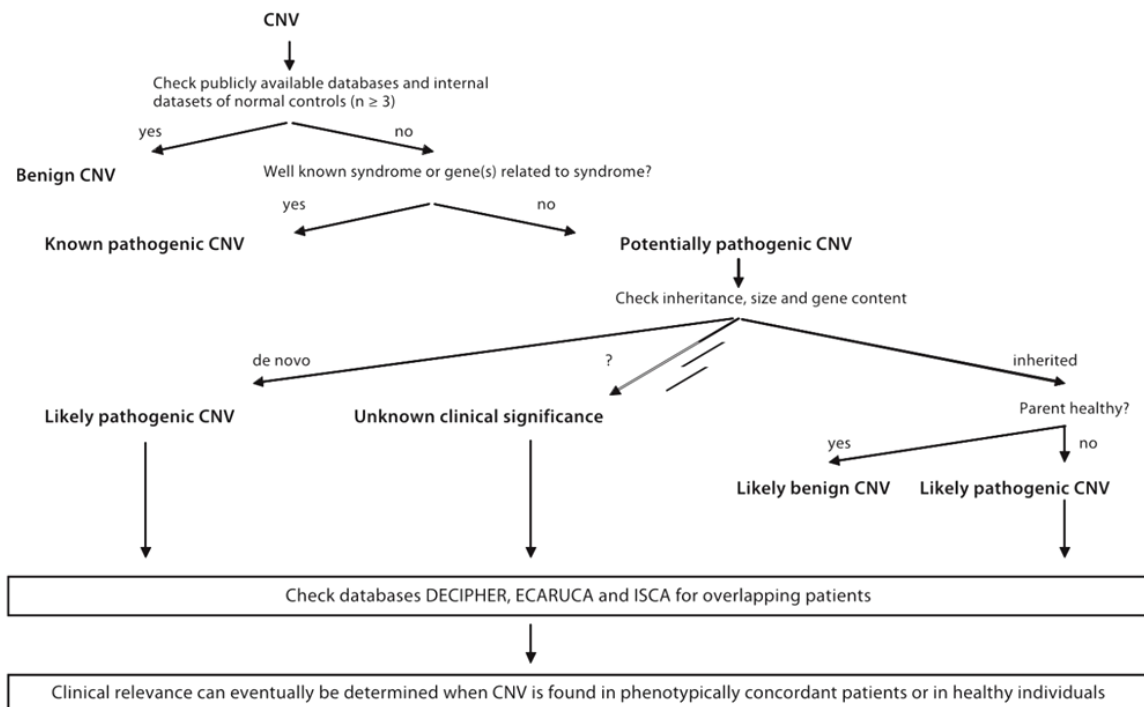
Druhým krokem interpretace je zjištění, zda CNV nezasahuje lokus známého mikrolečného či mikroduplikačního syndromu, případně kritický region obsahující geny spojené se známou poruchou. Tyto varianty, pokud jsou ve shodě s abnormálním fenotypem, a naplňují i další parametry, např. rozsah varianty, dědičnost, aj., představují patogenní CNV.

Varianty, které nelze považovat za benigní ani za jasně patogenní, mohou být potenciálně klinicky významné a jsou rovněž shromažďovány v databázích, které umožňují vzájemné porovnání rozsahů a fenotypů popsaných případů. Nejznámějšími databázemi tohoto typu jsou DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER) [Firth a kol., 2009], International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA) [Kaminsky a kol., 2011], Clinical Genome Resource (ClinGen) a ClinVar. Pro správné posouzení významu potenciálně významných variant je nezbytné zjistit, zda je varianta zděděná či *de novo* a posoudit její rozsah, neboť až 99 % všech benigních CNV je zděděných a menších než 500 kb [McCarroll a kol., 2008].

Pokud je varianta zděděna od nepostiženého rodiče, její charakter bude spíše benigní, avšak je třeba zvážit možný efekt neúplné penetrance či variabilní expresivity. Jedná se o jev, kdy se stejná CNV (i zděděná) neprojeví u všech jedinců nebo ve stejné míře. Tak může být patogenní varianta zděděna od nepostiženého rodiče, případně její projev může být jiné intenzity nebo úplně odlišný. Příčiny tohoto jevu nejsou dosud zcela známy, v úvahu přicházejí vysvětlení v podobě teorie druhého zásahu, kdy kombinace dvou a více CNV synergicky ovlivňují fenotyp pacienta [Girirajan a kol., 2010], mozaicismu, vlivu pohlaví či věku nosiče, mutace druhé alely, multifaktoriální dědičnosti, alelických interakcí, imprintingu či epigenetiky.

Pokud je u *de novo* CNV nalezen podobný případ ve výše zmíněných databázích potenciálně patogenních variant a shodují se i znaky fenotypu, zvyšuje se pravděpodobnost její patogenity. Tuto pravděpodobnost rovněž ovlivňuje povaha CNV (delece bývají mnohem častěji patogenní než duplikace [Menten a kol., 2006], rozsah a počet zasažených genů, mezi nimiž je možné specifickými postupy vytipovat možné kandidátní geny potenciálně přispívající k abnormálnímu fenotypu [Van Vooren a kol., 2007]). Ke zjištění funkce genů a posouzení vztahu CNV ke znakům pacienta lze využít databáze Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) či Orphanet, GeneCards a MalaCards. U CNV, které nelze pro nedostatek informací vyhodnotit, zůstává význam nejasný (VOUS).

Vzhledem k neustále se rozšiřujícím poznatkům o CNV a funkci genů je nezbytné se k nejasným variantám v pravidelných intervalech vracet a proces vyhodnocení opakovat. V mnoha případech může být VOUS překlasifikována na benigní nebo patogenní [Westerfield a kol., 2014].



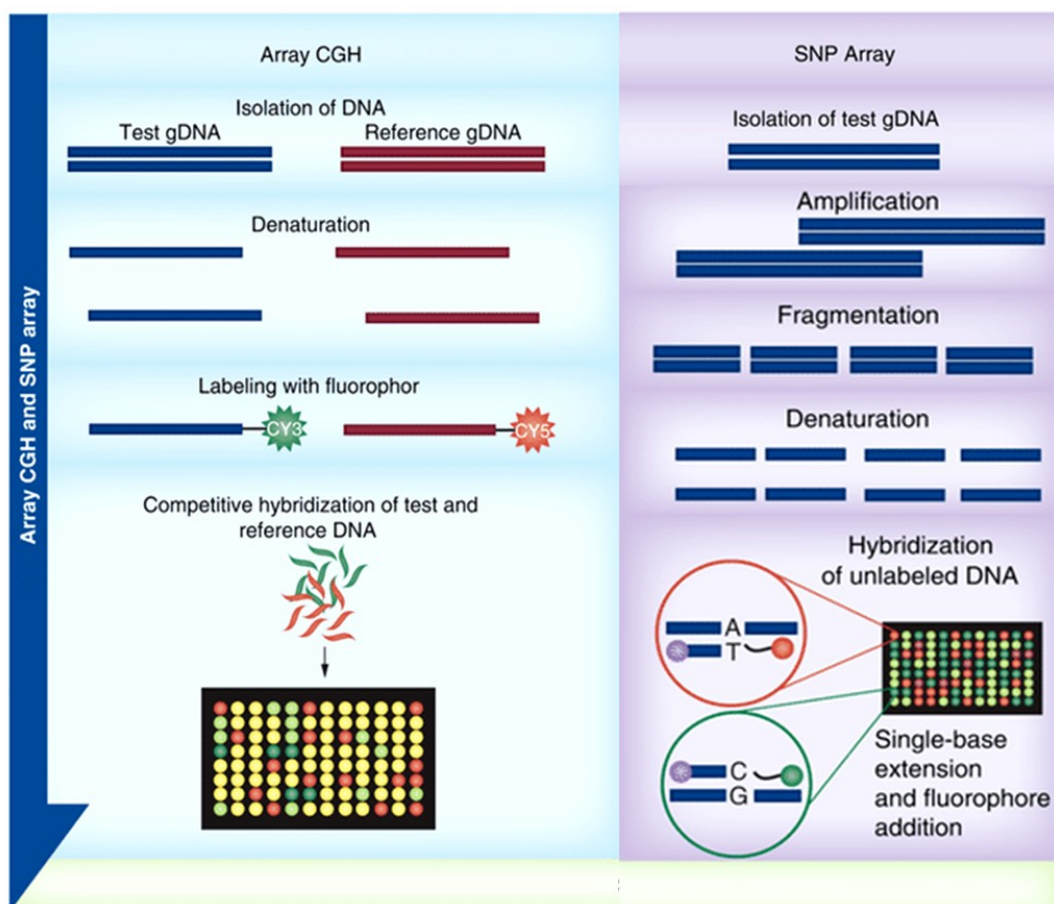
Obr. 4. Schéma zjednodušeného rozhodovacího algoritmu pro stanovení klinické významnosti CNV. Převzato z Gijsbers a kol. [2011].

SNP array (SNPa)

Metoda je založena na detekci jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism; SNP). SNP array je používána k citlivé detekci CNV včetně určení rodičovského původu (pokud jsou takto vyšetřeni i rodiče), mimo to ji lze využít pro detekci uniparentální dizomie (UPD) a stanovení oblastí homozygotity. Základem metody je opět hybridizace testované DNA na oligonukleotidový čip, principy vyšetření se ale od klasické array CGH odlišují (Obr. 5).

Nejčastěji využívanou variantou vyšetření SNP je hybridizace neznačené testované DNA k sondám, které jsou navrženy tak, aby končily vždy jeden nukleotid před vyšetřovaným polymorfismem. Tento chybějící nukleotid je po navázání DNA pacienta na sondu dosyntetizován na základě komplementarity s testovanou DNA. Každý z volných nukleotidů (ve formě dideoxy terminátoru, aby došlo k připojení pouze jednoho nukleotidu) je značen odlišným fluorochromem a po inkorporaci fluorescenční signál odpovídá konkrétní alele v polymorfních místech, zatímco intenzita signálu vypovídá o počtu kopií v daném lokusu.

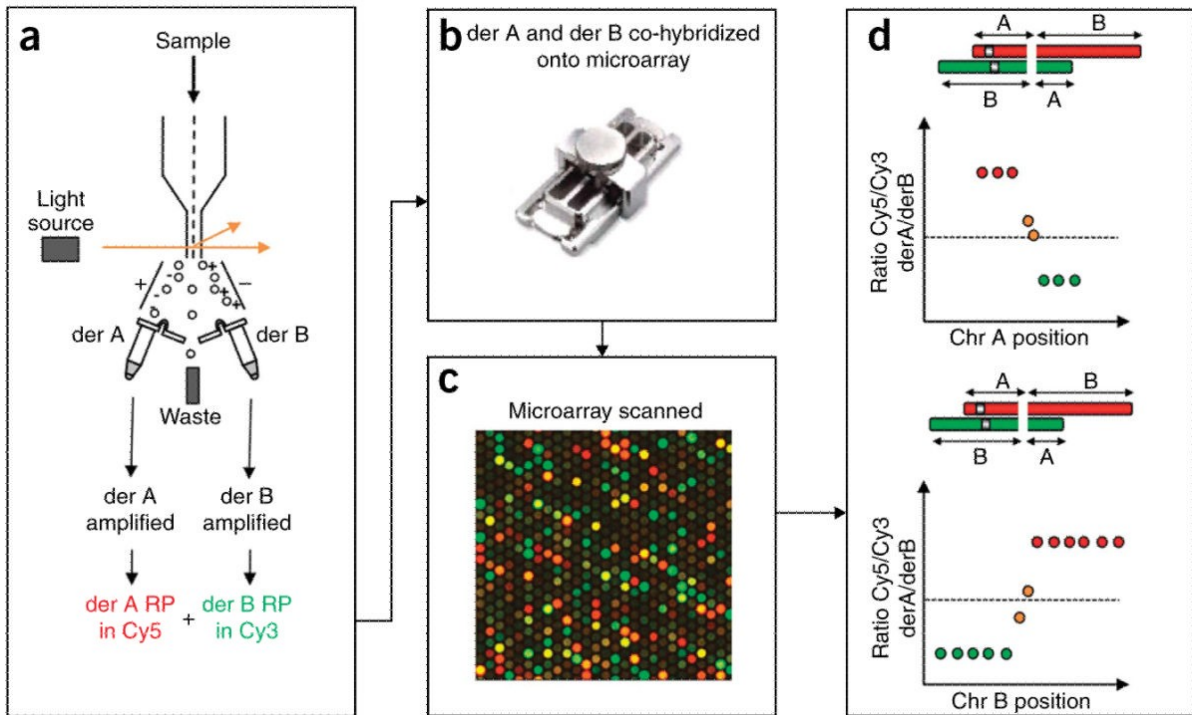
Druhou možností je hybridizace značené DNA pacienta k alelicky specifickým sondám (allele-specific oligonucleotide, ASO) na čipu. Podle intenzity a distribuce signálu je odečítána konkrétní alela polymorfismu a počet kopií.



Obr. 5. Princip metody array CGH a SNP array. Převzato z Alsolami a kol. [2013], upraveno.

Array painting

Čipovou technologii využívá též metoda array painting, která byla vyvinuta pro přesnou identifikaci zlomových míst i u balancovaných chromozomových přestaveb. Tento postup ovšem vyžaduje izolaci derivovaných chromozomů mikrodisekcí nebo průtokovou cytometrií a amplifikaci takto získané DNA. Následuje značení DNA derivátů odlišnými fluorochromy a hybridizace se sondami vázanými na čipu [Gribble a kol., 2009]. Při analýze jsou identifikovány sondy hybridizující s derivovanými chromozomy, přičemž zlomová místa aberace mohou vykazovat fúzní signál obou fluorochromů (Obr. 6).



Obr. 6. Princip metody array painting. Převzato z Gribble a kol. [2009].

Sekvenování nové generace (NGS)

Sekvenování nové generace je metoda založená na masivním paralelním sekvenování obrovského množství DNA fragmentů. Oproti klasickému Sangerovu sekvenování, které je cíleno pouze na konkrétní gen či variantu, ji lze využít k testování většího množství genů najednou, a to buď panelu vybraných genů, nebo exomu (exome sequencing; ES) či celého genomu (whole-genome sequencing; WGS) pacienta v jednom experimentu. V současné době je NGS pro diagnostické účely realizováno mnoha různými platformami při zachování základního principu metody.

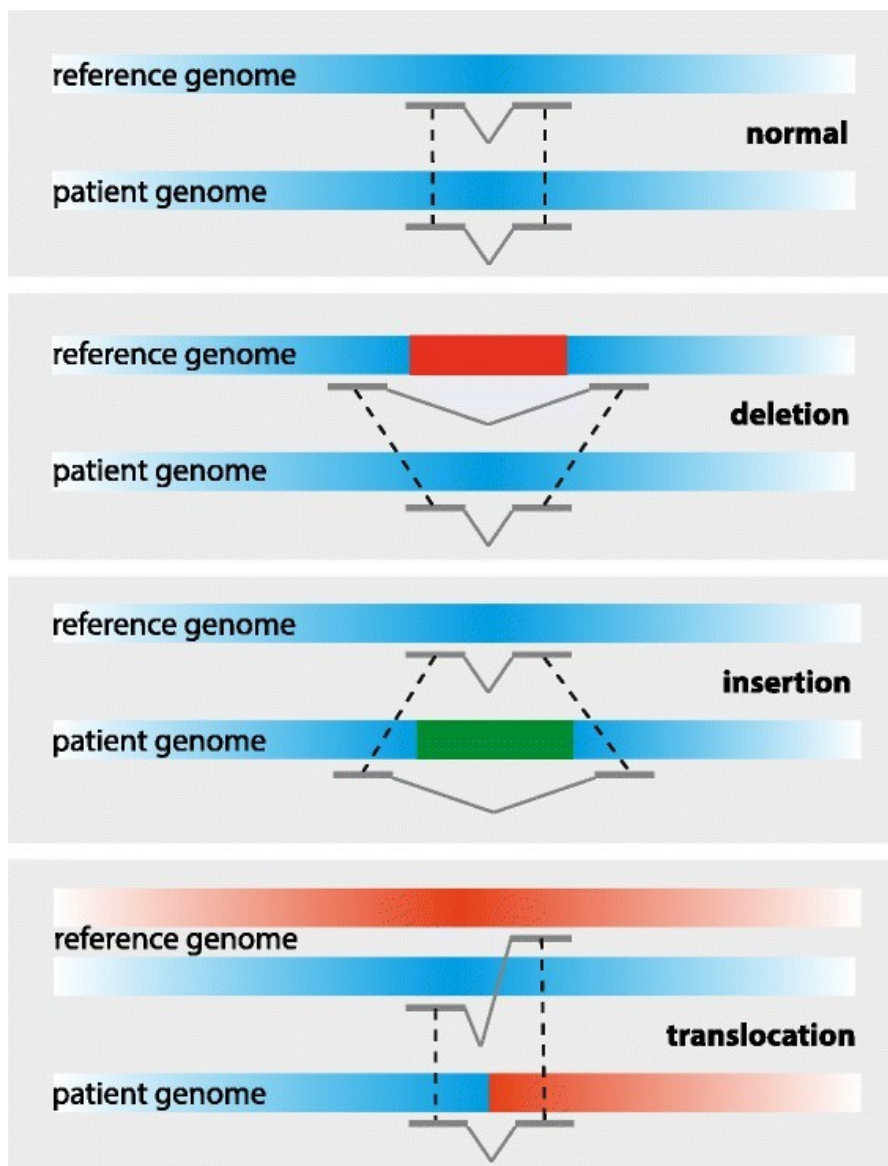
Tím je v první řadě příprava DNA knihovny z testovaného vzorku, spočívající v izolaci DNA, fragmentaci a následném navázání adaptérů na oba konce fragmentů. Adaptéry umožní navázání fragmentů na pevný nosič a jejich cyklickou amplifikaci. Následně dochází k samotnému sekvenování syntézou, kdy navázání jednotlivých značených nukleotidů vede k uvolnění různých fluorescenčních signálů, které jsou detekovány a jejichž pořadí určuje sekvenci nukleotidů fragmentu. Nakonec jsou takto získané sekvence podrobeny bioinformační analýze, která spočívá v jejich porovnávání s referenční genomovou sekvencí a odhalování případných odchylek. Tyto varianty jsou dále filtrovány s cílem zúžit jejich spektrum na klinicky relevantní nálezy [Ekblom a Wolf, 2014].

V poslední době narůstá role NGS i v detekci chromozomových aberací. Protože zlomy aberací se jen vzácně nacházejí přímo v exonech protein kódujících genů, umožňuje metoda ES obvykle pouze detekci CNV, a i tu spíše jen s obtížemi a bez detekce zlomových míst. Oproti tomu je metoda WGS schopná zachytit všechny typy početní a strukturní chromozomové variability s přesností na jeden nukleotid.

Z úsporných důvodů byl dříve v diagnostice BCA používán postup mate-pair sequencing (MPS), který byl založen na cirkularizaci dlouhých fragmentů genomové DNA a sekvenování pouze úseku obsahujícího spojení obou konců fragmentu. To umožnilo při celkovém nízkém pokrytí genomu zachytit dvojice konců, které pocházely z různých chromozomů (u translokací) nebo z jednoho chromozomu, ale mapující ve vyšší nebo nižší než očekávané vzdálenosti (u delecí nebo inzercí) nebo v jiné oblasti a orientaci (u inverzí) (Obr. 7). Metoda MPS byla s postupujícím zlevňováním NGS nahrazena klasickým (paired end) WGS s vyšším pokrytím genomu, které dokáže zachytit všechny typy přestaveb na základě změn pokrytí (CNV), změn oproti očekávanému mapování readů z jednoho páru či přítomnosti readů obsahujících dva úseky sekvencí mapujících do různých míst (junction nebo split ready) [Alkan a kol., 2011]. Pro validaci a upřesnění zlomových míst může být NGS doplněno Sangerovou metodou.

Nověji se začínají uplatňovat metody NGS schopné sekvenovat dlouhé úseky nativní DNA, což má velkou výhodu právě pro detekci SV, pro stanovení fáze vazby několika drobných SV lokalizovaných blízko sebe (na jednom chromozomu nebo naopak na obou homologních chromozomech) nebo pro čtení vysoce repetitivních oblastí genomu včetně segmentálních duplikací, ve kterých se zlomy SV často nacházejí.

Ze sekvence v oblastech zlomových míst je možné odhadnout mechanismus vzniku konkrétní přestavby [Kloosterman a Hochstenbach, 2014; Vergult a kol., 2014, Abyzov a kol., 2015], což velkou měrou přispívá k celkovému poznání problematiky chromozomových přestaveb.



Obr. 7. Detekce aberací metodou MPS. Hodnocením vzájemné polohy a orientace párových readů lze odhadnout přítomnost strukturních aberací včetně balancovaných přestaveb. Převzato z Kloosterman a Hochstenbach [2014].

Cíle práce

Práce se zabývá aplikací metod převyšujících rozlišovací schopnost karyotypování u souboru pacientů s abnormálním fenotypem a mikroskopicky prokázanou zjevně balancovanou chromozomovou aberací. Hlavním cílem studie je objasnění diskrepance mezi postižením pacientů, které může signalizovat jejich nebalancovaný genotyp, a nálezem zjevně vyvážené přestavby v karyotypu. Práce si klade za cíl ověřit vyváženost přestavby, přispět k poznání mechanismů patogeneze skutečně i zdánlivě balancovaných aberací a tím optimalizovat diagnostický postup u budoucích případů těchto relativně vzácných nálezů.

Dílními cíli práce jsou:

1. Detekovat CNV v genomu nosičů zjevně balancovaných chromozomových přestaveb se zaměřením na předpokládaná zlomová místa aberace stanovená karyotypováním.
2. U zachycených CNV ověřit jejich původ (*de novo* nebo familiární) a zhodnotit souvislost s primárním nálezem strukturní aberace. Porovnáním s dosud publikovanými případy se pokusit odhadnout klinický význam jednotlivých variant a provedením korelace fenotypu s genotypem zjistit jejich kauzalitu. Vybrané zajímavé případy popsat podrobně ve formě kazuistik.
3. Zhodnotit výskyt a zastoupení abnormálních CNV v místech zlomů aberace u skupiny nosičů familiární zjevně balancované aberace oproti skupině pacientů s aberací původem *de novo*. Výsledky porovnat s dosud publikovanými studiemi.
4. U pacientů, u nichž nebyla zachycena abnormální CNV nebo u zjištěné CNV nebyla prokázána příčinná souvislost s konkrétním fenotypem, vytipovat v oblastech zlomových míst aberace kandidátní geny spojené se známou autozomálně dominantně dědičnou poruchou. U vybraných případů s podezřením na disrupci kandidátního genu zlomem se pokusit ověřit jeho intaktnost vhodnou metodou. Zvážit možný vliv dalších mechanismů patogenního působení chromozomové aberace (imprinting, lyonizace, poziční efekt a jiné) u pacientů bez nálezu vysvětlujícího patologický fenotyp.
5. U vybraných pacientů, jejichž abnormální fenotyp nebyl objasněn výše uvedenými molekulárně cytogenetickými postupy, aplikovat doplňující vyšetření, včetně metod molekulárně genetických, a pokusit se tak vysvětlit příčinu postižení. Vybrané případy s podezřením na kryptickou vyšší komplexitu přestavby a/nebo proběhnuvší chromotripsi či případy s komplexní aberací o větším počtu zlomů bez zjištěné CNV podrobit celogenomové sekvenční analýze s cílem upřesnit dosavadní nález a případně objasnit jeho patogenezi.

Materiál a metody

Soubor pacientů

Celkem bylo do studie zahrnuto 54 pacientů z 52 rodin s abnormálním fenotypem a předchozím nálezem balancované aberace v karyotypu. Pacienti byli do souboru zařazováni prospektivně v průběhu let 2010 – 2019. Vzhledem ke vzácnému výskytu balancovaných přestaveb doprovázených abnormálním fenotypem nosiče byl soubor retrospektivně rozšířen o pacienty, u nichž byla zjištěna balancovaná aberace v období od roku 2001 do roku 2009, byl-li u nich archivován biologický materiál. U těchto pacientů byla doplněna vyšetření, která v mnoha případech nebyla v době indikace dostupná.

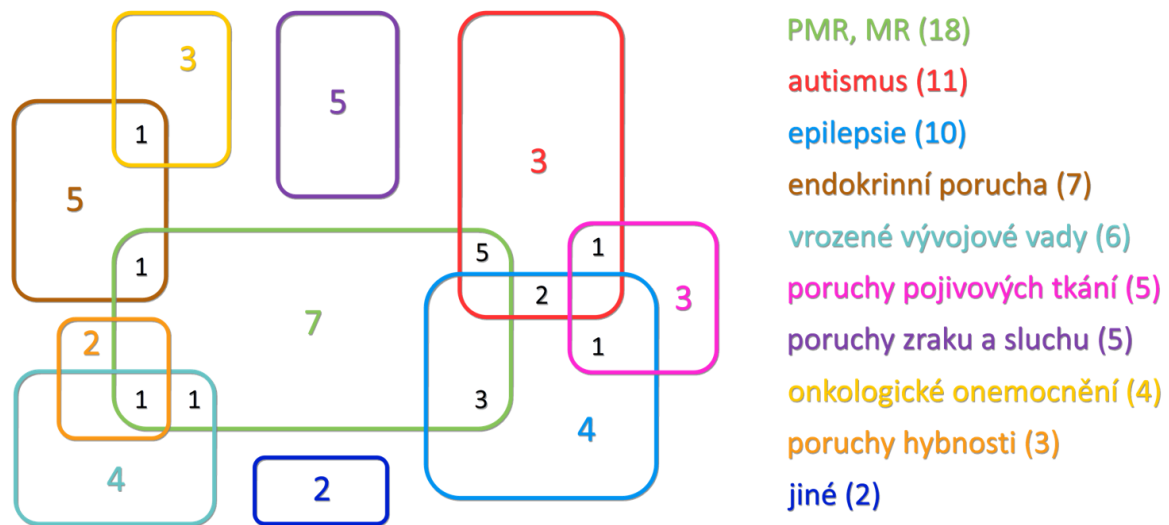
Z převážné většiny byly do studie zařazeny případy z vnitřní databáze a vzorky pocházející z archivu DNA našeho pracoviště. Ve třech případech byly karyotypy pacientů stanoveny v laboratořích spolupracujících externích pracovišť (Tab. 2) a následně byly vzorky odeslány k dalšímu vyšetření do naší laboratoře.

Tab. 2. Původ vzorku DNA, přehled spolupracujících externích pracovišť

Pracoviště	Počet vzorků	Identifikace vzorku
ÚBLG 2. LF UK a FNM, Praha	51	T1 – T32, R1 - R5, I1 – I5, I8 – I12, C1 – C4
OLG Thomayerova nemocnice, Praha	1	R6
OLG Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem	1	I6
Genetika Ostrava s. r. o., Ostrava	1	I7

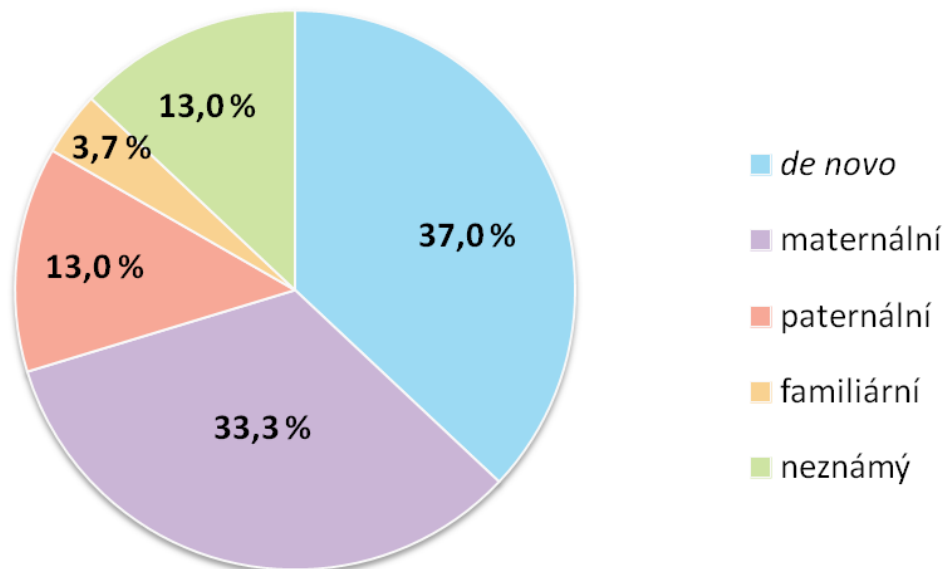
Nosiči balancovaných přestaveb, kteří nevykazovali jiné abnormality fenotypu než dysfertilitu související s přirozeně abnormální tvorbou gamet, nebyli pro účely této práce použiti. Rovněž nebyly zavzaty případy balancovaných přestaveb $inv(2)(p11.2q13)$, $inv(9)(p12q13)$ a $inv(10)(p11.2q21.2)$, které představují rekurentní benigní varianty normálního karyotypu [Brothman a kol., 2006; Gilling a kol., 2006].

Indikace k vyšetření karyotypu se v rámci souboru velice různily. Za abnormální fenotyp byla ve studii považována jakákoli odchylka od normálu ať už ve smyslu konkrétního onemocnění, případně izolované vady, či komplexního postižení syndromové povahy. Podle charakteru postižení lze abnormality fenotypu rozdělit do deseti skupin, které se u jednotlivých případů vzájemně prolínají (Obr. 8). Konkrétní hlavní znaky abnormálního fenotypu jsou u jednotlivých případů uvedeny v souhrnných tabulkách 3 – 6 na str. 36 – 39.



Obr. 8. Grafické vyjádření zastoupení hlavních skupin fenotypových abnormalit u pacientů v souboru. Velké barevné číslice vyjadřují počty jedinců s konkrétním postižením. Malé číslice černé barvy vyjadřují, u kolika jedinců se vyskytují znaky více překrývajících se skupin. V závorkách jsou uvedeny celkové počty jedinců, u nichž byl fenotyp pozorován.

U dvaceti jedinců vznikla nalezená balancovaná aberace *de novo* (Obr. 9). Ve dvaceti pěti případech byla přestavba zděděná od některého z rodičů (z toho v 18 případech od matky a v sedmi případech od otce), přičemž převážná většina předávajících rodičů nevykazovala znaky abnormálního fenotypu, viz tab. 3 – 6. Ve dvou dalších případech lze usuzovat na rodičovský původ, neboť se jedná o sourozence s identickou balancovanou translokací. Přesná segregace v rodině však nebyla určena a vyloučit nelze ani přítomnost gonadální mozaiky u jednoho z rodičů. Ve zbývajících sedmi případech nebyl původ aberace objasněn, případně byl vyšetřen pouze jeden z rodičů a jeho karyotyp byl normální.



Obr. 9. Původ balancované aberace. Grafické rozdělení jedinců v souboru podle původu přestavby v procentuálním vyjádření.

Pacienti byli dle povahy balancované aberace rozděleni do čtyř skupin. Skupinu T tvořili pacienti s balancovanou reciprokou translokací. Do skupiny R byli zařazeni pacienti s robertsonskou translokací. Skupinu I tvořili nosiči balancované inverze a do poslední skupiny C byli zařazeni pacienti s balancovanou komplexní přestavbou v karyotypu.

Skupina T

Skupinu T (Tab. 3) tvoří pacienti, u kterých byla v karyotypu postnatálně zjištěna balancovaná reciproká translokace. U případu T26 byla translokace zjištěna *post mortem*. V dané skupině bylo zařazeno 32 osob, z toho 11 jedinců ženského a 21 mužského pohlaví ve věkovém rozmezí od jednoho měsíce do 38 let v době vyšetření karyotypu. Probandi T2/T3 a T21/T22 jsou sourozenci různého věku a stejného pohlaví. Z celkového počtu 32 osob vznikla reciproká translokace u 12 *de novo* a v 18 případech byla aberace zděděna od některého z rodičů (včetně dvou sourozeneckých párů, kde byl u jednoho páru prokázán maternální původ a u druhého lze zdědění předpokládat). U zbývajících dvou pacientů nebyl původ aberace objasněn. Ve většině případů se jednalo o translokaci mezi autozomy, pouze u dvou jedinců (T4 a T30) se translokace odehrála mezi autozomem a chromozomem X. Převažující indikací k vyšetření pacientů v této skupině byla psychomotorická retardace (PMR) nebo mentální retardace (MR), poruchy autistického spektra (PAS) a epilepsie.

Tab. 3. Základní charakteristiky pacientů ze skupiny T: identifikační kód jedince (modře jsou vyznačeny sourozenské páry), věk v době cytogenetického vyšetření, hlavní znaky abnormálního fenotypu a karyotyp s uvedením původu aberace. U zděděných aberací je barevně vyznačen fenotyp rodiče – přenašeče (zelená – normální fenotyp, žlutá – mírná podoba abnormálních znaků probanda, červená – rodič postižen stejně jako proband).

Pacient	Věk	Indikace	Karyotyp
T1	9 r	osteosarkom, v RA nádory GIT, prsu, plic	46,XY,t(2;15)(q31;q26.1) <i>mat</i>
T2	6 r	epilepsie	46,XY,t(3;7)(q25.3;p13) <i>inh</i>
T3	4 r	epilepsie	46,XY,t(3;7)(q25.3;p13) <i>inh</i>
T4	5 r	malý vzrůst, suspektní Turnerův syndrom	46,X,t(X;13)(q21.2;p11.2) <i>dn</i>
T5	6 r	SMR, porucha řeči, epilepsie	46,XY,t(2;19)(q13;q13.3) <i>dn</i>
T6	12 r	PMR, makrocefalie	46,XY,t(10;22)(p13;q13.3) <i>mat</i>
T7	1 r	PMR, VCC, mikrocefalie	46,XX,t(6;10)(q15;q11.2) <i>dn</i>
T8	1 m	palatoschisis, pylorostenóza, atyp. tvar hlavy	46,XY,t(10;13)(p15;q32.1) <i>dn</i>
T9	15 r	mucinózní tubulární a vřetenobuněčný karcinom ledviny	46,XX,t(3;11)(p21.3;p13) <i>mat</i>
T10	5 r	PAS	46,XY,t(4;13)(q12;q12) <i>dn</i>
T11	2 r	opozdění řeči, dysmorfie	46,XX,t(1;12)(p36.2;q24.3) <i>mat</i>
T12	13 r	Aspergerův syndrom, PAS, epilepsie	46,XY,t(3;9)(p21;q34) <i>dn</i>
T13	38 r	porucha sluchu, porucha funkce ledvin	46,XY,t(16;18)(p11.21;q13.3)
T14	6 r	malý vzrůst	46,XX,t(4;17)(q25;q22) <i>mat</i>
T15	1 m	incontinentia pigmenti	46,XX,t(7;22)(q11.21;q11.2) <i>mat</i>
T16	10 r	PAS, skeletální dysplasie	46,XY,t(6;9)(p12.2;p23) <i>dn</i>
T17	16 r	vysoký vzrůst, amenorhea, endokr. porucha	46,XX,t(7;10)(q11;p11) <i>pat</i>
T18	29 r	slepota	46,XY,t(2;13)(q33;q32) <i>mat</i>
T19	9 r	PAS	46,XY,t(7;14)(p11.2;p12) <i>mat</i>
T20	18 r	LMR, PAS, deprese	46,XY,t(3;21)(p25;q22.3) <i>dn</i>
T21	8 r	LMR – SMR, PAS, stigmatizace	46,XY,t(9;17)(p13;q22) <i>mat</i>
T22	10 r	LMR, ADHD	46,XY,t(9;17)(p13;q22) <i>mat</i>
T23	1 r	mikrocefalie, TMR, ataxie, hypogonadismus	46,XY,t(3;16)(q21;p13.3) <i>mat</i>
T24	31 r	epilepsie, MR	46,XY,t(1;2)(p12;q11.2) <i>pat</i>
T25	3 r	hypotonie, obezita, susp. Prader-Willi sy.	46,XX,t(8;15)(q24.1;q21.2) <i>mat</i>
T26	3 m†	mnohočetné VVV mozku, lissencephalie	46,XY,t(7;12)(q22;p11.2)
T27	5 m	dystrofie corney, amblyopia, nystagmus	46,XY,t(3;20)(q25;p11.23) <i>dn</i>
T28	29 r	porucha sluchu	46,XX,t(11;20)(p15.3;p12.1) <i>dn</i>
T29	1 r	porucha sluchu	46,XY,t(8;16)(p21;q13) <i>dn</i>
T30	19 r	hypergonadotropní hypogonadismus	46,X,t(X;12)(q13;p12.3) <i>dn</i>
T31	9 m	epilepsie	46,XX,t(1;11)(p36.1;q13) <i>mat</i>
T32	9 r	ADHD, astma bronchiale, reflux	46,XY,t(6;13)(p23;q34) <i>pat</i>

Skupina R

Do skupiny R (Tab. 4) bylo zařazeno šest pacientů se zjištěnou robertsonskou translokací v karyotypu. Z celkového počtu šesti jedinců bylo pět mužského a jeden ženského pohlaví s věkovým rozmezím od 6 měsíců do 9 let v době vyšetření karyotypu. S výjimkou případu R2, u kterého vznikla aberace *de novo*, byly všechny translokace zděděné od některého z rodičů. Převážná většina translokací, pět ze šesti případů, se odehrála mezi chromozomy 13 a 14. Převažující indikací k vyšetření pacientů v této skupině byla PMR/MR.

Tab. 4. Základní charakteristiky pacientů ze skupiny R. Legenda viz tab. 3.

Pacient	Věk	Indikace	Karyotyp
R1	9 r	spastická paraparesa	45,XY,rob(13;14)(q10;q10) <i>mat</i>
R2	3 r	epilepsie, suspektní Aspergerův syndrom	45,XY,rob(13;14)(q10;q10) <i>dn</i>
R3	7 r	poruchy chování, endokrinní porucha	45,XX,rob(13;14)(q10;q10) <i>pat</i>
R4	6 m	PMR, makroglosie, stigmatizace	45,XY,rob(13;14)(q10;q10) <i>pat</i>
R5	5 r	PMR, záchvatovité onemocnění	45,XY,rob(21;22)(q10;q10) <i>mat</i>
R6	2 r	TMR, PAS, porucha příjmu potravy, ADHD, regres řeči	45,XY,rob(13;14)(q10;q10) <i>pat</i>

Skupina I

Do skupiny I (Tab. 5) bylo zařazeno 12 pacientů, u nichž byla při vyšetření karyotypu zjištěna balancovaná inverze některého z chromozomů. Z celkového počtu 12 jedinců bylo pět ženského a sedm mužského pohlaví s věkovým rozmezím od 1 měsíce do 56 let v době vyšetření karyotypu. Ve čtyřech případech vznikla aberace *de novo* a u tří pacientů byla inverze zděděná od některého z rodičů. Ve zbývajících pěti případech nebyl původ aberace objasněn. Třikrát se jednalo o inverzi pericentrickou a devětkrát o paracentrickou. V 11 případech byla inverze pozorována na autozomu a pouze v jednom případě (I4) na gonozomu, konkrétně chromozomu Y. Převažující indikací k vyšetření pacientů v této skupině byly poruchy pojivových tkání a vrozené vývojové vady (VVV).

Tab. 5. Základní charakteristiky pacientů ze skupiny I. Legenda viz Tab. 3.

Pacient	Věk	Indikace	Karyotyp
I1	12 r	teleangiektázie, hemangiom rtu	46,XX,inv(7)(q11.23q22.1)
I2	56 r	křeče horních končetin, porucha chůze, bolesti hlavy	46,XY,inv(9)(p24q32)
I3	1 m	mírná stigmatizace, hypertrofická kardiomyopatie	46,XY,inv(11)(p15.1q21)
I4	19 r	epilepsie	46,X,inv(Y)(p11.2q11.223) <i>pat</i>
I5	3 r	PMR, stigmatizace, café au lait skvrny, makrosomie	46,XY,inv(12)(q21.2q24.1) <i>dn</i>
I6	4 m	CFD, plochý hrudník, osteoplazie	46,XY,inv(17)(q21.1q23) <i>dn</i>
I7	6 r	SMR, ADHD, stigmatizace	46,XX,inv(13)(q31.2.q33) <i>dn</i>
I8	6 r	ektrodaktylie, porucha vývoje řeči	46,XY,inv(7)(q21.2q36) <i>dn</i>
I9	14 r	chronická myeloidní leukémie, obezita, gynekomastie	46,XY,inv(11)(q12q23.3)
I10	13 r	vysoký vzrůst, suspektní onemocnění poživ, epilepsie	46,XX,inv(15)(q21.2q23)
I11	1 r	modré skléry, hypermobilita kloubů	46,XX,inv(17)(p11.2p13) <i>mat</i>
I12	7 r	suspektní atypická CF, hypermobilita kloubů, laxicita kůže	46,XX,inv(17)(q21.1q23.1) <i>mat</i>

Skupina C

Poslední, nejméně početnou skupinu C (Tab. 6) tvoří čtyři jedinci, u nichž byla zjištěna komplexní chromozomová přestavba. Všichni pacienti byli mužského pohlaví ve věku jednoho roku až patnácti let v době vyšetření karyotypu. U tří pacientů byl původ aberace *de novo*, jedna komplexní přestavba byla zděděna od nepostížené matky. V prvním případě (C1) se jedná o postupnou reciprokou translokaci tří chromozomů, ve druhém (C2) je podobná výměna doplněna navíc inzercí z prvního do třetího chromozomu. Třetí pacient (C3) má reciprokou translokaci mezi dvěma chromozomy doplněnou o inzerci do chromozomu třetího, ve čtvrtém případě (C4) dochází ke složité výměně, do níž jsou zapojeny celkem čtyři chromozomy. U všech pacientů byla hlavní indikací ke genetickému vyšetření PMR/MR a/nebo PAS.

Tab. 6. Základní charakteristiky pacientů ze skupiny C. Legenda viz tab. 3.

Pacient	Věk	Indikace	Karyotyp
C1	1 r	PMR, opožděný vývoj	46,XY,t(1;2;11)(q41;q34;p13) <i>dn</i>
C2	5 r	PAS	46,XY,t(1;3;15)(1pter→1q42::3q26.31→3qter;3pter→3q25.1::1q4?3→1qter;15pter→15q?22::1q42→1q4?3::15q?22→15q2?6::3q25.1→3q26.31::15q2?6→15qter) <i>dn</i>
C3	1 r	PMR, PAS, stigmatizace, opožděný vývoj řeči	46,XY,t(3;8;10)(3pter→3q25.1::8q21.2→8q23.3::3q25.1→3qter;8pter→8q21.2::10q24→10qter;10pter→10q24::8q23.3→8qter) <i>mat</i>
C4	15 r	PMR, porucha růstu	46,XY,t(1;6;14;18)(1pter→1q23::18p11.3→18pter;6pter→6q15::1q24→1q25::18q11.2→18qter;14pter→14q13::6q24.2→6qter;1qter→1q25::18p11.2→18q11.2::6q15→6q24::14q13→14qter) <i>dn</i>

Metody

Postup vyšetřování souboru

U všech pacientů ze souboru byla karyotypováním zjištěna zjevně balancovaná přestavba a následným vyšetřením karyotypu rodičů (pokud s vyšetřením souhlasili a jejich biologický materiál byl dostupný) byl určen původ aberace. V případě, že existovala pochybnost ohledně stanovení zlomových míst přestavby, případně nebyl s jistotou určen původ některého z jejích derivátů, byla k upřesnění použita metoda FISH.

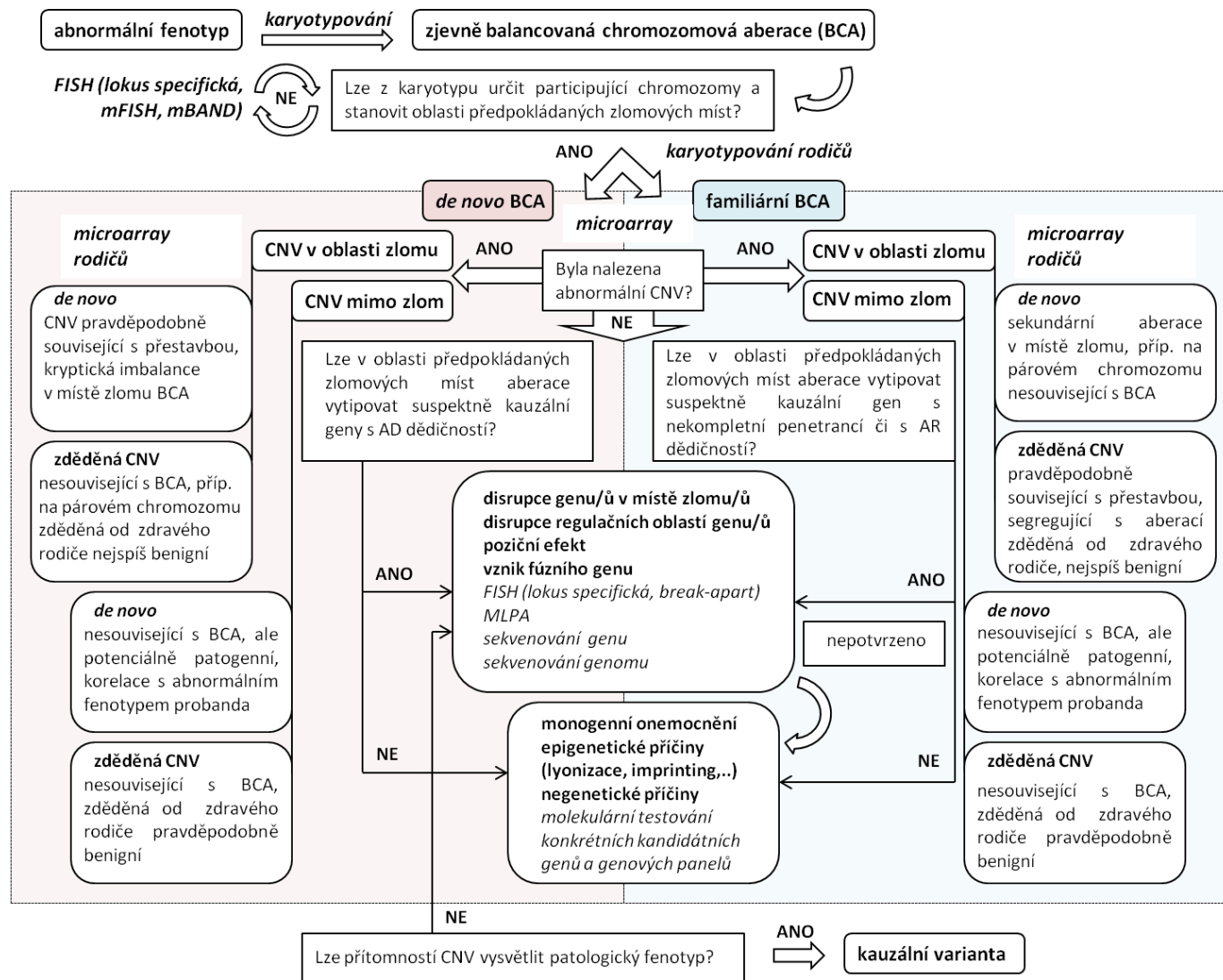
V rámci naší studie byli všichni pacienti vyšetřeni oligonukleotidovou array CGH v minimálním rozlišení formátu 4x180K. Klinická významnost zachycených CNV byla klasifikována pomocí pětibodové škály, viz dále. CNV představující přenašečství AR choroby nebyly mezi nálezy zařazeny, pokud abnormální fenotyp probanda nebyl ve shodě s popisovanými znaky zmíněného AR onemocnění nebo pokud se CNV nenacházely v blízkosti zlomového místa aberace. Benigní varianty, které jsou běžně nacházeny v populaci, nebyly rovněž mezi nálezy zařazeny. V případě nálezu abnormální CNV s klasifikací patogenní, pravděpodobně patogenní nebo VOUS a u všech CNV (i těch hodnocených jako pravděpodobně benigní) lokalizovaných v blízkosti stanovených zlomových míst aberace byli následně vyšetřeni rodiče pacienta (pokud byl jejich biologický materiál dostupný) k určení původu CNV a její segregace v rodině, což napomáhá určení klinického významu varianty. Upřednostňovanou metodou pro ověření původu CNV bylo array CGH vyšetření za použití vhodného formátu s ohledem na rozsah ověřované varianty.

Důvodem pro tuto preferenci byla především skutečnost, že DNA rodičů většiny pacientů ze souboru byla archivována, zatímco buněčná suspenze nutná k provedení FISH nikoliv.

U pacientů s podezřením na disrupci konkrétního potenciálně kauzálního genu zlomem přestavby bylo provedeno vyšetření metodou FISH typu break-apart.

Pokud analýza molekulárně cytogenetickými metodami neposkytla možné vysvětlení postižení pacienta, nebo pokud neměla tato analýza dostatečnou výpovědní hodnotu pro jednoznačné stanovení klinického závěru či pro pochopení mechanismu vzniku postižení, pokračovalo vyšetření některých pacientů dalšími metodami, které jsou pro potřeby tohoto textu označeny jako doplňující. Tyto analýzy nebyly těžištěm práce autorky, ale protože byly logickým pokračováním jí započatého vyšetřovacího postupu a v některých případech poskytly i překvapivá vysvětlení postižení studovaných pacientů, jsou do práce také zařazeny.

Postup vyšetřování pacientů s BCA včetně posloupnosti metod, která byla coby nejvýhodnější navržena pro účely naší studie, je schematicky znázorněn na obrázku 10. Zvolený postup zohledňuje původ (*de novo*/familiární) BCA a dostupnost jednotlivých metod, kdy jsou upřednostňovány metody běžně využívané v diagnostice klasické a molekulární cytogenetiky, následované cíleným vyšetřováním vytipovaných kandidátních genů v oblastech zlomových míst BCA molekulárně cytogenetickými a molekulárně genetickými metodami. V první řadě je tedy vyšetřování pacienta založeno na předpokladu, že patologický fenotyp se zjištěnou BCA souvisí. Pokud se souvislost nepodaří prokázat, pokračuje molekulárně genetické vyšetřování genů a genových panelů zvolených podle konkrétního postižení fenotypu.



Obr. 10. Schéma posloupnosti metod využívaných k vyšetřování pacientů se zjevně balancovanými přestavbami a abnormálním fenotypem.

Vyšetřované vzorky

Všechny primární vzorky jedinců ze souboru byly získány postnatálním odběrem. V 52 z celkového počtu 54 případů se jednalo o vzorek periferní krve. Ve dvou případech (T26 a I4) se jednalo o bioptický odběr kůže, u pacienta T26 *post mortem*. Část primárního materiálu byla ve všech případech určena k izolaci DNA a jejímu uložení do banky pro molekulárně cytogenetická, případně i molekulárně genetická vyšetření. Zbývající část primárního vzorku byla kultivována podle standardních operačních postupů naší či spolupracující laboratoře (Tab. 2). Kultivované buňky, tj. lymfocyty periferní krve nebo kožní fibroblasty (u případů T26 a I4) byly následně dalšími postupy zpracovány pro účely karyotypování.

Vyšetření karyotypu

U všech případů v souboru byla balancovaná chromozomová aberace zjištěna karyotypováním. Vyšetření karyotypu bylo provedeno metodou G-pruhování podle standardního protokolu [Seabright, 1972; Sanchez a kol., 1973]. U každého vzorku bylo početně a strukturně hodnoceno minimálně dvacet mitóz při odhadovaném rozlišení 450 – 550 pruhů na haploidní chromozomovou sadu. Toto hodnocení bylo realizováno současnými i bývalými pracovníky Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG 2. LF UK a FNM pomocí světelných mikroskopů a vybrané reprezentativní mitózy byly dokumentovány pomocí softwaru Ikaros Karyotyping System (verze 5.4.9 a starší verze) od společnosti MetaSystems. Chromozomové přestavby byly identifikovány a popisovány podle platné jednotné ISCN nomenklatury [McGowan-Jordan a kol., 2016].

U většiny jedinců byla analýza karyotypu provedena v období, kdy se autorka práce ještě na vyšetření nepodílela, nebo na jiném pracovišti. Proto bylo autorkou práce u všech pacientů zařazených do souboru provedeno nové posouzení (a ve dvou případech korekce) zlomových míst přestavby z karyogramů pacientů archivovaných na našem pracovišti či vyžádaných od externích laboratoří. Nové kompletní vyšetření karyotypu bylo autorkou práce provedeno u dvou recentních případů ze souboru. Všechna vyšetření karyotypu byla konzultována se zkušenou cytogenetičkou RNDr. Drahuší Novotnou, vedoucí Oddělení lékařské cytogenetiky ÚBLG 2. LF UK a FNM.

Array komparativní genomová hybridizace (array CGH)

U všech jedinců v souboru s výjimkou tří (C3, C4, T27, viz dále) a u rodičů ve vybraných rodinách bylo provedeno vyšetření metodou array CGH s využitím kontrolní

DNA od firmy Kreatech (MegaPool Reference DNA) a enzymatického značení od firmy Agilent (SureTag DNA Labeling Kit) a BlueGnome (Fluorescent Labelling System [dUTP]). Při značení vzorků bylo postupováno podle doporučeného protokolu výrobce. Hybridizace značených vzorků probíhala na komerčních čípech platformy Agilent (SurePrint G3 ISCA V2 Unrestricted 4x180K) a BlueGnome (nyní Illumina) (CytoChip Oligo 4x180K v1.0). Pro vyšetření rodičů byly též využívány čipy platformy Agilent (SurePrint CGH 8x60K G3 ISCA). Čipy byly následně skenovány na skeneru G2565CA Microarray Scanner, později na novějším typu G2600D SureScan Microarray Scanner od firmy Agilent. Skeny byly analyzovány pomocí softwaru BlueFuse Multi v2.1 – v3.4 od firmy BlueGnome a CytoGenomics 4.0.3.12 od firmy Agilent.

U pacienta C4 byla nejprve na našem pracovišti provedena analýza array CGH na platformě BlueGnome (CytoChip Oligo 4x44K v1.0; Mgr. Jana Drábová, Ph.D.) následovaná vyšetřením s vyšší rozlišovací schopností, SNP array Illumina (Human CytoSNP-12 BeadChips, ~300K) v servisní laboratoři ÚMG AV ČR.

Pacient C3 byl vyšetřen array CGH čipem Nimblegen HG18_WG_FT (385K, Roche) v servisní laboratoři Nimblegen a SNP array čipem Affymetrix Human Mapping 250K Array Set v servisní laboratoři ÚMG AV ČR.

U pacienta T27 byla provedena analýza čipem od firmy Nimblegen HG18_WG_CGH_8of8 (385K, Roche) v servisní laboratoři Nimblegen.

Celkově bylo autorkou práce provedeno 67 analýz array CGH na formátech 4x180K (54 vzorků) a 8x60K (13 vzorků).

Stanovení klinické významnosti CNV

Klinická signifikance zjištěných variant byla hodnocena interpretačním postupem podle Gijsbers a kol. [2011], vyvinutým na podkladě čtyř publikací zaměřených na vyšetřování pacientů s MR, PMR a/nebo VVV metodou array CGH [Bruno a kol., 2009; Buysse a kol., 2009; Gijsbers a kol., 2009; Koolen a kol., 2009]. V první řadě byla každá CNV porovnána s variantami v databázích DGV (<http://dgv.tcag.ca>) a dbVAR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar>), zda se nejedná o benigní variantu běžně se vyskytující u zdravé populace. Následně bylo zjišťováno, zda se daná varianta nepojí s již popsáním mikrolečným či mikroduplikačním syndromem a varianta byla posuzována z hlediska velikosti a genového obsahu. K tomu byly využívány genomové prohlížeče UCSC (<https://genome.ucsc.edu>), Ensembl (<https://www.ensembl.org>) a online aplikace GENA od Sivotech Bioinformatics (<https://www.sivotechbioinformatics.com>) pro vyhodnocování

CNV [Wierenga a kol., 2013]. Ke zjištění funkce genů zasažených CNV bylo využíváno databáze OMIM (<https://www.omim.org>), Orphanet (<https://www.orpha.net>), případně GeneCards (<https://www.genecards.org>). Každá varianta, u níž nebyl vyloučen možný patogenní vliv (s přihlédnutím k eventuální neúplné penetranci a variabilní expresivitě poruchy), byla porovnáвана s variantami uvedenými v databázích DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk>), ISCA (<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search>), ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org>) a ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) a v publikacích vyhledávaných pomocí databáze PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Byly posuzovány společné znaky abnormálního fenotypu z hlediska případné kauzality. Důležitým rozhodovacím kritériem byl též rodičovský původ varianty (zděděná či *de novo*), pokud bylo možné jej stanovit (Obr. 10). Výsledkem celého procesu bylo zařazení zjištěné varianty do finální kategorie významnosti.

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

U tří osob bylo provedeno vyšetření pomocí směsí komerčních lokus specifických sond, viz tab. 7. U pacientky T7 to bylo za účelem ověření, respektive upřesnění odhadu umístění zlomových míst přestavby, u případů I6 a I7 k ověření fáze delecí nalezených metodou array CGH. Tyto analýzy byly provedeny na našem pracovišti autorkou práce podle postupů doporučených výrobcí. Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axioimager Z1 (CarlZeiss) a vybrané reprezentativní mitózy (popřípadě interfázni jádra) byly dokumentovány pomocí softwaru ISIS FISH Imaging System v5.1 od společnosti MetaSystems.

Tab. 7. Přehled vyšetření metodou FISH.

Pacient	Strukturní přestavba	Vyšetřovaná oblast	Sonda	Výrobce
T7	t(6;10)(q15;q11.2)dn	6pter	STS-H99640	Cytocell
		10qter	RH44494	
		6q14.1	RP11-379B8	BlueGnome
		10q11.23	RP11-140C5	
I6	inv(17)(q21.1q23)dn	17qter	D17S2200	CytoCell
		17q21.2	RP11-206C20	BlueGnome
		17q21.32	RP11-361K8	
		17q21.32	RP11-243D13	
		17q21.33	RP11-94C24	

I7	inv(13)(q31.2q33)dn	13qter	13DS1825	Cytocell
		13q34	RP11-98F14	BlueGnome
		13q34	RP11-480K16	
		9p21.3	RP11-408N14	
		9q21.13	RP11-563H8	

U čtyř pacientů ze souboru bylo nutné doplnit vyšetření metodou FISH na jiném pracovišti. U tří jedinců (I7, C2 a C4) se jednalo o metody mFISH a mBAND, které nejsou na našem pracovišti zavedeny a byly využity pro účely přesnějšího popsání složitých přestaveb pacientů. Vyšetření byla provedena s použitím sond od firmy MetaSystems na pracovištích Cytogenetická laboratoř Onkologického centra J. G. Mendela, Nový Jičín (pacient I7, mBAND chromozomu 13), Molekulárně cytogenetická laboratoř fakultní části našeho ústavu (C2, mBAND chromozomu 1 a mFISH, MUDr. Pavel Tesner, Ph.D.) a Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze (C4, mBAND chromozomů 1 a 6 a mFISH, Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.).

U případu I9 bylo provedeno vyšetření chromozomů X a 8 centromerickými sondami od firmy Abbott Vysis (Centrum nádorové cytogenetiky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze, Ing. Lucie Hodaňová, Ph.D.) na suspenzi pacienta, která byla na tomto pracovišti archivována. Vyšetření bylo doplněno za účelem ověření nálezu z metody array CGH.

FISH typu break-apart (BA FISH)

V rámci studie byly u tří pacientů (Tab. 8) využity speciální lokus specifické sondy typu break-apart k vyloučení či potvrzení disrupce konkrétního genu zlomem balancované přestavby. Jednalo se ve všech případech o komerčně dostupné směsi sond od firmy Empire Genomics. Tato vyšetření byla provedena autorkou práce na pracovišti ÚBLG 2. LF UK a FN Motol podle doporučeného protokolu výrobce.

Tab. 8. Přehled vyšetření metodou BA FISH.

Pacient	Strukturní přestavba	Vyšetřovaná oblast	Sonda	Asociovaná porucha
T1	t(2;15)(q31;q26.1) <i>mat</i>	15q26.1	BLM BA	Bloomův syndrom
T8	t(10;13)(p15;q32.1) <i>dn</i>	13q32.1	TGDS BA	Catel-Manzke syndrom
I10	inv(15)(q21.2q23)	15q21.1	FBN1 BA	Marfanův syndrom

Doplňující vyšetření

Karyotypování buněk kostní dřeně

U pacienta I9 byla z důvodu diagnostikované leukémie provedena kultivace buněk kostní dřeně a následně karyotypování. Vyšetření bylo provedeno na pracovišti Centra nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze.

Methylation-Specific Multiplex ligation-dependent probe amplification (MS MLPA)

U případu T25 bylo doplněno vyšetření metodou metylačně specifická MLPA (MS MLPA) za účelem zjištění metylačního vzorce imprintované oblasti chromozomu 15, který byl součástí přestavby. Vyšetření provedla RNDr. Petra Hedvičáková na Oddělení lékařské molekulární genetiky ÚBLG 2. LF UK a FNM pomocí komerčně dostupného kitu SALSA MLPA ME028 Prader-Willi/Angelman probemix od firmy MRC Holland na analyzátoru ABI PRISM 3130XL od firmy Applied Biosystems. Výsledky byly hodnoceny za pomoci eMLPA (emlpa.lf2.cuni.cz), softwaru vyvinutého na našem pracovišti, a též softwaru Coffalyser.

Sekvenování Sangerovou metodou

U čtyř případů bez nálezu abnormální CNV byla kauzální mutace zjištěna cíleným Sangerovým sekvenováním kandidátního genu, u pacientů T31 (gen *SCN1A*) a T4 (gen *SHOX*) na Oddělení molekulární genetiky ÚBLG 2. LF UK a FNM (RNDr. Petra Hedvičáková a MUDr. Anna Křepelová, CSc.), u pacientky T15 (gen *IKBKG*) v Centru molekulární biologie a genové terapie FN Brno (Mgr. Romana Borská, Doc. RNDr. Lenka Fajkusová, CSc.) a u probanda T13 (gen *COL4A5*) na pracovišti OLG FN Ostrava (MUDr. Pavlína Plevová, Ph.D.). Sangerovo sekvenování na našem pracovišti bylo prováděno podle standardního operačního postupu laboratoře a analýza probíhala na analyzátoru ABI PRISM 3130XL od firmy Applied Biosystems. Výsledek sekvenování byl porovnáván s příslušnou referenční sekvencí DNA vyšetřovaného genu (NCBI Reference sequence – NM_RefSeq).

U pacienta T8 byla kromě vyšetření suspektní disrupce genu *TGDS* zlomem aberace metodou BA FISH doplněna i jeho sekvenační analýza Sangerovou metodou (Mgr. Júlia Martinková, ÚBLG 2. LF UK a FNM).

Sekvenování PCR produktů Sangerovou metodou bylo použito také při charakterizaci zlomů u pacienta C4 (Molekulárně genetická laboratoř fakultní části našeho ústavu, Mgr. Miroslava Hančárová, Ph.D., Příloha 1).

Sekvenování nové generace (NGS)

U pacienta I10 byla kromě vyšetření suspektní disrupce genu *FBNI* zlomem aberace metodou BA FISH doplněna i sekvenační analýza tohoto genu NGS metodou v rámci panelu Onemocnění pojivových tkání obsahujícího 99 genů včetně *FBNI* (Ing. Radka Sítková, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř lékařské genetiky, Nový Jičín).

U pacienta T1 bylo provedeno vyšetření NGS panelem 226 genů pro hereditární nádorová onemocnění – CZEKANCA, indikované pro geny skupiny ONKO1 (Mgr. Martina Bittóová, Gennet, Praha).

U pacientů C4 a I6 s podezřením na chromotripsi byl metodou NGS analyzován celý genom, u pacienta C4 v Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen s využitím metody mate-pair sekvenování, v případě I6 metodou paired-end sekvenování v servisní laboratoři Macrogen.

Analýza sekvenačních dat byla provedena u pacienta C4 ve spolupráci s týmem studie (Příloha 1), u pacienta I6 ve spolupráci s Molekulárně genetickou laboratoří fakultní části našeho ústavu (prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc.).

Výsledky a diskuze

Celkové rozdělení nálezů

Z celkem 54 pacientů s abnormálním fenotypem a se zjevně balancovanou strukturní přestavbou v karyotypu byla metodou array CGH u 17 jedinců zjištěna minimálně jedna CNV hodnocená jako patogenní, pravděpodobně patogenní nebo VOUS, případně jakákoliv varianta (včetně benigních) představující možnou imbalance v místě zlomu aberace.

U osmi osob ze souboru byla nalezena více než jedna CNV. Celkem bylo u 17 osob nalezeno 34 CNV, zasluhujících další pozornost. Celkový přehled nalezených variant je uveden v souhrnné tabulce 9.

Celkový záchyt jedinců s nálezem CNV v naší studii (17/54, 31,5 %) je ve shodě s publikovanými studiemi založenými na metodě array CGH [Gribble a kol., 2005; Ciccone a kol., 2005; Bisgaard a kol., 2006; De Gregori a kol., 2007; Sismani a kol., 2008; Higgins a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009; Gijbers a kol., 2010; Feenstra a kol., 2011]. Tyto práce stanovují celkový záchyt abnormálních CNV u souborů jedinců s PMR, MR a/nebo VVV a zjevně balancovanou chromozomovou přestavbou na 30 - 50 %. Studie obdobného charakteru provedené na souborech probandů s abnormálním fenotypem, ale normálním karyotypem udávají celkový záchyt abnormálních variant v rozmezí 15 – 20 % [Menten a kol., 2006; Stankiewicz a Beudet, 2007; Bruno a kol., 2009; Miller a kol., 2010; Vissers a kol., 2010; Pfundt a kol., 2012; Bartnik a kol., 2014]. Zvýšený záchyt ve skupině s chromozomovou přestavbou oproti skupině jedinců s normálním karyotypem je patrně představován CNV v místech zlomů aberací. U probandů s balancovanými chromozomovými přestavbami s normálním fenotypem nebyly až na výjimky [Gajecka a kol., 2006; Dong a kol., 2017] imbalance na zlomech zjištěny [Baptista a kol., 2005; Baptista a kol., 2008].

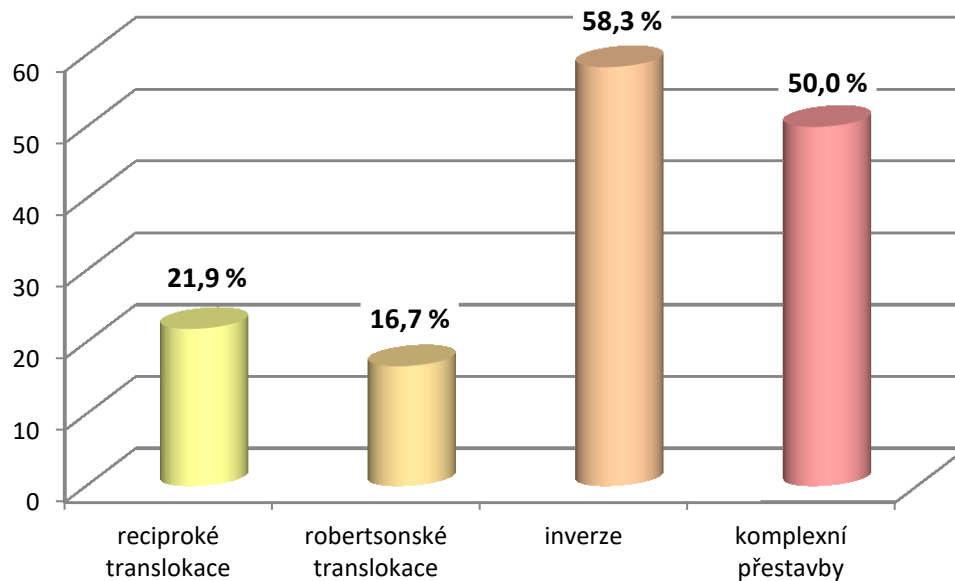
Nejvyšší záchyt CNV vyjádřený poměrem jedinců s nálezem abnormální varianty k celkovému počtu jedinců v konkrétní skupině byl zaznamenán ve skupině I (7/12, 58,3 %) (Obr. 11). Druhý nejvyšší záchyt (2/4, 50,0 %) byl ve skupině C. Ve skupině T byl zaznamenán 21,9% (7/32) záchyt abnormálních variant. Nejnižší záchyt (1/6, 16,7 %) byl zjištěn ve skupině R. Je však třeba mít na paměti, že počty jedinců v jednotlivých skupinách jsou malé, a tyto výsledky mohou být ovlivněny chybou malých čísel.

Tab. 9. Tabulka nálezů abnormálních CNV u pacientů v souboru. Případy označené hvězdičkou budou dále v textu diskutovány. Uvedený rozsah variant je dán rozmezím první a poslední aberované sondy. CNV lokalizované na zlomových místech přestaveb jsou v tabulce barevně zvýrazněny. **PAT** – patogenní, **P PAT** – pravděpodobně patogenní, **VOUS** – varianta nejasného významu, **P BEN** – pravděpodobně benigní, **BEN** – benigní.

Pacient	Karyotyp	CNV	Gen(y)	Klinický význam	Poznámka
Reciproké translokace					
T7*	46,XX,t(6;10)(q15;q11.2) <i>dn</i>	arr[GRCh37]6q16.3q21(104426530_112005167)x1 <i>dn</i> (7,6 Mb)	116 genů	PAT	Nález mimo zlomové místo translokace na derivovaném chr.
T11*	46,XX,t(1;12)(p36.2;q24.3) <i>mat</i>	arr[GRCh37]7q11.23(72726578_74139390)x3 <i>dn</i> (1,73 Mb)	53 genů	PAT	Williams-Beuren region duplikační syndrom (MIM#1609757)
T14	46,XX,t(4;17)(q25;q22) <i>mat</i>	arr[GRCh37]17q21.33(48532171_48590853)x3 <i>mat</i> (58 kb)	5 genů	P BEN	
T18*	46,XY,t(2;13)(q33;q32) <i>mat</i>	arr[GRCh37]1q31.3(197216521_197272070)x1 <i>pat</i> (55 kb)	<i>CRB1</i> , exon 2 - 4	P PAT	Retinitis pigmentosa 12 (MIM#1600105)
T21*	46,XY,t(9;17)(p13;q22) <i>mat</i>	arr[GRCh37]9p13.3p13.2(36271796_36893651)x4 <i>mat</i> (621 kb)	<i>GNE, RNF38,</i> <i>MELK,PAX5</i>	VOUS	
		arr[GRCh37]8q21.11(77576981_78043960)x1 (466 kb)	<i>ZFHX4, PEX2</i>	PAT	8q21.11 mikroleční syndrom (MIM#1614230)
T22*	46,XY,t(9;17)(p13;q22) <i>mat</i>	arr[GRCh37]9p13.3p13.2(36271796_36893651)x4 <i>mat</i> (621 kb)	<i>GNE, RNF38,</i> <i>MELK,PAX5</i>	VOUS	
		arr[GRCh37]2q13(110862477_110980401)x3 <i>mat</i> (117 kb)	<i>NPH1,</i> <i>MALL</i>	VOUS	
T23*	46,XY,t(3;16)(q21;p13.3) <i>mat</i>	arr[GRCh37]2p25.3p25.2(30341_6671363)x3 (6,6 Mb)	45 genů	PAT	Suspektní další nebalancovaná reciproká translokace
		arr[GRCh37]13q33.2q34(106032191_115089535)x1 (9 Mb)	113 genů	PAT	
Robertsonské translokace					
R1*	45,XY,rob(13;14)(q10;q10) <i>mat</i>	arr[GRCh37]17p13.1p12(9890609_11444181)x3 <i>mat</i> (1,5 Mb)	22 genů	VOUS	Polygenní komplex pro těžké řetězce myozinu (MYH)

Inverze					
I3	46,XY,inv(11)(p15.1q21)	arr[GRCh37]11q13.4q13.5(73768358_75652857)x3 (1,9 Mb)	56 genů	VOUS	Nález mimo zlomové místo inverze na derivovaném chr.
I4	46,X,inv(Y)(p11.2q11.223)pat	arr[GRCh37]Yp11.2(8833817_9126994)x3dn (293 kb)	-	BEN	Nálezy v genově chudých oblastech
		arr[GRCh37]Yq11.223(23566460_23649430)x3pat (82 kb)	-	BEN	
I6*	46,XY,inv(17)(q21.1q23)dn	arr[GRCh37]4p15.31(18059937_21095314)x1dn (3,03 Mb)	7 genů	VOUS	Nálezy v genově chudých oblastech
		arr[GRCh37]4p15.1(32202077_32959027)x1dn (756 kb)	LINC02353	VOUS	
		arr[GRCh37]4p13(42024833_43281360)x1dn (1,25 Mb)	13 genů; GRXCRI	VOUS	Přenašeč AR hluchoty (MIM#1613285)
		arr[GRCh37]4p12p11(48164374_49083290)x1dn (918 kb)	12 genů; TEC	VOUS	Nález v genově chudé oblasti
		arr[GRCh37]17q21.2(38873514_39565634)x1dn (692 kb)	59 genů	P PAT	Polygenní komplex pro keratiny a asociované proteiny
		arr[GRCh37]17q21.32(45904711_46271671)x1dn (399 kb)	20 genů; PNPO	VOUS	Přenašeč AR poruchy metabolismu vitamínu B6 (MIM#1610090)
		arr[GRCh37]17q21.32(46410502_47021848)x1dn (611 kb)	32 genů; HOXB1	VOUS	Polygenní komplex HOXB, přenašeč AR parézy obličeje (MIM#1614744)
		arr[GRCh37]17q21.33(48261448_49790776)x1dn (1,52 Mb)	41 genů; COL1A1	P PAT	AD porucha osteogenesis imperfecta (MIM#1166200)

I7*	46,XX,inv(13)(q31.2.q34) <i>dn</i>	arr[GRCh37]9p24.3(944302_1010408)x1 <i>dn</i> (66 kb)	5 genů	VOUS	
		arr[GRCh37]9p21.3(20195733_23486509)x1 <i>dn</i> (3,29 Mb)	57 genů; <i>CDKN2A</i>	P PAT	AD predispozice k tvorbě melanomů
		arr[GRCh37]9q21.11q21.13(70984481_76793061)x1 <i>dn</i> (5,80 Mb)	61 genů	P PAT	
		arr[GRCh37]13q34(113730429_113965068)x1 <i>dn</i> (234 kb)	12 genů; <i>F7, F10</i>	VOUS	Nález mimo zlomové místo inverze na derivovaném chr.
I8*	46,XY,inv(7)(q21.2q36) <i>dn</i>	arr[GRCh37]7q31.31q31.32(119861378_121256293)x1 <i>dn</i> (1,39 Mb)	15 genů	VOUS	Nález mimo zlomové místo inverze na derivovaném chr.
I9*	46,XY,inv(11)(q12q23.3)	Arr(8)x3[0.7] (146 Mb)	~ 1800 genů	PAT	~70% mozaika trizomie 8, Warkany syndrom 2
I10*	46,XX,inv(15)(q21.2q?23)	arr[GRCh37]Xp22.33(430240_690071)x3 <i>mat</i> (259 kb)	6 genů; <i>SHOX</i>	P BEN	
Komplexní přestavby					
C2	t(1;3;15)(1pter→1q42::3q26.31→3qter;3pter→3q25.1::1q4?3→1qter;15pter→15q?22::1q42→1q4?3::15q?22→15q2?6::3q25.1→3q26.31::15q2?6→15qter) <i>dn</i>	arr[GRCh37]3q24(143893025_145571843)x1 <i>dn</i> (1,67 Mb)	4 geny	VOUS	V blízkosti delece gen <i>SLC9A9</i> (MIM*608396), možné narušení regulačních oblastí
		arr[GRCh37]3q26.1(163955915_164683768)x1 <i>dn</i> (730 kb)	<i>SI</i>	VOUS	
		arr[GRCh37]15q22.2(60085937_60101782)x1 <i>dn</i> (16 kb)	-	BEN	
C4*	46,XY,t(1;6;14;18)(1pter→1q23::18p11.3→18pter;6pter→6q15::1q25→1q24::18q11.2→18qter;14pter→14q13?::6q24.2→6qter;1qter→1q25::18p11.2→18q11.2::6q15→6q24::14q13?→14qter) <i>dn</i>	arr[GRCh37]1q24.3(171938643_172600557)x1 <i>dn</i> (0,7 Mb)	11 genů	PAT	<i>DNM3</i> (MIM*611445)
		arr[GRCh37]6q24.1q24.2(142164956_144627966)x1 <i>dn</i> (2,5 Mb)	32 genů	PAT	Imprintované geny <i>PLAGL1</i> (MIM*03044) a <i>HYMAI</i> (MIM*606546).



Obr. 11. Graf zobrazuje porovnání záchytu genetických abnormalit v jednotlivých skupinách. Záchyt je vyjádřen v procentuálním zastoupení jedinců s nálezem k celkovému počtu jedinců v konkrétní skupině.

Většina výše zmíněných publikací se zabývá výhradně studiem souboru jedinců s reciprokými translokacemi. Dvě práce [Schluth-Bolard a kol., 2009; Feenstra a kol., 2011] uvádějí záchyt CNV i u probandů s inverzemi a komplexními přestavbami. Obě studie shodně uvádějí nejvyšší podíl nálezů ve skupině CCR, následovaný inverzemi [Schluth-Bolard a kol., 2009] nebo reciprokými translokacemi [Feenstra a kol., 2011]. Vysoký záchyt CNV ve skupině inverzí v naší studii lze odůvodnit skutečností, že minimálně u dvou přestaveb (I6 a I7), které byly původně hodnoceny jako prosté inverze, byla prokázána vyšší komplexita. Nejnižší podíl jedinců s nálezem CNV ve skupině robertsonských translokací vychází z podstaty tohoto typu přestaveb, kdy ke zlomům dochází buď v heterochromatinové pericentromerické oblasti nebo v genově chudé oblasti krátkých ramen akrocentrických chromozomů. Záchyt CNV v této skupině tak odpovídá spíše záchytu v publikovaných souborech s abnormálním fenotypem a normálním karyotypem.

Z celkového počtu osob s nálezem CNV bylo osm nosičů familiární chromozomové přestavby (osm z celkem 27 se zděděnou přestavbou; 29,6 %), u šesti jedinců vznikla aberace *de novo* (6/20; 30,0 %) a u zbývajících tří probandů nebyl původ přestavby objasněn (3/7; 42,9 %). V naší studii, stejně jako v předchozích [Ciccone a kol., 2005; Bisgaard a kol., 2006; Sismani a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009], tedy nebyl zjištěn významný rozdíl v celkovém záchytu CNV v závislosti na původu aberace. Rozdíl mezi nálezy CNV u familiárních a *de novo* aberací spočívá spíše v jejich lokalizaci a patogenitě, viz dále.

Nálezy na zlomových místech a mimo ně

U pěti nepříbuzných jedinců T14, I4, I6, C2, C4 a dvou bratrů T21/T22 (kteří ale sdílejí stejnou zděděnou CNV, proto budou na tomto místě započítáni jako jeden) lze v oblasti jednoho nebo více zlomových míst zdánlivě balancovaných aberací pozorovat kryptické imbalance v podobě CNV. To představuje 11,1 % z celkového počtu osob v souboru. U probandů T21, T22 a I6 byly zjištěny abnormální varianty jak v oblasti zlomových míst, tak i mimo ně (Obr. 12).

Publikované studie uvádějí celkový podíl přestaveb doprovázených kryptickou CNV v oblastech zlomů v souborech nosičů vyšší, 20 – 40 % [Gribble a kol., 2005; Ciccone a kol., 2005; Bisgaard a kol., 2006; De Gregori a kol., 2007; Sismani a kol., 2008; Higgins a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009; Gijsbers a kol., 2010; Feenstra a kol., 2011], přičemž u *de novo* aberací lze tyto imbalance pozorovat přibližně dvakrát častěji než u familiárních [Sismani a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009]. V našem souboru byl záchyt CNV na zlomech celkově nižší a podobný u nosičů familiárních (T14, I4, T21/T22) a *de novo* přestaveb (I6, C2, C4), což lze částečně odůvodnit odlišným složením našeho souboru oproti zmiňovaným studiím. Nejpravděpodobněji lze CNV v místě zlomu zaznamenat u *de novo* komplexních přestaveb (až u 75 %) a převažujícími CNV jsou delece [Gribble a kol., 2005; De Gregori a kol., 2007; Sismani a kol., 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009; Feenstra a kol., 2011], čemuž odpovídají i výsledky naší studie.

V souladu s publikovanými poznatky [Aristidou a kol., 2017 a 2018] byly v našem souboru u nosičů familiárních balancovaných aberací patogenní CNV pouze koincidentní s primárním nálezem chromozomové přestavby; pokud byly u zděděných přestaveb nalezeny imbalance v oblastech zlomových míst, byly hodnoceny jako benigní, pravděpodobně benigní nebo VOUS. Rodič s chromozomovou přestavbou byl ve všech případech nosičem i této CNV. Tyto zděděné varianty byly zjištěny u čtyř pacientů, třikrát maternálního původu (T14, T21, T22), a jednou paternálního (I4). Jednalo se o duplikace, u případů T21 a T22 šlo o triplikaci.

Naopak CNV patogenní, pravděpodobně patogenní a VOUS potenciálně kauzální pro abnormální fenotyp pacientů, lokalizované v místech zlomů, byly spojeny výhradně s aberacemi vzniklými *de novo*. Tyto varianty byly pozorovány u tří osob (I6, C2, C4) a jednalo se o vícečetné delece na několika z mnoha zlomových míst.

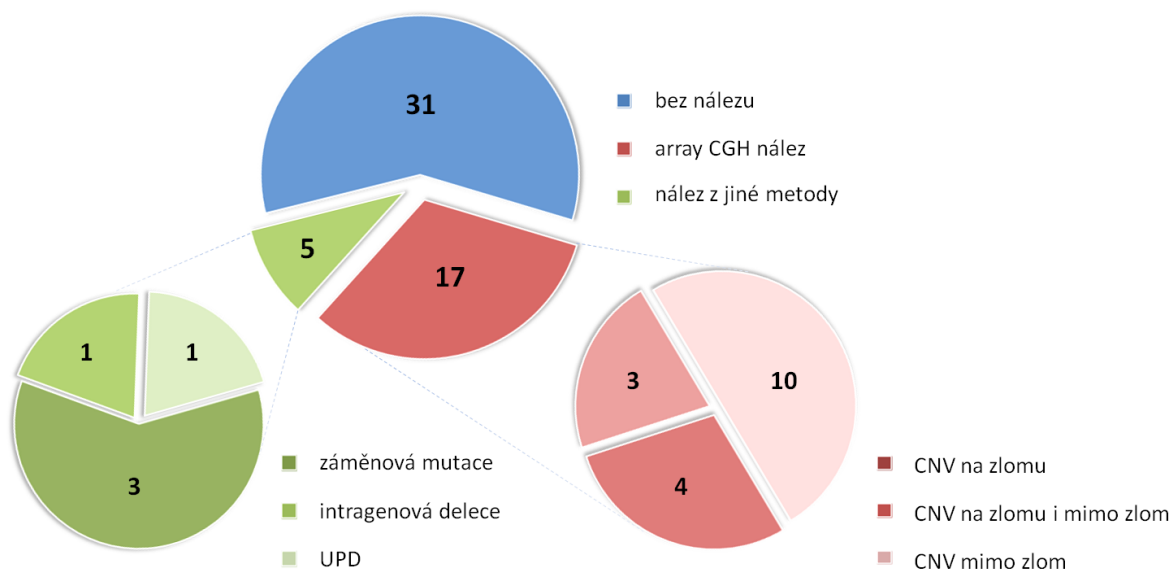
U deseti pacientů (18,5 % z celkového počtu) byly abnormální CNV nalezeny pouze mimo předpokládaná zlomová místa aberací. Tento podíl je ve shodě s 15 – 20% záchytem

ve skupině probandů s abnormálním fenotypem, ale normálním karyotypem [Menten a kol., 2006; Stankiewicz a Beudet, 2007; Bruno a kol., 2009; Miller a kol., 2010; Vissers a kol., 2010; Pfundt a kol., 2012; Bartnik a kol., 2014]. U čtyř probandů (T7, I3, I7 a I8) byly CNV lokalizovány na derivovaném chromozomu, naznačující tak možnost vyšší komplexity přestavby, což bylo v literatuře opakovaně popsáno [Cicccone a kol., 2005; De Gregori a kol., 2007; Sismani a kol., 2008; Feenstra a kol., 2011; Tabet a kol., 2015; Redin a kol., 2017].

U případů, kde nebyla nalezena žádná kauzální CNV, byla zvažována možnost, že zlomy přestaveb narušují kódující sekvenci genů citlivých na dávku [Chen a kol., 2008, 2010; Sobreira a kol., 2011; Talkowski a kol., 2011; Simioni a kol., 2017; Schluth-Bolard a kol., 2019] anebo jejich regulačních oblastí [Schluth-Bolard a kol., 2013, 2019] či působí jinak pozičním efektem [Fantes a kol., 1995; Kleinjan a van Heyningen, 1998, 2005; Kleinjan a Lettice, 2008]. Bylo zjištěno, že ke genovým disrupcím dochází u bezpříznakových nosičů BCA s podobnou frekvencí jako u fenotypově abnormálních nosičů, tj. 35 – 50 % [Baptista a kol., 2008; Fantes a kol., 2008; Redin a kol., 2017; Schluth-Bolard a kol., 2019], a s ohledem na možné odmaskování recesivní mutace druhé alely genu narušeného zlomem bylo vytipování kandidátních genů provedeno nejen u *de novo*, ale i u familiárních přestaveb v našem souboru.

U pacientů T1, T8 a I10 byla disrupce kandidátních genů zlomem aberace vyloučena metodou BA FISH.

U některých pacientů, u nichž array CGH ani FISH provedené v rámci naší studie nevedly k žádnému pozoruhodnému nálezu, pokračovalo jejich vyšetřování dalšími, doplňujícími metodami. U pěti případů bez nálezu CNV tak byla genetická abnormita zjištěna jinou, cílenou molekulární metodou. Ve třech případech šlo o záměnovou patogenní mutaci v genu kauzálním pro AD poruchu (u pacienta T4 se jednalo o gen *SHOX*, u T13 o gen *COL4A5* a u T31 o *SCN1A*), v jednom případě (T15) se jednalo o intragenovou delecii exonů v genu *IKBKG* kauzálním pro AD chorobu a v jednom případě (T25) byla příčinou abnormálního fenotypu uniparentální heterodizomie chromozomu 15 nesoucího imprintované geny (Obr. 12).



Obr. 12. Přehled nálezů u pacientů v souboru. Graf zachycuje rozdělení jedinců v souboru dle nalezených genetických abnormalit.

Patogenita/klinický význam CNV

Z celkových 34 CNV (Obr. 13) nalezených u 17 osob lze z hlediska klinické významnosti osm variant označit za patogenní (23,5 %) a kauzální pro daný abnormální fenotyp probandů a pět (14,5 %) za pravděpodobně patogenní. Klinická významnost dalších 16 CNV (47 %) zůstává nejasná (VOUS). Dvě pravděpodobně benigní (6 %) a tři benigní (9 %) varianty nebyly na rozdíl od běžných benigních CNV z naší studie vyloučeny, neboť jsou lokalizovány v oblastech zlomových míst, případně nelze zcela vyloučit jejich částečný podíl na fenotypu, viz dále.

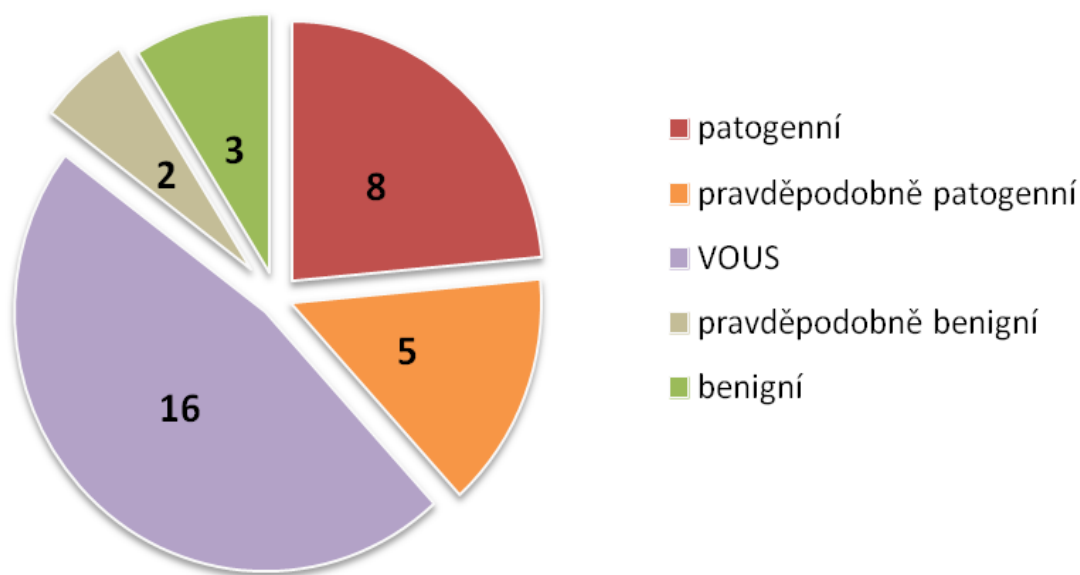
Jako patogenní s kauzálním dopadem na abnormální fenotyp probandů byly hodnoceny dvě delece v oblastech zlomů komplexní přestavby (C4), intersticiální delece velkého rozsahu na derivovaném chromozomu mimo zlomové místo (T7), dále varianty představující známý mikroduplikační (T11) a mikroleční (T21) syndrom, nebalancovaná translokace sestávající z terminální delece a duplikace (T23) a též mozaiková trizomie autozomu (I9).

Za pravděpodobně patogenní byly označeny imbalance v místech zlomů u pacientů I6 a I7, které jsou většího rozsahu s vyšším obsahem genů či obsahují geny, jejichž porucha funkce by mohla mít spojitost s jejich abnormálním fenotypem (celkem čtyři CNV) a dále intragenová delece spojená s AR poruchou u probanda T18, u něhož nebyla dosud vyšetřena druhá alela genu.

Označení VOUS bylo přiděleno delečním variantám v oblastech zlomových míst (I6, I7, C2) i mimo ně (I8) obsahujícím alespoň jeden gen, ale nemajícím zřejmou spojitost s abnormálním fenotypem (celkem 11 CNV) a též duplikacím většího rozsahu u pacientů R1, I3, T22. Specifickým nálezem u dvou bratrů (T21 a T22) byla identická triplikace v oblasti zlomového místa zděděná spolu s translokací od matky.

Jako pravděpodobně benigní byly označeny dvě duplikační varianty, z nichž jedna je lokalizována v místě zlomu familiární translokace a je rovněž zděděná (T14) a druhá se nachází v oblasti, jejíž duplikace postihují fenotyp, ale zjevně nedosahuje kritického rozsahu (I10). Za benigní pak byly označeny tři varianty bez obsahu známého genu (dvě CNV u pacienta I4, jedna u C2), nelze je však pominout vzhledem k jejich lokalizaci v oblastech zlomových míst přestaveb.

Připočítáme-li k patogenním a pravděpodobně patogenním CNV v oblastech zlomových míst u jedinců C4 a I6 také patogenní působení skutečně balancované aberace, indukující uniparentální heterodizomii (T25), lze přítomnost zdánlivě či skutečně balancované aberace jednoznačně označit za příčinu abnormálního fenotypu pacientů ve třech případech, což představuje 5,5 % z celkového počtu osob v souboru.



Obr. 13. Rozdělení CNV zjištěných u pacientů v souboru z hlediska klinické významnosti.

Z hlediska počtu osob i zastoupení zjevně balancovaných přestaveb v souboru je naše studie nejlépe srovnatelná s prací Feenstra a kol. [2011]. Tato studie byla rovněž provedena na souboru 54 jedinců s jednoduchou (40 reciprokých translokací, šest inverzí) či komplexní přestavbou (osm CCR); na rozdíl od našeho souboru byly všechny BCA pouze *de novo*

původu. U 17/54 (31 %) pacientů, tj. u 11/42 (24 %) jednoduchých přestaveb a 6/8 (75 %) CCR bylo zaznamenáno celkem 25 CNV, ve všech případech se jednalo o delece. U deseti osob z 54 v souboru (18,5 %) byla nalezena alespoň jedna CNV v oblasti zlomových míst přestavby, u šesti (11 %) byly CNV jinde v genomu a u jednoho pacienta (1,9 %) byly zjištěny CNV na zlomech i mimo ně. Z celkového počtu CNV bylo 16 (64 %) vyhodnoceno jako pravděpodobně patogenní nebo patogenní, šest jako VOUS (24 %) a tři (12 %) jako pravděpodobně benigní nebo benigní. Data ze zmíněné práce se tedy v mnohém podobají výsledkům naší studie. Zvýšený záchyt pravděpodobně patogenních a patogenních CNV především v oblastech zlomových míst lze odůvodnit *de novo* původem přestaveb, kdy bývá záchyt přirozeně vyšší [Sismani a kol, 2008; Schluth-Bolard a kol., 2009]. V případě, že by do naší studie byli zahrnuti pouze pacienti s *de novo* přestavbami, u 6/20 (30 %) osob by bylo zjištěno 19 CNV. U tří pacientů (15 %) by se CNV nacházely v oblasti zlomových míst, u dalších tří na derivovaném chromozomu mimo předpokládané místo zlomu.

Patogenní a pravděpodobně patogenní varianty a vybrané případy VOUS budou v textu dále diskutovány.

Výsledky vyšetření array CGH - rozbor vybraných variant

Patogenní varianty

CNV související s přestavbou

Chromotripse; del 1q24.3 a del 6q24.1q24.2 (C4)

Pacientem C4 je chlapec s intrauterinní i postnatální růstovou retardací, faciální dysmorfii, obezitou, MR a PMR. Ve věku jednoho roku byla u něho karyotypováním zjištěna zjevně balancovaná strukturní přestavba mezi chromozomy 1, 6, 14 a 18 (Obr. 14, A). Nález byl upřesněn mFISH (Obr. 14, B, C) a mBAND derivovaných chromozomů 1 a 6. Popis přestavby sestávající z jedenácti segmentů byl:

46,XY,t(1;6;14;18)(1pter→1q23::18p11.3→18pter;6pter→6q15::1q25→1q24::18q11.2→18qter; 14pter→14q13?::6q24.2→6qter;1qter→1q25::18p11.2→18q11.2::6q15→6q24::14q13?→14qter).

Analýza metodou array CGH a SNP array prokázala dvě delece v oblastech předpokládaných zlomových míst, obě *de novo* na chromozomech paternálního původu.

V deletované oblasti 1q24.3 o velikosti 0,7 Mb (Obr. 14, D) jsou čtyři protein kódující geny, a sice *DNM3* (MIM*611445), *PIGC* (MIM*601730), *CIORF105* (GCID: GC01P172389) a *SUCO* (GCID: GC01P172532). Druhá, 2,5 Mb dlouhá delece v oblasti 6q24.1q24.2 (Obr. 14, E) zahrnuje 15 genů, mezi nimiž jsou imprintované geny *PLAGL1* (MIM*603044) a *HYMAI* (MIM*606546).

Z důvodu značné komplexity přestavby bylo provedeno celogenomové NGS metodou mate-pair. To potvrdilo předchozí nálezy a navíc odhalilo další přestavby menšího rozsahu. Z výsledků je patrné, že v průběhu spermatogeneze došlo k fragmentaci čtyř zúčastněných chromozomů na 29 segmentů delších než 1 kb. Tyto fragmenty byly následně pospojovány do podoby derivovaných chromozomů v náhodném pořadí a orientaci. Byly také identifikovány další dvě delece přilehlé ke zlomům, a sice ~30kb ztráta v oblasti 14q13.3, postihující většinu genu *PAX9* (MIM*167416) a ~2kb delece v oblasti 6q14.1. Vyšetřením byl také zpřesněn rozsah obou větších delecí identifikovaných čipovými metodami.

Kromě zmíněných genů obsažených v delecích došlo následkem zlomů k disrupci pěti dalších, a to *FILIP1* (MIM*607307), *PHIP* (MIM*612870), *HMG3* (MIM*604502), *AK097143* a *GAREM* (MIM*617998).

Celkově bylo identifikováno 21 zlomových míst, všechny byly ověřeny a upřesněny pomocí PCR a Sangerova sekvenování. Byly pozorovány zlomy bez změny sekvence, ale také

několikabázové duplikace a delece v rozsahu jednotek či desítek bází, ohraničující některé segmenty.

Navzdory zjištěné vysoké komplexitě přestavby, dalším zlomům a genovým disrupcím je většina znaků abnormálního fenotypu probanda s největší pravděpodobností zapříčiněna dvěma původně nalezenými velkými delecemi v oblastech 1q24.3 a 6q24.1q24.2.

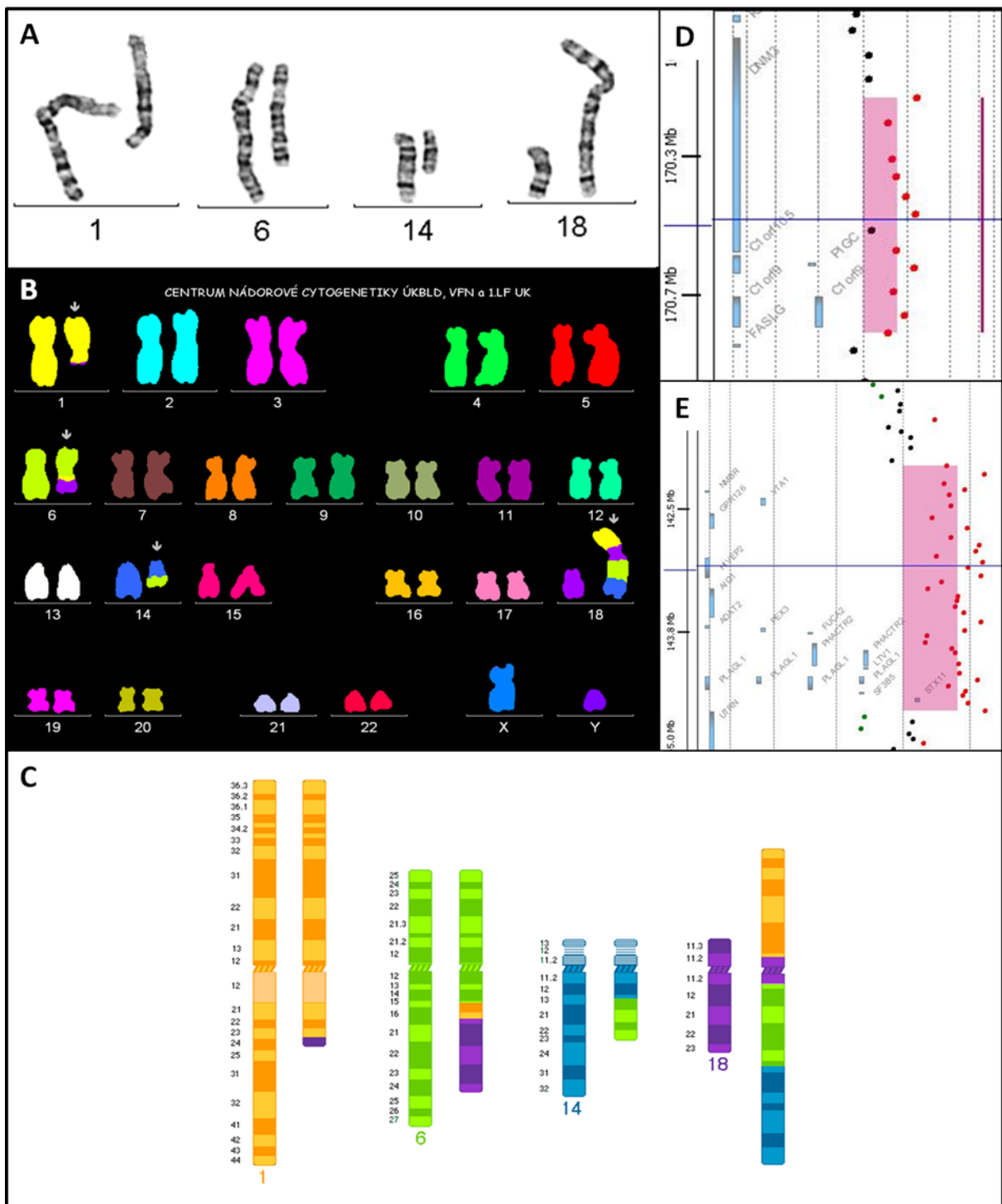
U popsanych delecí 1q24.3 překrývajících se s delecí pacienta C4 je uváděna MR, intrauterinní i postnatální růstová retardace, krátké končetiny, brachydaktylie a specifická stigmatizace obličeje [Ashraf a kol., 2015; Chatron a kol., 2015]. V 0,7 Mb delecí je obsažen ~ 0,5 Mb kritický region pro 1q24 - q25 deleční syndrom obsahující gen *DNM3* a klastr *MIR199/214/3120*. *DNM3* kóduje dynamin 3, exprimovaný v mozku a míše v postsynaptických oddílech neuronů. Protein pomáhá recyklaci receptorů na synaptickou membránu a tím posílí synapse [Lu a kol., 2007]. Delece je pravděpodobně hlavní příčinou poruchy růstu a MR pacienta C4. Míru podílu ostatních genů v delecí 1q24.3 na fenotypu probanda nelze s jistotou stanovit.

I delece 2,5 Mb v oblasti 6q24.1q24.2 obsahuje geny, jejichž haploinsuficience může přispívat k fenotypu pacienta C4. Jde hlavně o *PLAGL1* a *HYMAI*, maternálně imprintované geny, jejichž nadměrná exprese nejčastěji vlivem UPD je spojena s tranzientním neonatálním diabetem a poruchami příjmu potravy [Arima a kol., 2001]. U pacientů s paternální delecí oblasti je popisována prenatální i postnatální růstová retardace, MR a faciální stigmatizace [Stagi a kol., 2015]. V deletované oblasti jsou lokalizovány i další geny, jejichž porucha může mít vliv na fenotyp probanda, např. *HIVEP2* (MIM*143054), jehož *de novo* mutace byly popsány u pacientů s MR [Srivastava a kol., 2016; Steinfeld a kol., 2016].

Z genů disruptovaných zlomy přestavby by mohl mít význam gen *PHIP*, coby suspektní kandidátní gen pro intelektovou nedostatečnost [de Ligt a kol., 2012]. Naopak ageneze zubů spojená s defekty genu *PAX9* [Bonczek a kol., 2017], jehož kopie byla inaktivována delecí v místě zlomu, nebyla u pacienta C4 zaznamenána.

Komplexní přestavba u pacienta C4 nese známky chromotripse [Stephens a kol., 2011; Maciejowski a kol., 2015], zejm. nahromadění zlomů v klastrech v několika chromozomových oblastech. Segmenty definované zlomy jsou různé velikosti včetně velmi malých v řádu desítek párů bází, reorganizované v náhodném pořadí a orientaci, doprovázené delecemi, ale bez duplikací či triplikací. Většina nových spojení těchto segmentů odpovídá strukturou vzniku mechanismem NHEJ. Nasvědčuje tomu absence repetitivních elementů ve zlomových místech, chybějící či krátké mikrohomologie a drobné delece a duplikace

v řádu jednotek párů bází. U několika spojení lze uvažovat i mechanismus MMEJ. Pacient C4 byl publikován [Slamova a kol., 2018] (Příloha 1).



Obr. 14. Výsledky vyšetření pacienta C4. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 1, 6, 14 a 18. **B.** Výsledek mFISH, translokační deriváty jsou označeny šipkami. **C.** Idiogramové znázornění komplexní přestavby. **D.** Detail delece 1q24.3 s uvedením genů. **E.** Detail delece 6q24.1q24.2 s uvedením genů.

CNV nesouvisející s přestavbou

Del 6q16.3q21 (T7)

U pacientky T7 byla pozorována intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retardation, IUGR) a vrozená srdeční vada (VCC), později růstová retardace navazující na IUGR, PMR, celková hypotonie, hraniční mikrocefalie a mírná stigmatizace obličeje. Karyotypováním byla zjištěna *de novo* translokace t(6;10)(q15;q11.2) a suspektní delece materiálu z úseku chromozomu 6 translokovaného na chromozom 10 (Obr. 15, A).

Array CGH toto podezření potvrdilo. Dívka má 7,6 Mb deleci 6q16.3q21 (Obr. 15, B, C, D) postihující 116 genů. V oblasti zlomů translokace žádná imbalance není.

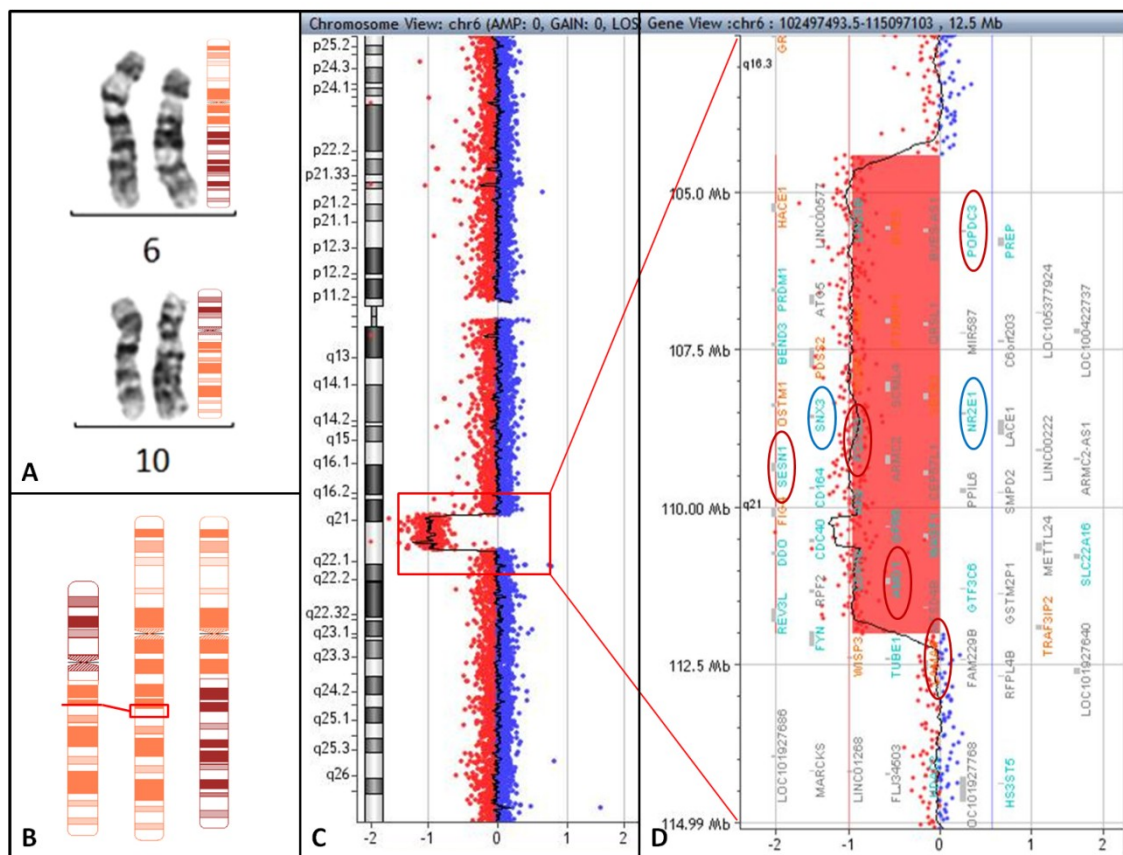
Intersticiální delece 6q jsou vzácné. Závažnost a charakter fenotypu jsou dány rozsahem a lokalizací do proximální, centrální či distální části 6q. Delece v proximální oblasti (6q11q16, skupina A) jsou spojeny s herniemi, se stigmatizací a vadami srdce [Vlckova a kol., 2012] (Příloha 4). U centrálních delecí (6q15q25, skupina B) je popisována IUGR, mikrocefalie, hypertelorismus, respirační obtíže a malformace končetin. U distálních delecí (6q25qter, skupina C) jsou vady sítnice, rozštěpy patra a hypogonadismus. Ve všech skupinách delecí 6q je uváděna MR, anomálie ušních boltců, hypotonie a postnatální opoždění růstu [Hopkin a kol., 1997]. Růstová retardace, mikrocefalie a stigmatizace u pacientky T7 odpovídá delecím skupiny B, zde s přesahem do skupiny A.

V literatuře lze najít podobné delece [Nakagome a kol., 1980; Cote a kol., 1981; Schwartz a kol., 1984; Horigome a kol., 1991], ale popisované fenotypy se často liší. Většina publikovaných případů vycházela z G pruhování. Rosenfeld a kol. [2012] se snažili u dvanácti jedinců s překrývajícími se delecemi definovanými pomocí array CGH upřesnit korelaci deletovaných oblastí v rámci regionu 6q15q22.33 se znaky fenotypu centrálních delecí 6q. Zjistili, že vývojové vady mozku a pohybové poruchy jsou především u delecí překrývajících 6q22.1, epilepsie a neurologické problémy u delecí zasahujících 6q22.2q22.32.

Byly vytipovány dva geny z 6q21, které se mohou podílet na rozvoji mikrocefalie, a sice *NR2E1* (MIM*603849) a *SNX3* (MIM*605930). *NR2E1* je exprimován v mozku a produkuje nukleární receptor nutný pro kortikální neurogenezi a diferenciaci neurálních kmenových buněk [Stenman a kol., 2003]. *SNX3* kóduje protein z rodiny sorting nexinů a *de novo* translokaci disruptující *SNX3* měl pacient s mikrocefalií, mikroftalmií, ektrodaktylií a prognatismem [Vervoort a kol., 2002]. Oba geny jsou u pacientky T7 deletovány.

Publikace [Rosenfeld a kol., 2012] stanovuje i kritický region pro vrozené srdeční vady (chr6: 106,63_113,69 Mb (GRCh38)), který odpovídá delecí u pacientky T7

(chr6: 104,42_112,00 Mb). Ta zahrnuje *POPDC3* (MIM*605824), kandidátní gen pro vývojové vady srdce [Andree a kol., 2000], ale i další geny spojené s vývojem a funkcí srdečního svalu, *SESNI* (MIM*606103), *FOXO3* (MIM*602681) a *AMD1* (MIM*180980). Disrupce *SESNI* byla popsána u syndromu heterotaxe [Peeters a kol., 2006]. *FOXO3* kóduje transkripční faktor regulující velikost a proliferaci kardiomyocytů [Skurk a kol., 2005]. *AMD1* kóduje enzym pro syntézu polyaminů nezbytných k proliferaci buněk srdečního svalu [Nisenberg a kol., 2006]. Mutace *LAMA4* (MIM*600133), který již není delecí zasažen, ale je v těsné blízkosti jejího distálního zlomu, byly asociovány s dilatační kardiomyopatií [Knoll a kol., 2007]. Abnormální fenotyp pacientky T7 je ve shodě s publikovanými případy i s podobnými nálezy v genomových databázích. Podoba fenotypu může být dále ovlivňována případnými disrupcemi genů zlomy *de novo* přestavby či pozičním efektem. Je možná i vyšší komplexita přestavby vzhledem k delecí téhož chromozomu lokalizované mimo zlom translokace.



Obr. 15. Výsledky vyšetření pacientky T7. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 6 a 10. Translokace je znázorněna barevnými idiogramy. **B.** Delece materiálu z 6q na der(10). Po stranách jsou oba deriváty translokace, uprostřed normální chromozom 6. **C.** Array CGH, delece je zvýrazněna červeným obdélníkem. **D.** Detail delece s uvedením genů. Modře jsou označeny geny související s mikrocefalií, červeně s VCC. Všechny idiogramy použité v této práci byly vytvořeny v programu CyDAS [Hiller, Bradtke, Balz and Rieder, 2004], <http://www.cydias.org/OnlineAnalysis/>.

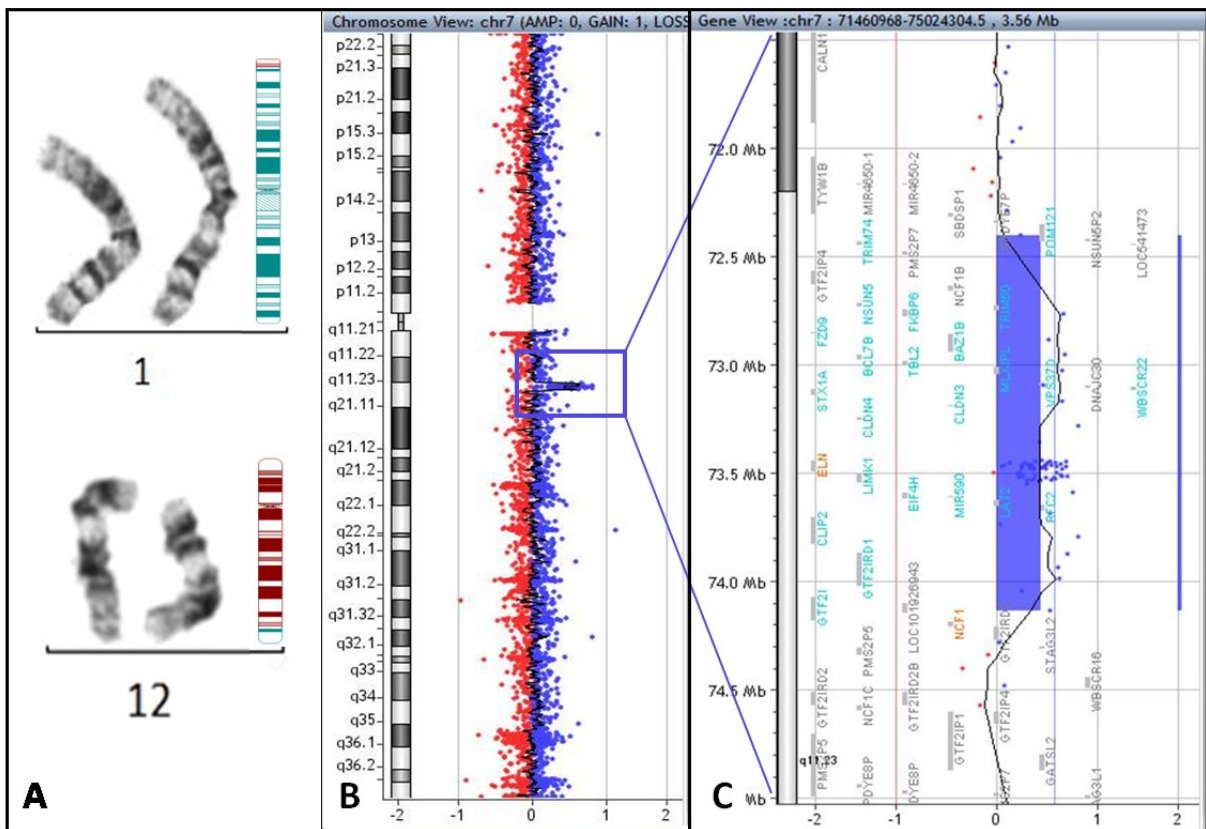
Somerville - Van der Aa mikroduplikační syndrom; dup 7q11.23 (T11)

Pacientka T11 má maternálně zděděnou translokaci t(1;12)(p36.2;q24.3) (Obr. 16, A), lehkou faciální stigmatizaci a PMR, především opoždění vývoje řeči.

Array CGH prokázala *de novo* 1,73 Mb duplikaci 7q11.23 (Obr. 16, B, C). Delece této oblasti je spojena s Williams-Beuren syndromem (WBS; MIM#1194050).

7q11.23 duplikační syndrom (Somerville-Van der Aa syndrom; MIM#1609757) má variabilní projev, nejčastěji se vyskytuje PMR (u 44 % pacientů), opoždění řeči (u 10 %) [Somerville a kol., 2005] a mírný faciální dysmorfismus (odpovídající stigmatizaci naší pacientky), někdy i VCC či VVV (brániční kýla). MRI odhalilo u více než 80 % postižených strukturní anomálie mozku. Pacienti mohou vykazovat MR a/nebo PAS (u 19 %), byli však popsáni i jedinci s normálním intelektem [Van der Aa a kol., 2009, Morris a kol., 2015].

Nejčastěji jsou tyto duplikace *de novo*, ale byly popsány i případy zděděné od více či méně postiženého rodiče. Pacientka T11 má duplikaci *de novo*. Nelze vyloučit, že některý z rodičů má kryptickou inverzi 7q11.23. Tento benigní polymorfismus významně zvyšuje riziko postižení potomků WBS či 7q11.23 duplikačním syndromem [Morris a kol., 2015].



Obr. 16. Výsledky vyšetření pacientky T11. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 1 a 12. Translokace je znázorněna barevnými ideogramy. **B.** Array CGH, duplikace 7q11.23 je zvýrazněna modrým obdélníkem. **C.** Detail duplikace s uvedením genů.

8q21.11 mikrolečnický syndrom, del 8q21.11 a trp 9p13.3p13.2 (T21)

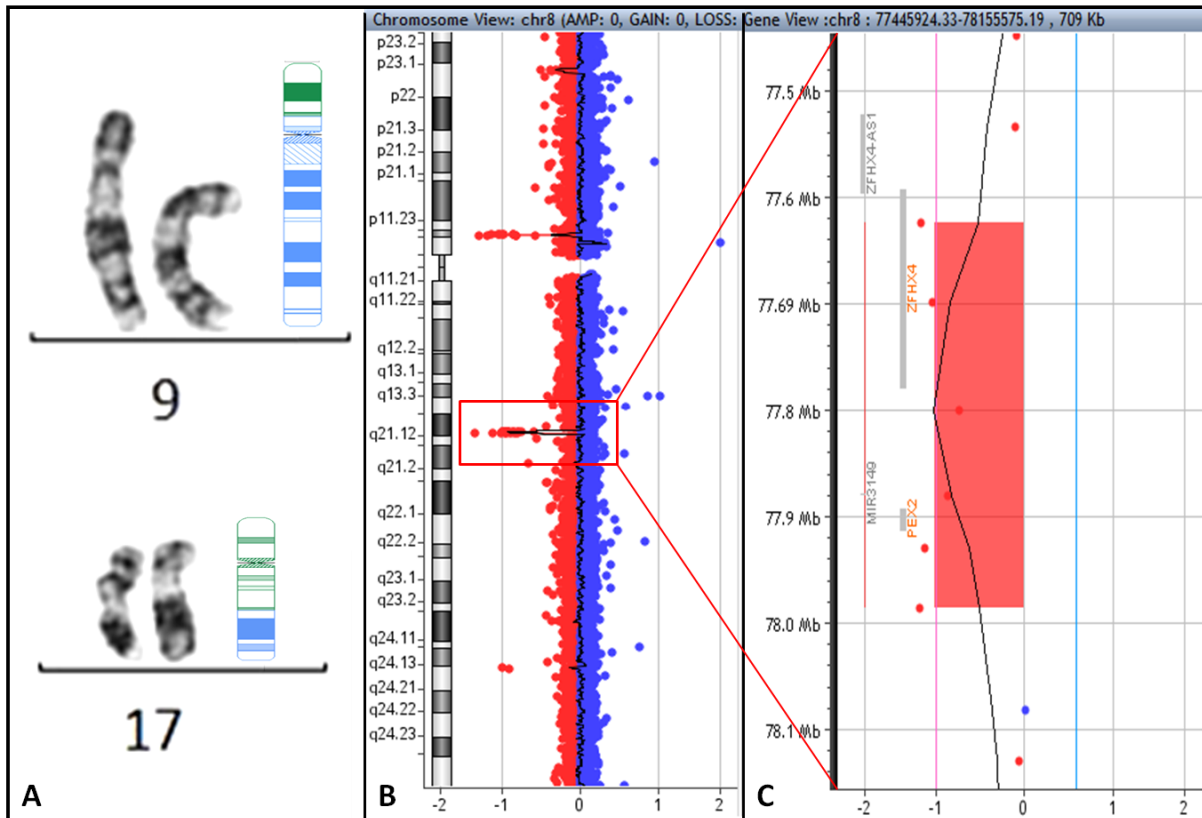
Pacient T21 a jeho starší bratr T22 jsou nosiči maternálně zděděné reciproké translokace t(9;17)(p13;q22) (Obr. 17, A). Proband T21 byl vyšetřován pro stigmatizaci, atypický PAS, vývojovou dysfázii s poruchou vývoje řeči a lehkou až středně závažnou MR.

Vyšetřením array CGH byla u pacienta T21 i jeho bratra nalezena triplikace 9p13.3p13.2 (Obr. 25, B, C) v oblasti jednoho ze zlomových míst, která ale byla hodnocena jako VOUS, a proto bude diskutován dále v textu. Pacient dále nese 466 kb delecii v oblasti 8q21.11 (Obr. 17, B).

Delece 8q21.11 zasahuje pouze dva geny – *ZFHX4* (MIM*606940) a *PEX* (MIM*170993) (Obr. 17, C). Delece regionu jsou spojeny s mikrolečnickým syndromem 8q21.11 (MIM#1614230). Palomares a kol. [2011] popsali osm jedinců s delecemi o rozsahu 0.6 – 13,5 Mb s podobným fenotypem. Všichni měli okrouhlou tvář s plnými tvářemi, vysoké čelo, ptózu očních víček, krátké filtrum, horní ret ve tvaru Kupidova luku, koutky úst stočené dolů, menší spodní čelist, nízko posazené odstávající uši a anomálie prstů (kamptodaktylie, syndaktylie, rozšířené distální falangy prstů). Často pozorované byly i oční vady (zákal rohovky, sclerocornea, microphthalmia, katarakta), hypotonie, porucha rovnováhy, sluchu a PMR. Pacienti trpěli lehkou až středně těžkou MR. Fenotyp pacienta T21 výše popsaným charakteristikám plně odpovídá.

V oblasti překryvu delecí byl pouze gen *ZFHX4*. Jeho produktem je transkripční faktor exprimovaný v mozku, kosterním svalstvu a v játrech. *ZFHX4* je považován za kandidátní gen pro AD izolovanou vrozenou ptózu očních víček (MIM#1178300). U všech pacientů s poruchou vývoje očí byl společně se *ZFHX4* deletovaný i *PEX2*. Tímto genem je kódován protein nezbytný pro import proteinů do peroxisomové matrix. Mutace *PEX2* jsou spojeny s AR poruchou peroxizomové biogeneze, Zellwegerovým syndromem (MIM#1614866), jehož oční projevy se shodují s nálezy u pacientů s mikrolečnicí 8q21.11 (zakalená rohovka, vrozená katarakta, glaukom, anomálie sítnice a jiné). Happ a kol. [2016] popisují u dvou pacientů i postižení předního segmentu oka, Petersovu anomálii, projevující se centrálním zákalem rohovky s adhezí přední strany čočky k vnitřní vrstvě rohovky.

Delece 8q21.11 jsou většinou *de novo*, výjimečně mohou být zděděny od postiženého rodiče s mírnějším fenotypem. U pacienta T21 matka tuto delecii nenesí; nelze ale vyloučit, že delece byla zděděna od otce obou chlapců, který chodil do zvláštní školy a má ptózu očních víček. Jeho biologický materiál však nebyl dostupný a tuto domněnku není možné potvrdit.



Obr. 17. Výsledky vyšetření pacienta T21. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 9 a 17. Translokace je znázorněna barevnými idiogramy. **B.** Array CGH, delece 8q21.11 je zvýrazněna červeným obdélníkem, další přítomná delece v oblasti 8p je běžným benigním polymorfismem zděděným od matky. **C.** Detail delece 8q21.11 s uvedením genů.

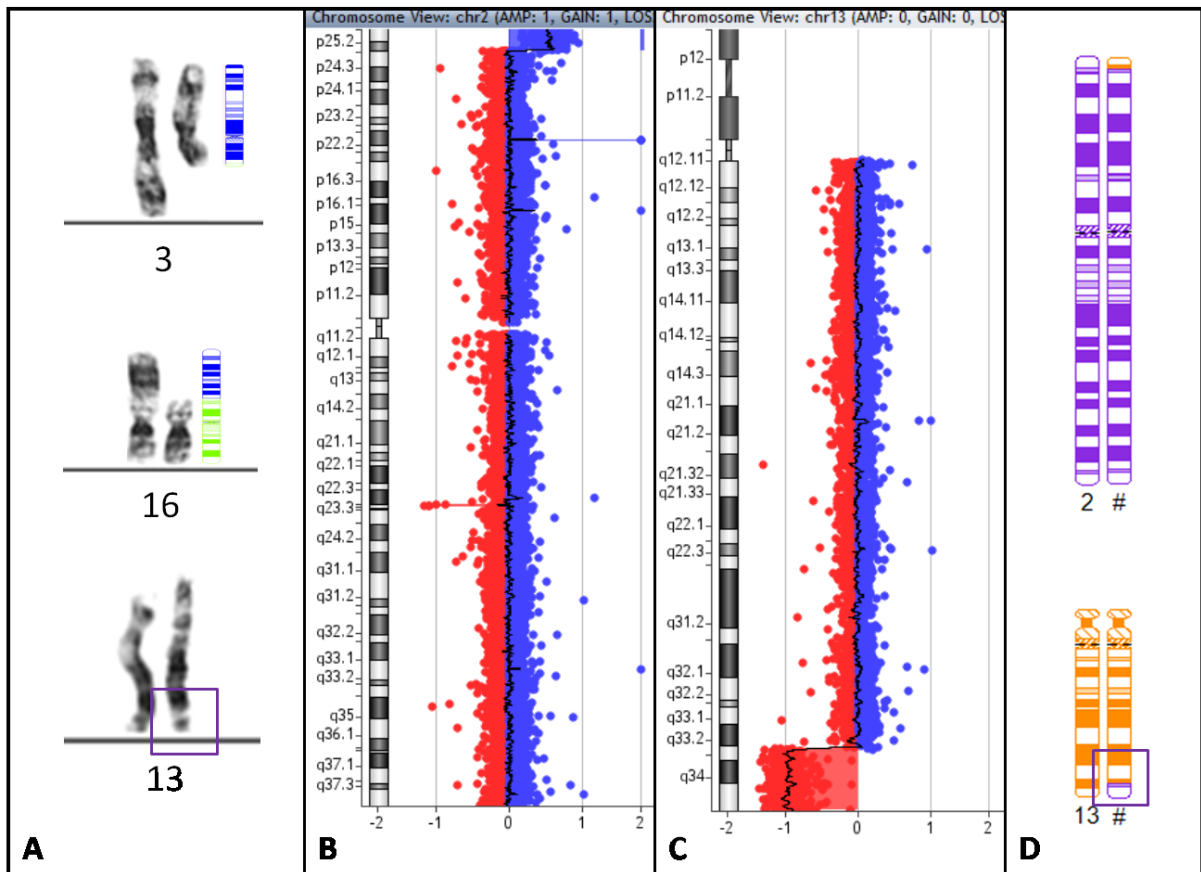
Nebalancovaná translokace; dup 2p25.3p25.2 a del 13q33.2q34 (T23)

Pacientem T23 je chlapec vyšetřovaný pro IUGR a navazující poruchu růstu, mikrocefalii, faciální stigmatizaci, ataxii, hypogenitalismus a těžkou MR. Proband je nosičem zjevně balancované reciproké translokace $t(3;16)(q21;p13.3)$ (Obr. 18, A) zděděné od nepostižené matky. Karyotyp otce pacienta byl hodnocen jako normální.

Vyšetření metodou array CGH neodhalilo v místech zlomových míst zmíněné translokace žádné imbalance. Byla však zjištěna 6,6 Mb terminální duplikace oblasti 2p25.3p25.2 (Obr. 18, B) a 9 Mb terminální delecce oblasti 13q33.2q34 (Obr. 18, C).

Duplikovaná oblast 2pter obsahuje minimálně 45 genů. Vliv jejich zmnožení na abnormální fenotyp probanda je ale nejasný. V databázi Decipher je mnoho podobných duplikací, které jsou hodnoceny většinou jako nejasné. Některé z nich byly zděděny od nepostiženého rodiče. Převažujícími znaky jsou PMR, MR a mikrocefalie. Delecí 13qter je zasaženo minimálně 113 genů. V databázi DECIPHER je uvedeno mnoho podobných nebo menších delecí hodnocených převážně jako patogenní, méně často jako nejasné. Nejčastějšími znaky jsou MR, mikrocefalie, IUGR, malá postava a stigmatizace. Bellucco a kol. [2019] uvádějí pacienta s nízkou porodní hmotností i délkou, hypoplázií a malformací genitálu, hypotonií, mikrocefalií, stigmatizací, středně těžkou MR, hypoplázií mozečku a 11,9 Mb terminální delecí 13q33.1. Další pacient s kruhovým chromozomem 13 s terminální delecí 13q33.1 délky 11,1 Mb a parciální duplikací 13q33.1 délky 1,5 Mb též vykazoval podobný fenotyp s mikrocefalií, růstovou i MR a hypoplázií genitálu.

Vzhledem k rozsahu, množství obsažených genů a shodě abnormálního fenotypu pacienta T23 s publikovanými případy lze nalezené varianty, především delecí 13qter, považovat za patogenní a kauzální. U probanda se nejspíše jedná o nebalancovanou formu reciproké translokace $t(2;13)(p25.2;q33.2)$ (viz obr. 18, D), která je na rozdíl od přestavby $t(3;16)(q21;p13.3)$ kryptická a klasickým karyotypováním nerozlišitelná (viz obr. 18, A, zcela dole). Buněčná suspenze rodičů probanda již není k dispozici, a není proto možné prokázat, který z nich je nosičem druhé přestavby. Starší sestra otce pacienta T23 zemřela v perinatálním období a jeho paternální teta trpěla MR a zemřela ve věku 15 let; vzhledem k této pozitivní rodinné anamnéze lze připustit možnost, že otec je nosičem balancované přestavby.



Obr. 18. Výsledky vyšetření pacienta T23. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 3 a 16. Translokace je znázorněna barevnými idiogramy. Dole vpravo derivovaný chromozom 13. **B., C.** Array CGH, duplikace terminální oblasti 2p, delecce terminální oblasti 13q. Další přítomná delecce a duplikace na obr. 18, B jsou běžnými benigními polymorfismy. **D.** Idiogramové znázornění suspektní kryptické balancované translokace t(2;13), derivovaný chromozom 13 přítomný u probanda je označen fialovým obdélníkem.

Trizomie chromozomu 8 v mozaice (I9)

Pacient I9 byl cytogeneticky vyšetřen ve věku 15 let pro podezření na Klinefelterův syndrom (47,XXY). Chlapci byla v době vyšetření diagnostikována chronická myeloidní leukémie (CML). Vyšetření konstitučního karyotypu z lymfocytů periferní krve přítomnost nadbytečného X neprokázalo, avšak bylo zjištěno, že proband je nosičem inv(11)(q12q23.3) (Obr. 19, A). Současně bylo provedeno karyotypování vzorku kostní dřeně s výsledkem: 47,XXY,t(9;22)(q34;q11)[3]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[5].

Vyšetření metodou array CGH odhalilo konstituční trizomii chromozomu 8 v cca 70% mozaice (Obr. 19, B). Přesná hodnota zastoupení trizomické linie v mozaice (71,4 %) byla stanovena pomocí výpočtu odhadu frekvence mozaiky (c) [Manning a kol., 2010] optimalizovaného na našem pracovišti (Mgr. Jana Drábová, Ph.D.) podle vzorce:

$$c (\%) = \left| \frac{L'}{\bar{L}} \right| \times 100,$$

kde (L') je hodnota Log2Ratio aberace, jejíž stupeň mozaiky chceme odhadnout, (\bar{L}) je průměrem hodnot Log2Ratio dalších aberací stejné povahy (delece/duplikace) téže analýzy, o kterých lze předpokládat, že jsou zastoupeny ve stu procent buněk.

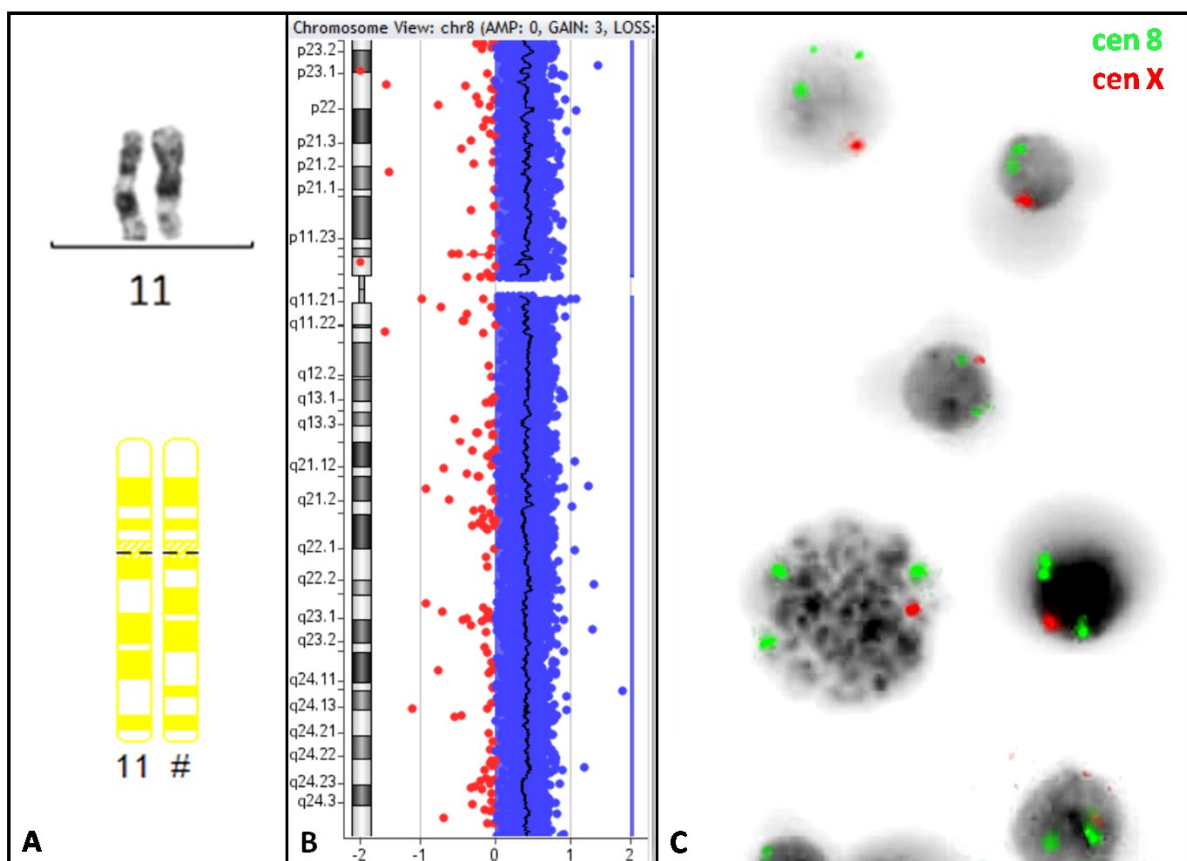
Syndrom konstituční trizomie 8 v mozaice (T8MS), známý jako Warkanyho syndrom 2 (ORPHA: 96061), je vzácná porucha s častějším výskytem u mužů (~ 5:1). Kompletní trizomie 8 je letální a zárodek je potrácen již v prvním trimestru. T8MS má vysoce variabilní projev a pacienti vykazují škálu postižení od nenápadného fenotypu s normálním intelektem až po těžké malformace skeletu i orgánů a hlubokou MR. Míra postižení nekoreluje se stupněm mozaicizmu a biologický mechanismus dosud není objasněn, což ztěžuje prognózu [Miller a kol., 1997; Jordan a kol., 1998]. Mezi nejčastější znaky patří omezená pohyblivost kloubů, abnormity obratlů a žeber, hluboké rýhy na dlaních a chodidlech, kamptodaktylie, abnormální rysy obličeje a anomálie očí. Asi u čtvrtiny případů byly různé srdeční vady a ojediněle ageneze corpus callosum. Jedinci s T8MS mají zvýšené riziko leukémie či myelodysplastického syndromu [Ripperger a kol., 2011]. Příčinou je abnormální fyziologie trizomických mezenchymových kmenových buněk kostní dřeně vedoucí k neregulované proliferaci a expanzi progenitorových buněk [Narendran a kol., 2004].

Metodou FISH s centromerickou sondou pro chromozom 8 bylo prokázáno, že ve vzorku kultivované tkáně, ať jde o lymfocyty, kůži či prenatální vzorky, je signifikantní rozdíl v poměru normální buněčné linie a linie s trizomií 8 v interfázních jádrech oproti mitózám. V interfázních jádrech bývá zachyceno cca dvojnásobné množství trizomických buněk než v mitózách a pokud jsou lymfocyty periferní krve kultivovány, podíl trizomických

jader se významně snižuje oproti lymfocytům vyšetřeným bez kultivace [Altner a kol., 2016]. Obojí naznačuje růstovou nevýhodu buněk s trizomií [Hulley a kol., 2003]. To může objasnit, proč nebyla u pacienta I9 trizomická linie zachycena již při vyšetření konstitučního karyotypu z mitóz kultivovaných lymfocytů periferní krve. Při stanovení karyotypu z kostní dřeně je kvalita chromozomů velmi nízká a chromozomy X a 8 jsou si typově velice podobné, došlo tedy patrně k jejich záměně a trizomie 8 byla mylně považována za dizomii X, viz výše.

Na základě nálezu konstituční mozaiky trizomie 8 byla metodou FISH s použitím centromerické sondy pro chromozomy 8 a X (Obr. 19, C) zpětně vyšetřena archivovaná suspenze buněk kostní dřeně pacienta I9. Trizomie 8 byla prokázána u cca 84 % vyšetřovaných buněk, přítomnost mozaiky dizomie X nebyla potvrzena.

T8MS u pacienta I9 může být příčinou CML, doprovázenou získanou translokací t(9;22), vytvářející Philadelphský chromozom. Ostatní znaky fenotypu pacienta zatím nebyly objasněny.



Obr. 19. Výsledky vyšetření pacienta I9. **A.** Parciální karyotyp derivovaného chromozomu 11. Inverze je znázorněna barevným idiogramem. **B.** Array CGH, trizomie chromozomu 8 v mozaice. **C.** FISH za použití centromerických sond pro chromozomy 8 a X. V jádrech je patrna přítomnost tří signálů pro centromeru chromozomu 8 (Obrázek laskavě poskytl Ing. Lucie Hodaňová, Ph.D., Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, I. LF UK a VFN v Praze).

Pravděpodobně patogenní varianty

CNV související s přestavbou

Vícečetné delece, chromotripse (I6)

Pacient I6 nesl zjevně balancovanou paracentrickou inverzi dlouhých ramen chromozomu 17 - inv(17)(q21.1q23). Chlapec měl závažnou kostní dysplazii.

Vyšetřením array CGH byly u pacienta zjištěny delece v oblastech 17q21.2 (692 kb), 17q21.32 (399 kb a 611 kb) a 17q21.33 (1,52 Mb), které polohou odpovídají lokalizaci inverze a zároveň naznačují vyšší komplexitu přestavby (Obr. 20, A, B). Navíc byla zjištěna série delecí i na krátkých ramenech chromozomu 4 (Obr. 20, C, D) v oblastech 4p15.31 (3,03 Mb), 4p15.1 (756 kb), 4p13 (1,25 Mb) a 4p12p11 (918 kb). Všechny nalezené delece jsou *de novo* a *in cis* fázi, jak bylo potvrzeno FISH (Obr. 20, E, F, G).

Zatímco delece na krátkých ramenech chromozomu 4 se nacházejí v genově chudých oblastech a navzdory své velikosti zasahují jen nízký počet genů, delece na dlouhých ramenech chromozomu 17 obsahují geny spojené s AR i AD dědičnými poruchami. Projev těchto poruch je ovšem povětšinou vázán na missense mutace zapříčiňující abnormální funkci proteinů, nikoli na snížení exprese vlivem heterozygotní delece či disrupce genů. Dvě delece, 17q21.33 a 17q21.2, obsahují geny, jejichž funkce by mohla souviset s abnormálním fenotypem pacienta, a byly proto hodnoceny jako pravděpodobně patogenní.

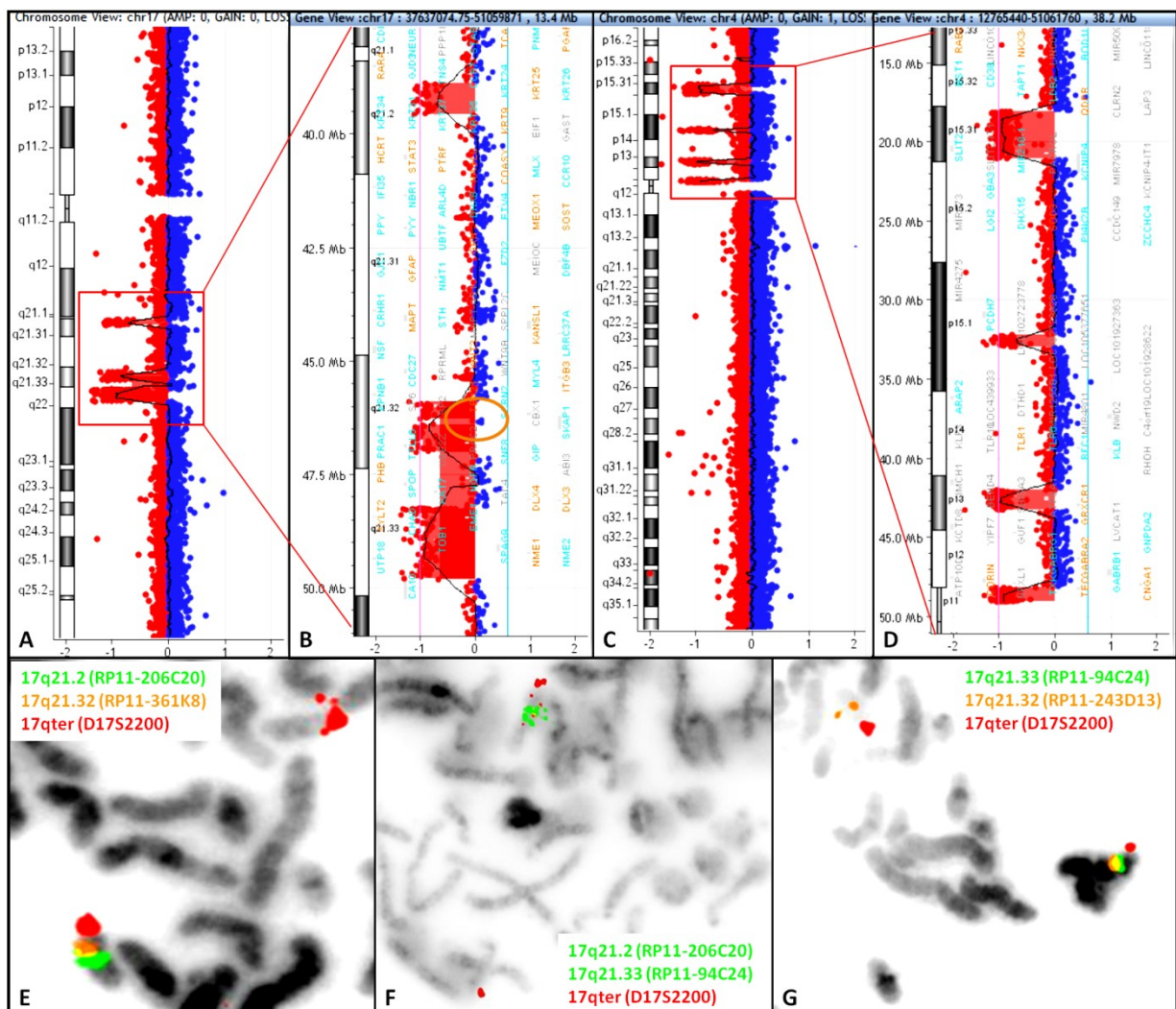
Delecí 17q21.33 je zasažen komplex keratinových genů *KRT25* – *KRT31* (MIM*616646 – *601077), jejichž funkce ovlivňuje strukturu epitelů, vlasů a nehtů. U pacienta 296423 v databázi DECIPHER se podobná delece projevila mj. kudrnatými suchými vlasy, suchou kůží a tenkými nehty.

V oblasti proximálního zlomu delece 17q21.2 se nachází gen *COL1A1* (MIM*120150), jehož mutace jsou spojeny s osteogenesis imperfecta I (OI type I, MIM#1166200). Ve vzácných případech může být mírnější fenotyp OI typu 1 způsoben delecemi různého rozsahu [van Dijk a kol., 2010; Bardai a kol., 2016].

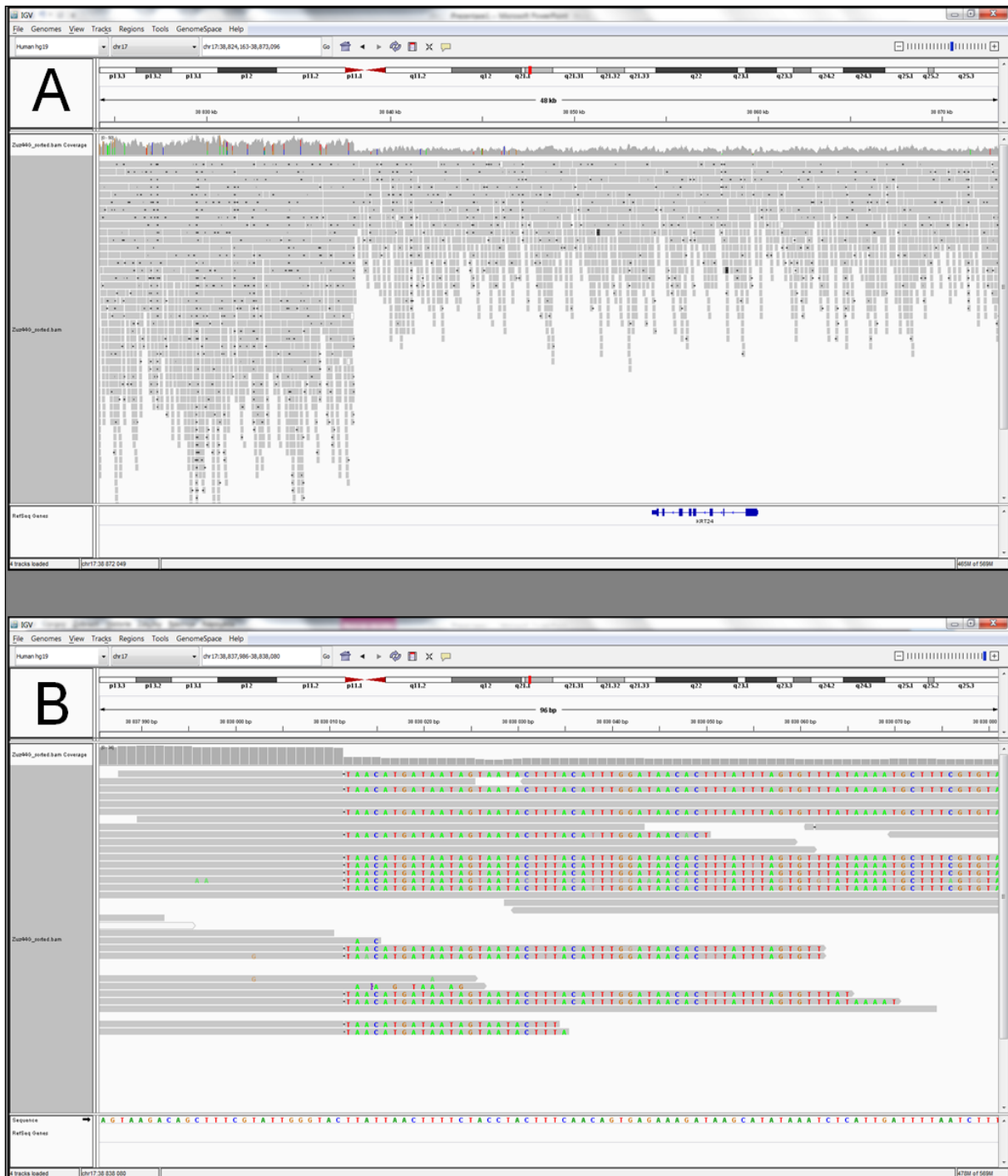
U pacienta I6 bylo provedeno celogenomové sekvenování (Obr. 21, A, B), které odhalilo mnohem komplexnější povahu aberace, což je spojeno i s nepřesným stanovením inverze chromozomu 17 z karyotypu. Bylo zjištěno, že chromozom 17 byl u pacienta rozbit na 19 segmentů (Tab. 10), z nichž byly čtyři ztraceny (delece detekované i array CGH) a zbývajících 15 segmentů (4 invertované) bylo náhodně pospojováno do derivovaného chromozomu 17 (Obr. 22). Velmi podobná situace nastala na chromozomu 4, kde však nebyl

zavzat celý chromozom, ale pouze jeho krátká raménka. Ta byla rozbita do 21 segmentů (Tab. 10), z čehož byly čtyři ztraceny (delece z array CGH) a ostatní segmenty (8 invertovaných) byly opět náhodně zkombinovány do nových krátkých ramének (Obr. 22). Pozoruhodné je, že na rozdíl od pacienta C4 a většiny publikovaných případů chromotripse [Kloosterman a kol., 2011; 2012; 2013; Chiang a kol., 2012; Nazaryan a kol., 2014; Eisfeldt a kol., 2019] nezahrnuje přestavba u pacienta I6 žádné interchromozomové výměny nebo přesuny.

Vzhledem k vysokému počtu zlomů v různých oblastech chromozomů 4 a 17 lze složitou přestavbu považovat za kauzální, abnormální fenotyp probanda je tak nejspíš vytvářen spolupůsobením delecí, inverzí a disrupcí genů a regulačních sekvencí.



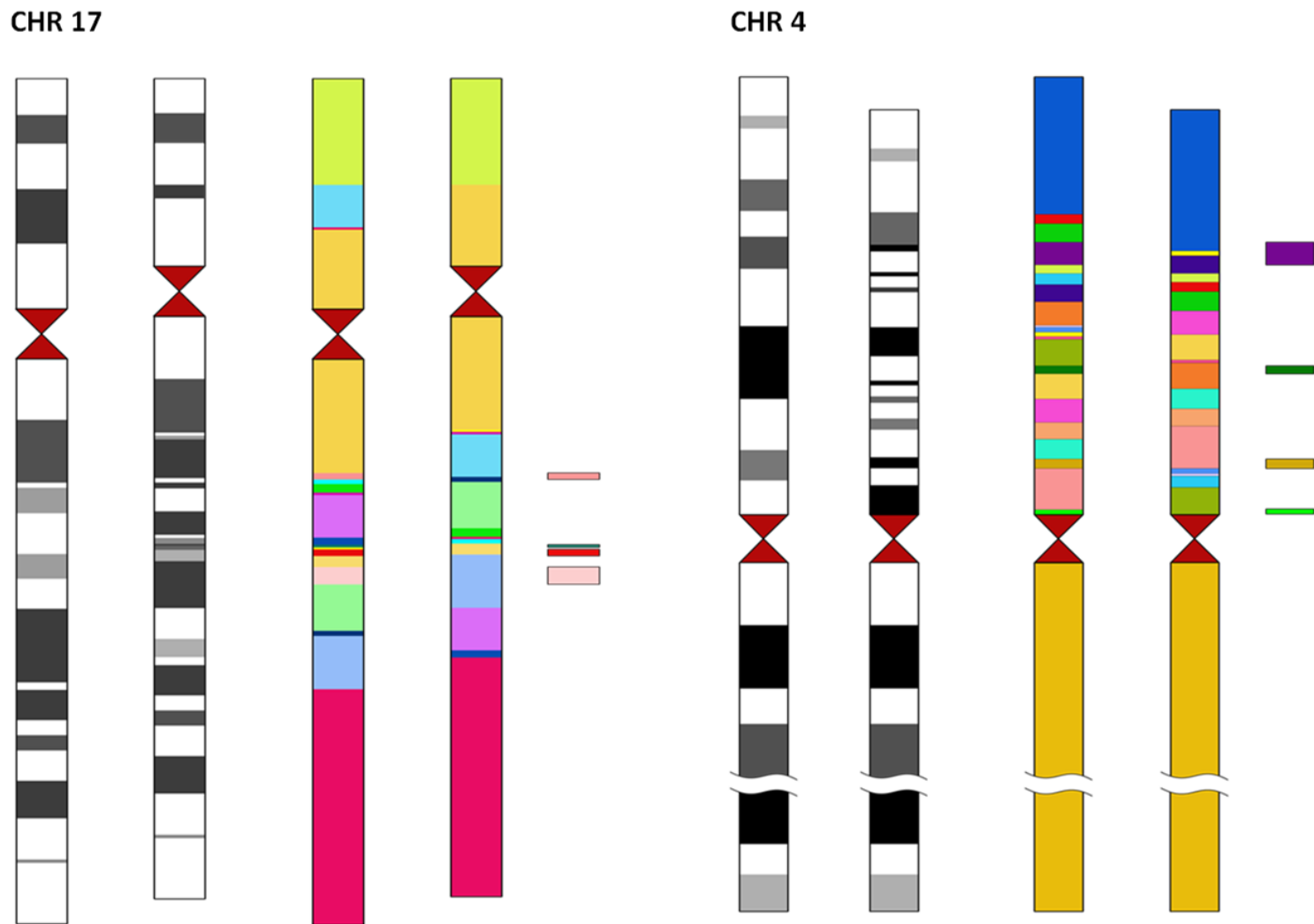
Obr. 20. Výsledky vyšetření pacienta I6. **A.** Array CGH, série delecí v oblasti 17q. **B.** Detail delecí na 17q. **C.** Série delecí v oblasti 4p. **D.** Detail delecí na 4p. **E., F.** FISH potvrdila, že se delece na 17q nacházejí ve fázi *cis*. **G.** Metodou FISH bylo rovněž prokázáno, že oblast 17q21.32 (na obrázku B zvýrazněna oranžovým oválem) není na derivovaném chromozomu deletována.



Obr. 21. Identifikace zlomu jedné z delecí na chromozomu 17 v genomových datech zobrazených v Integrative Genomics Viewer (IGV). **A.** Oblast dlouhá 48 kb. **B.** Přibližný výřez dlouhý 96 bp. Poloha na chromozomu a genomové koordináty jsou ukázány v horní části okna. Níže je diagram celkového pokrytí, které na začátku delecce zřetelně klesá. To je vidět i v centrální části okna na zobrazení jednotlivých readů (ve formě šedivých obdélníků). Větší přiblížení zobrazí i nukleotidovou sekvenci readů, pokud se liší od reference (což je případ všech readů, které přemostíují zlom delecce).

Tab. 10. Tabulka znázorňující pořadí a přesný rozsah segmentů chromozomů 17 a 4 definovaných metodou pair-end WGS. Deletované segmenty jsou červeně zvýrazněny. Přímá orientace segmentu (+), invertovaná (-).

Chromozom 17 začátek segmentu	konec segmentu	orientace segmentu
38838011	39589035	del
45892476	46281249	del
46362202	47037605	del
48206686	49839050	del
1 (ptel)	10476388	+
14784342	38838011	+
46281250	46362202	+
40779946	41028234	+
14755718	10476388	-
54346521	54957037	+
49839050	54346521	+
39936675	40779946	+
14755718	14784342	+
39936675	39589035	-
48206686	47037605	-
54957037	60157747	+
45162734	41028325	-
45162734	45892476	+
60157748	81195210 (qtel)	+
Chromozom 4 začátek segmentu	konec segmentu	orientace segmentu
18059335	21105198	del
32189273	32969745	del
42017478	43297978	del
48155207	cen (kolem 49-50Mb)	del
1 (ptel)	15277748	+
28642617	28509267	-
23119798	24643712	+
21519754	21105198	-
16221819	15277748	-
18059335	16221819	-
38208912	35665125	-
32969745	35665125	+
28829688	28642617	-
24643712	28199897	+
40200360	42017478	+
40200360	38208912	-
43297978	48155207	+
28253338	28609266	+
28199897	28253338	+
23119798	21519754	-
28829688	32189273	+
cen (kolem 49-50 Mb)	191154276 (qtel)	+



Obr. 22. Idiogramy chromozomů 17 a 4 pacienta I6, znázorňující uspořádání fragmentů na normálním (vlevo) a derivovaném (vpravo) chromozomu. Zcela vpravo jsou znázorněny ztracené fragmenty odpovídající poloze delecí z výsledků array CGH.

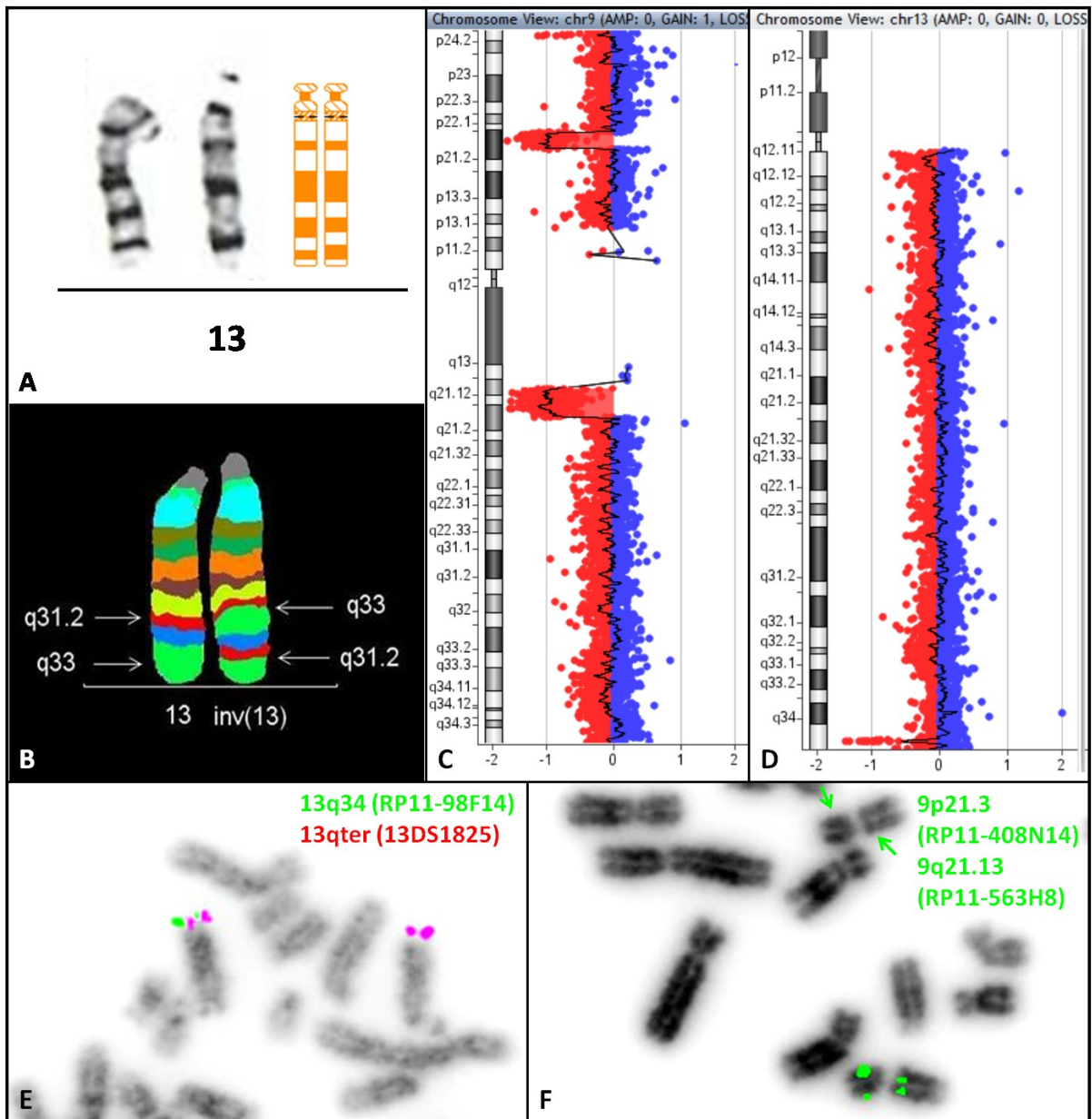
Vícečetné delece, pravděpodobná chromotripse (I7)

Pacientka I7 nesla balancovanou paracentrickou inverzi $\text{inv}(13)(\text{q}31.2\text{q}33)$ (Obr. 23, A, B). Dívka měla středně těžkou MR s eretismy, ADHD a stigmatizací.

U pacientky byly array CGH zjištěny vícečetné delece na obou ramenech chromozomu 9 v oblastech 9p24.3 (66 kb), 9p21.3 (3,29 Mb), 9q21.11q21.13 (5,80 Mb) (Obr. 23, C). Navíc byla zjištěna delece v blízkosti předpokládaného zlomového místa inverze 13q34 (234 kb) (Obr. 23, D). Metodou FISH bylo prokázáno, že všechny delece leží ve fázi *cis* na jednom chromozomu 9 (Obr. 23, F) a také, že zmíněná delece na chromozomu 13 je nezávislá na zlomovém místě inverze (Obr. 23, E).

Podobně jako u pacienta I6 je i u pacientky I7 přes značný celkový rozsah delecí počet zasažených genů poměrně nízký. Navíc žádný z nich nebyl dosud spojen s poruchou, která by se dala považovat za příčinu abnormálního fenotypu probandky. Bylo však vysloveno podezření na podobný mechanismus vzniku a vysokou komplexitu přestavby, která by mohla příčinu postižení pacientky I7 objasnit.

Případy I6 a I7 vykazují značnou míru podobnosti. Oba pacienti mají vyšší komplexitu původně popsané přestavby a u obou byly navíc nalezeny další aberace jiného autozomu, též s mnoha zlomovými místy (celkem 39 zlomů na obou chromozomech u pacienta I6 a min. 10 u pacientky I7; dají se však u ní očekávat další kryptické přestavby). Výsledný profil vyšetření obou pacientů připomíná mechanismus chromotripse, podobně jako tomu bylo u pacienta C4, s výše uvedenými rozdíly u pacienta I6. Celogenomové sekvenování u pacientky I7 právě probíhá.



Obr. 23. Výsledky vyšetření pacientky I7. **A.** Parciální karyotyp derivovaného chromozomu 13. Idiogram obou párových chromozomů, derivovaný vpravo. **B.** Výsledek mBAND, změna ve vzorci pořadí barevných pruhů umožňuje přesnější odhad zlomových míst aberace **C.** Array CGH, série delecí na chromozomu 9. **D.** Delece v oblasti 13q34. **E.** Vyšetření FISH potvrdila delecii na invertovaném chromozomu 13. **F.** Delece na chromozomu 9 jsou ve fázi *cis*, deletovaný chromozom je označen šipkami.

CNV nesouvisející s přestavbou

Intragenová delece; del 1q31.3 (T18)

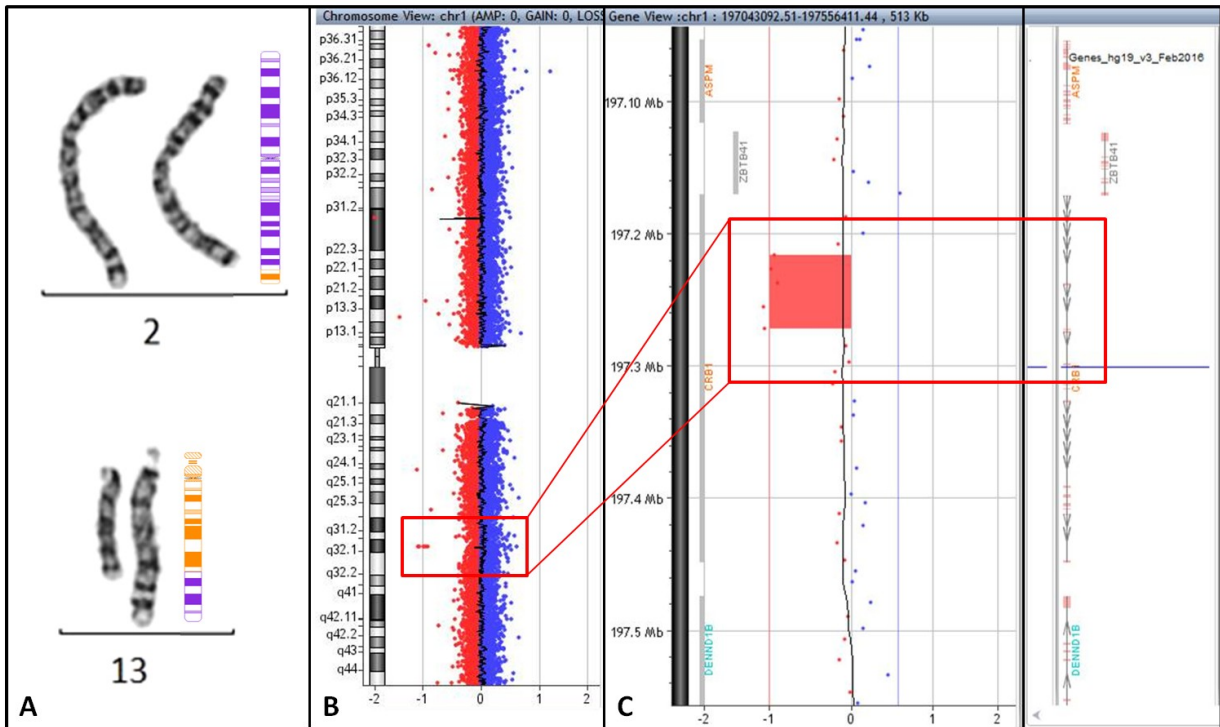
Pacientem T18 je jinak nepostižený nevidomý muž s diagnózou retinitis pigmentosa, nosič balancované translokace $t(2;13)(q33;q32)$ (Obr. 24, A) zděděné od matky. Syn maternální sestřenice pacienta je rovněž postižen slepotou se stejnou diagnózou retinitis pigmentosa.

Vyšetřením array CGH byla zjištěna 55 kb intersticiální delece 1q31.3 (Obr. 24, B), zasahující exony 2-4 genu *CRB1* (MIM*604210) (Obr. 24, C).

CRB1 kóduje protein fotoreceptorů, hrající roli v embryonálním utváření sítnice. Heterozygotní mutace *CRB1* způsobují AD pigmented paravenous chorioretinal atrophy (MIM172870) s lokální pigmentací a atrofií sítnice. Porucha je většinou inaparentní nebo se projevuje jen hyperopii či ezotropií.

Vyřazení obou alel *CRB1* způsobuje AR Leberovu kongenitální amaurozu 8 (MIM#1613835) nebo retinitis pigmentosa 12 (MIM#1600105). Patogeneze obou onemocnění spočívá v narušení apoptózy během vývoje sítnice [Jacobson a kol., 2003].

Proband delecii zdědil od otce. Přesné informace o kvalitě jeho zraku nejsou dostupné, nebyl však postižen slepotou. Vzhledem k fenotypu, který odpovídá AR chorobě asociované s *CRB1*, lze uvažovat možnost, že je proband T18 složeným heterozygotem s delecí jedné alely genu zděděnou od otce a mutací druhé alely, předávající se v maternální větvi rodiny (stejně postižený syn sestřenice). Sekvenování genu *CRB1* probanda je vyžádáno, varianta byla prozatím hodnocena jako pravděpodobně patogenní.



Obr. 24. Výsledky vyšetření pacienta T18. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 2 a 13. Translokace je znázorněna barevnými idiagramy. **B.** Array CGH, delece 1q31.3 je zvýrazněna červeným obdélníkem. **C.** Detail delece se znázorněním zasažených exonů genu *CRB1*.

Vybrané varianty nejasného významu

CNV související s přestavbou

trp 9p13.3p13.2 a dup 2q13 (T22)

Pacient T22 měl MR lehkého stupně a poruchu pozornosti a chování (ADHD). Karyotypování u něho (stejně jako u jeho mladšího bratra T21, viz dříve) ukázalo maternálně zděděnou balancovanou reciprokou translokaci t(9;17)(p13;q22) (Obr. 25, A).

Array CGH odhalila imbalance v místě zlomu přestavby, cca 600 kb triplikaci 9p13.3p13.2 (Obr. 25, B). Amplifikaci mají oba bratři i jejich matka. Přesná struktura přestavby není známa, neboť není k dispozici buněčná suspenze pro vyšetření metodou FISH. U pacienta byla zjištěna i cca 100 kb duplikace 2q13 (Obr. 25, D).

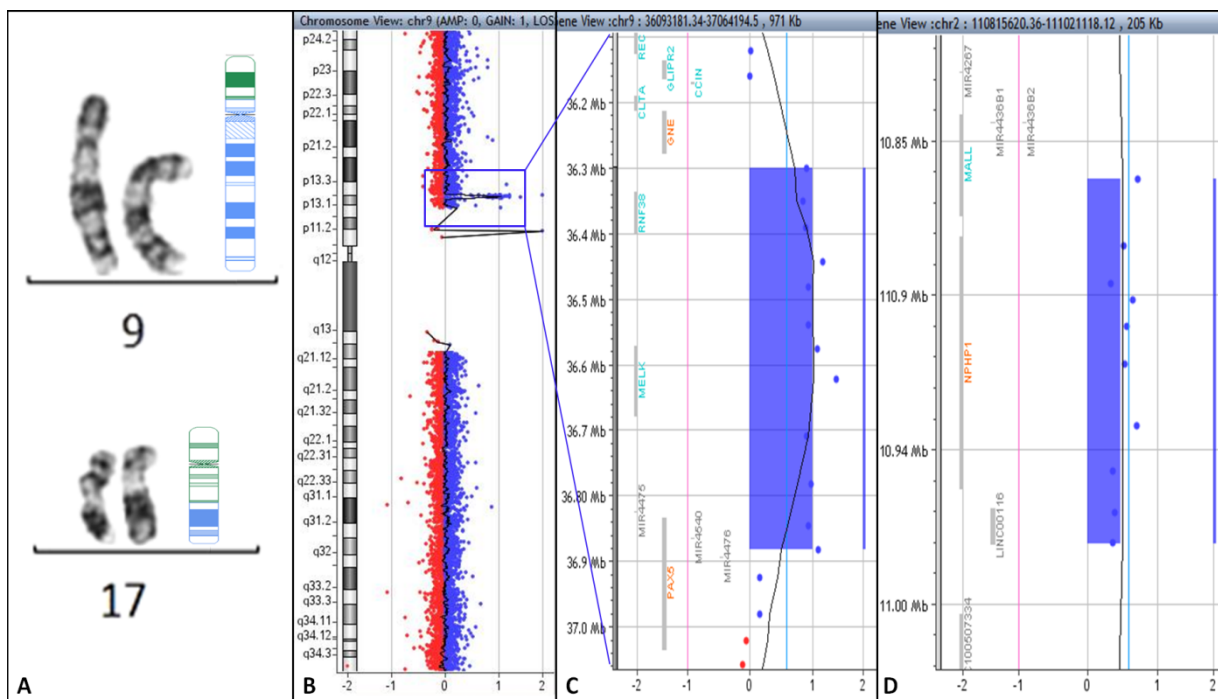
Amplifikace zasahuje čtyři geny: *GNE*, *MELK*, *PAX5* a *RNF38*, (Obr. 25, C). U *GNE* (MIM*603824) a *PAX5* (MIM*167414) je v triplikaci obsažena jen část a nelze vyloučit jejich disrupci zlomem.

Disrupce *GNE* by představovala přenašečství AR onemocnění myopatií Nonaka (MIM#1605820). Produktem *PAX5* (MIM*167414) je transkripční faktor specifický pro časná stadia prekurzorů B-lymfocytů. Exprese *PAX5* byla zjištěna i v embryonální nervové a testikulární tkáni. Podle Shah a kol. [2013] ztráta jedné alely *PAX5* násobně zvyšuje riziko prekurzorové B-buněčné akutní lymfoblastické leukémie (Leukemia, acute lymphoblastic, susceptibility to, 3, MIM#1615545), která má neúplnou penetranci a vzniká somatickou ztrátou heterozygoty. Produktem *MELK* (MIM*607025) je konzervovaná serin / threonin kináza činná v regulaci buněčného cyklu, diferenciaci, apoptóze a genové expresi [Pengfei a kol., 2013]. Hraje roli v embryogenezi, proliferaci kmenových buněk a kancerogenezi. Overexprese *MELK* byla zjištěna v gliomech [Ganguly a kol., 2014], agresivní formě astrocytomu [Marie a kol., 2008], karcinomech prsu [Pickard a kol., 2009] a prostaty [Kuner a kol., 2013], melanomech [Ryu a kol., 2007] a karcinomech žaludku [Calcagno a kol., 2016]. Upregulace *MELK* hraje roli v iniciaci a progresi nádorů a nadpočetné kopie mohou pro nosiče představovat riziko postižení nádorovým onemocněním.

Duplikace 2q13 obsahuje dva geny: *NPH1* (MIM*607100) a *MALL* (MIM*602022). Homozygotní delece regionu je přítomna u 65 – 75 % pacientů s juvenilní nefronoftizou (Juvenile nephronophthisis,1, MIM#1256100). Stejná delece je zodpovědná i za Joubertův syndrom 4 (JBTS4, MIM#1609583), a syndrom Senior-Loken 1 (SLSN1, MIM#1266900). *NPH1* kóduje nefrocystin 1, který je exprimován i v mozku.

Duplikace *NPHP1* byla popsána jako rekurentní polymorfismus [Baris a kol., 2006] u pacientů s PMR, ADHD, poruchami učení, opožděním vývoje řeči a autismem. Yasuda a kol. [2014] popsali dva podobné pacienty i Chen a kol. [2017] zmiňují duplikaci genů *MALL*, *NPHP1*, *RGPD6* a *BUB1* u postižených. Také databáze uvádějí množství podobných duplikací u postižených. Duplikace bývá zděděna od fenotypově normálního či lehce postiženého rodiče, nebo je spojena s rodinnou historií neurovývojových poruch. Proto bývá nejčastěji hodnocena jako nejasná, s neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. Záchyt může být pouze koincidentní s jinou, nezachycenou abnormitou. Kishimoto a kol. [2017] studovali vliv duplikace *NPHP1* na transgenní myši behaviorálními testy a pomocí MRI hledali odchylky v anatomii mozku. Nenašli významný rozdíl v sociálním chování, avšak jedinci s duplikací vykazovali horší výsledky prostorové paměti a učení. V neuroanatomii mozku bylo významné zmenšení oblasti paraflocculu v mozečku.

Duplikace 2q13 stejně jako triplikace 9p13.3p13.2 byla u pacienta T22 zděděna od matky (nižší vzdělání, vyučena tkadlenou). Nelze jednoznačně stanovit, zda má některá z abnormit kauzální vliv, avšak obě se mohou synergicky negativně podílet na abnormálním fenotypu. To může být ještě umocněno problematickým výchovným přístupem matky a citovou subdeprivací.



Obr. 25. Výsledky vyšetření pacienta T22. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 9 a 17. Translokace je znázorněna barevnými idiogramy. **B.** Array CGH, triplikace 9p13.3p13.2 je zvýrazněna modrým obdélníkem. **C.** Detail triplikace s uvedením genů. **D.** Duplikace 2q13 s uvedením genů.

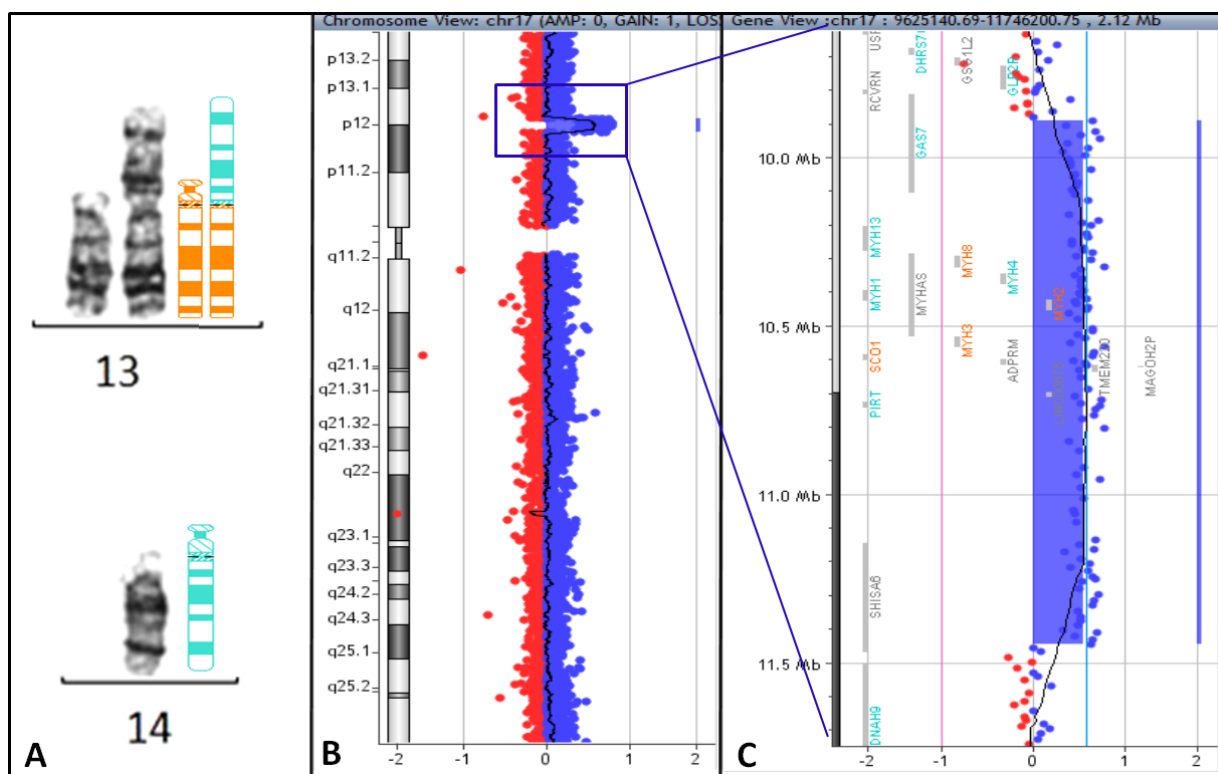
CNV nesouvisající s přestavbou

Dup 17p13.1p12 (R1)

Pacient R1 má maternálně zděděnou translokaci rob(13;14)(q10;q10) (Obr. 26, A). Chlapec byl vyšetřen pro akrální spasticitu dolních končetin a chůzi po špičkách.

Array CGH zjistila 1,5 Mb duplikaci 17p13.1p12 (Obr. 26, B). Ta byla považována za suspektně kauzální vzhledem k rozsahu a obsahu genů. Zasažuje *GAS7* (MIM*603127) a *SHISA6* (MIM*617327) a je v ní obsažen komplex pro typy těžkého řetězce myozinu *MYH1-4*, *MYH8*, *MYH13* (MIM*160730, *160740, *160720, *160742, *160741, *160720) a geny *SCO1* (MIM*603644) a *PIRT* (MIM*612068) (Obr. 26, C). Ztráta funkce kteréhokoli z myozinových genů způsobuje poruchy svalů. V databázích je popsáno několik podobných duplikací u pacientů s poruchami hybnosti, parézami dolních končetin a kontrakturami.

Vyšetření nepostižené matky však ukázalo, že nese stejnou duplikaci. CNV proto byla hodnocena jako VOUS. Otec, který rovněž chodil po špičkách, nebyl vyšetřen.



Obr. 26. Výsledky vyšetření pacienta R1. **A.** Parciální karyotyp zobrazující translokaci rob(13;14), znázorněnou barevnými idiogramy. **B.** Výsledek vyšetření array CGH, duplikace 17p13.1p12 je zvýrazněna modrým obdélníkem. **C.** Detail duplikace s uvedením obsažených genů.

Výsledky vyšetření pacientů bez nálezu kauzální CNV

Disrupce genu zlomem chromozomu

U čtyř pacientů bylo vysloveno podezření na disrupci konkrétního genu či jeho regulační oblasti, popřípadě kritické oblasti pro AD poruchu zlomem přestavby. Dvakrát šlo o jedince bez nálezu z array CGH (T1, T8), u dvou dalších pacientů byly zachyceny CNV bez zjevné spojitosti s jejich fenotypy (I10, I8). S výjimkou případu I8, kde nebyla k dispozici buněčná suspenze, byla disrupce kandidátního genu vyloučena cíleným vyšetřením BA FISH. U pacientů T8 a I10 byl kandidátní gen též sekvenován.

Kritický region pro SHFM1 (I8)

Pacient I8 je chlapec s mnohočetnými vrozenými vadami horních i dolních končetin (ektrodaktylie) a hypoplazií horní čelisti s prognatií dolní čelisti. Vývoj chlapce byl normální s výjimkou opoždění vývoje řeči. Pacient má *de novo* paracentrickou inverzi i(7)(q21.2q36).

Array CGH zjistila 1,39 Mb *de novo* delecii 7q31.31q31.32. Je v invertovaném úseku, avšak mimo zlomová místa. To může naznačovat vyšší komplexitu přestavby, nelze ovšem vyloučit ani delecii na druhém chromozomu 7. Buněčná suspenze však není dostupná.

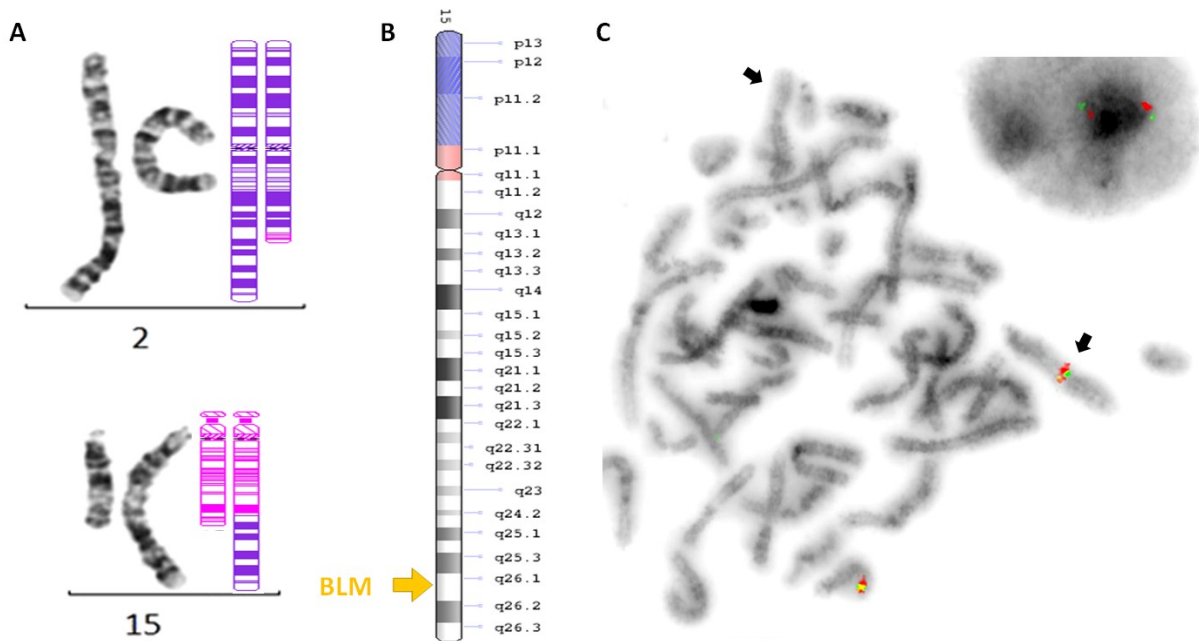
V databázích je uvedeno několik delecí oblasti, spojených s opožděním vývoje řeči, a jedna intragenová delece (DECIPHER, pacient 284983 s opožděním vývoje řeči) v genu *KCND2* (MIM*605410), zděděná od normálního otce. *KCND2* kóduje protein iontového kanálu v membráně neuronů a je u pacienta I8 deletován. Nález nelze s jistotou spojit s fenotypem probanda a varianta byla hodnocena jako VOUS. Proximální zlom inverze mapuje do kritické oblasti pro syndrom s ektrodaktylií (split-hand/foot malformation 1; SHFM1, MIM#1183600) v oblasti 7q21.3. Přestavby *DSS1* (MIM*601285), *DLX5* (MIM*600028), *DLX6* (MIM*600030) a jejich regulačních oblastí podmiňují ektrodaktylii typu I [Crackower a kol., 1996; Rai a kol., 2019]. Exonové delece *DYNCH3* (MIM*603772) byly nalezeny u pacientů s malformacemi končetin a nesyndromickou ektrodaktylií [Tayebi a kol., 2014]. Jeden pacient s ektrodaktylií všech končetin měl inverzi se zlomem v *DYNCH3* [Van Silfhout a kol., 2009]. Stejně jako I8, neměl jiné postižení, ztrátu sluchu, ani PMR, typické pro syndromickou formu ektrodaktylie u jedinců s defektem *DLX5/6* a *DSS1* [Rasmussen a kol., 2016]. Vzhledem k izolované ektrodaktylii v rodině I8 a *de novo* aberaci oblasti kritické pro toto postižení lze uvažovat možnou disrupci některého z genů (nejpravděpodobněji *DYNCH3*), případně vliv pozičního efektu, který byl u SHFM1 popsán [Kleinjan a Lettice, 2008]. Nedostupnost materiálu však znemožňuje další analýzu.

Gen *BLM* (*RECQL3*) (T1)

Pacient T1 je nosičem maternálně zděděné reciproké translokace t(2;15)(q31;q26.1), viz obr. 27, A. Byl vyšetřován pro časný výskyt osteosarkomu femuru v devíti letech. V rodinné anamnéze byl ze strany matky významně zvýšený výskyt nádorů. U probanda bylo provedeno vyšetření NGS panelem CZECANCA ONKO1, ovšem bez nálezu.

V oblasti zlomu 15q26.1 je lokalizován gen *BLM* (*RECQL3*, MIM*604610) (Obr. 27, B). Homozygotní inaktivace genu mutacemi či delecemi je spojena s AR Bloomovým syndromem (MIM#1210900), charakterizovaným mj. predispozicí k nádorům. Patogenní mutace *BLM* může i u heterozygotů zvyšovat riziko malignit, zejména karcinomu prsu, endometria [Thompson a kol., 2012; Schayek a kol., 2017] a kolorektálního karcinomu [de Voer a kol., 2015; Schayek a kol., 2017].

U chlapce bylo provedeno vyšetření metodou BA FISH za účelem ověření možné disrupce genu *BLM* či jeho regulačních oblastí zlomem přestavby. Bylo prokázáno, že gen *BLM* a jeho přilehlé oblasti jsou intaktní a že zlom přestavby se nachází distálněji oproti původnímu předpokladu (Obr. 27, C).



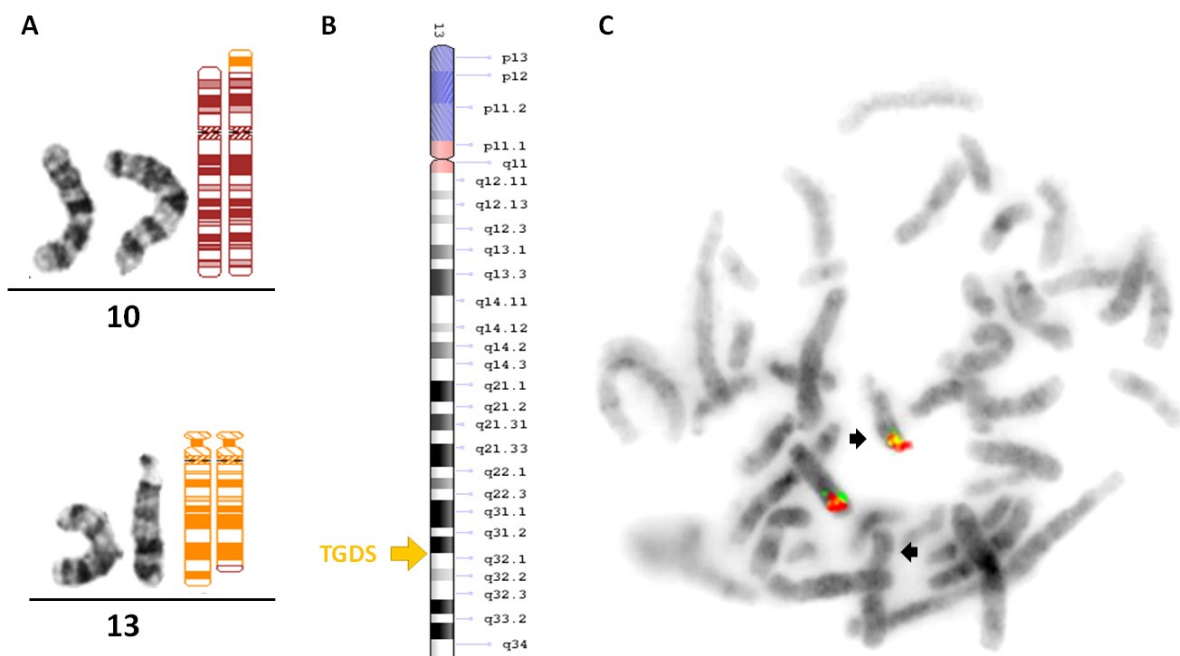
Obr. 27. Výsledky vyšetření genu *BLM* metodou BA FISH u pacienta T1. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 2 a 15. Translokace je znázorněna barevnými idiogramy. **B.** Lokalizace genu *BLM* na chromozomu 15. **C.** BA FISH. V případě disrupce zlomem translokace by byla zelená sonda lokalizovaná na druhém derivátu translokace. Derivované chromozomy jsou označeny šipkami.

Gen TGDS (T8)

Pacient T8 má *de novo* translokaci t(10;13)(p15;q32.1) (Obr. 28, A) a růstovou retardací, pylorostenózu, příčné rýhy na dlaních, makrocefalii, atypický tvar lbi, stigmatizaci, rozštěp patra a zúžené dýchací cesty a choany, ale normální psychomotorický vývoj.

V oblasti zlomu 13q32.1 byl vytipován gen *TGDS* (MIM*616146), kódující TDP-glukózo 4,6-dehydratázu, enzym zapojený do mnoha metabolických drah (Obr. 28, B). Homozygotní mutace způsobují Catel – Manzke syndrom (MIM#1616145) [Ehmke a kol., 2014] s růstovou retardací, Pierre Robinovou sekvencí, zvýšenou kloubní laxitou a stigmatizací. U pacientů byly též popsány VCC či jiné VV, například pylorostenóza. Jejich inteligence je normální. Významným znakem je klinodaktylie ukazováku, často doprovázená nadpočetným osifikačním centrem mezi metakarpem a prvním proximálním falangem nebo nadpočetnou kostí (hyperfalangií). Na dlaních bývají říčné rýhy. RTG vyšetření rukou pacienta T8 dysostózu neprokázalo. Dva případy tohoto syndromu bez dysostózy však byly popsány [Boschann a kol., 2019; Miller a kol., 2019].

Na základě podezření na disrupci zlomem přestavby bylo provedeno NGS vyšetření genu *TGDS*. Nebyla však zjištěna žádná patogenní mutace, a ani BA FISH neprokázala disrupci genu či přilehlých oblastí (Obr. 28, C).



Obr. 28. Výsledky vyšetření genu *TGDS* metodou BA FISH u pacienta T8. **A.** Parciální karyotyp derivovaných chromozomů 10 a 13. Translokace je znázorněna barevnými idiogramy. **B.** Lokalizace genu *TGDS* na chromozomu 13. **C.** BA FISH. V případě disrupce zlomem translokace by byla červená sonda lokalizovaná na druhém derivátu translokace. Derivované chromozomy jsou označeny šipkami.

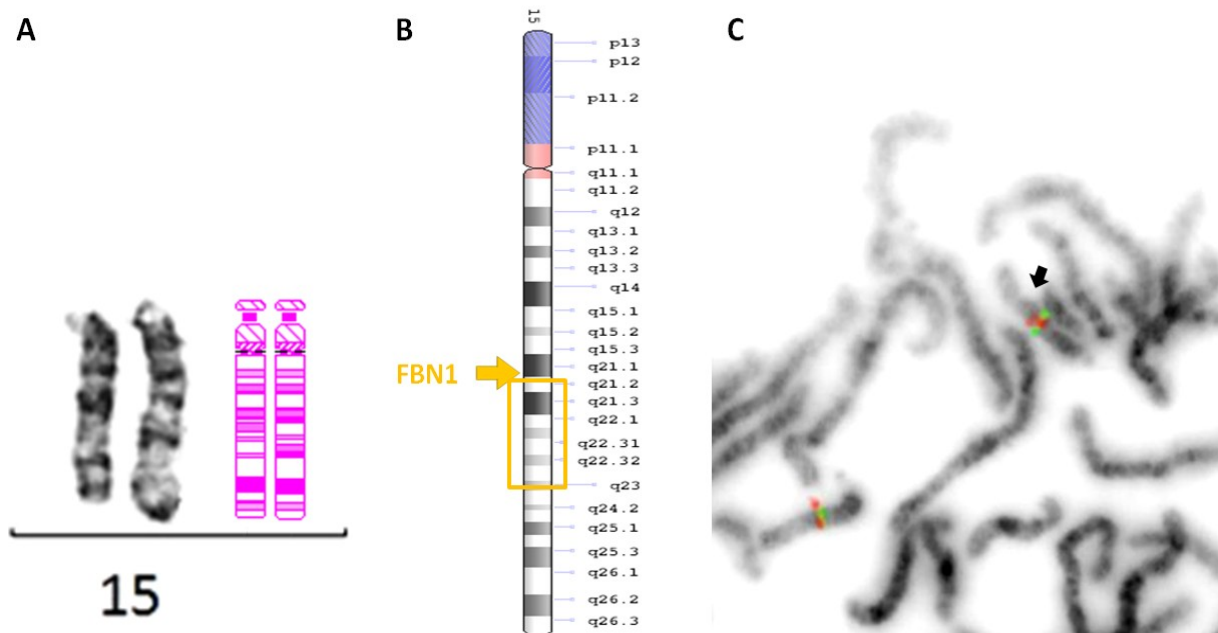
Gen *FBNI* (I10)

Pacientka I10 byla vyšetřována pro susp. Marfanův syndrom (MIM#1154700), zvažovaný pro vysoký vzrůst (nad 97. P.) a rysy naznačující možnou poruchu pojivové tkáně. U dívky byla zjištěna zjevně balancovaná paracentrická inverze dlouhých ramen chromozomu 15 definovaná pruhy q21.2 – q23 (Obr. 29, A).

Array CGH byla zachycena maternálně zděděná cca 250 kb duplikace Xp22.33.

Duplikace obsahuje šest genů včetně *SHOX* (MIM*312865). Duplikace *SHOX* jsou spojovány s nadměrným vzrůstem [Seo a kol., 2015; Ramirez a kol., 2019], ovšem pouze když je v duplikaci obsažena kritická oblast genu i s regulačními sekvencemi (hg19; chrX:398,000 – 980,000) [Hirschfeldova a kol., 2017]. Varianta pacientky I10 je menší a je tedy pravděpodobné, že je benigní a na vysokém věku probandky se nepodílí.

V blízkosti distálního zlomového místa inverze v 15q21.1 mapuje gen *FBNI* (MIM*134797), jehož heterozygotní ztráta je spojena s AD Marfanovým syndromem (Obr. 29, B). Sekvenováním *FBNI* nebyla nalezena žádná patogenní varianta a vyšetřením BA FISH nebyla prokázána jeho disrupce. Z vyšetření vyplývá, že gen *FBNI* není součástí invertovaného úseku, který je lokalizován distálněji (Obr. 29, C).



Obr. 29. Výsledky vyšetření genu *FBNI* metodou BA FISH u pacientky I10. **A.** Parciální karyotyp derivovaného chromozomu 15. Inverze je znázorněna barevným idiogramem vpravo. **B.** Znázornění polohy genu *FBNI* (šipka) vůči inverzi (obdélník) na chromozomu 15. **C.** BA FISH. V případě disrupce genu zlomem inverze či jeho přesunutí by jedna, případně obě sondy změnily polohu v rámci derivovaného chromozomu 15 (označen šipkou).

Uniparentální heterodizomie chromozomu 15

U pacientky T25 s fenotypem odpovídajícím Prader – Willi syndromu byla prokázána zjevně balancovaná translokace $t(8;15)(q24.1;q21.2)$ zděděná od matky s normálním fenotypem. Vzhledem k typickému fenotypu probandky a přestavbě postihující chromozom nesoucí kritický region pro syndromy Prader – Willi a Angelman (PWACR, Prader – Willi / Angelman critical region) byla provedena MS MLPA pro zjištění metylačního vzorce obou alel této oblasti. Vyšetření prokázalo, že u probandky chybí nemetylovaná paternální alela PWACR oblasti při současném zachování množství genetického materiálu. To poukazuje na maternální uniparentální dizomii chromozomu 15 u probandky potencovanou přítomností reciproké translokace u její matky [Calounová a kol., 2006].

Heidemann a kol. [2010] popsali obdobný případ maternálně zděděné balancované translokace $t(2;15)(p11;q11.2)$ u plodu, u něhož byla zjištěna UPD15mat. Příčinou UPD byl v obou případech abnormální rozchod chromozomů do gamet v poměru 3:1 (s párem derivovaných chromozomů segreguje i normální chromozom 15) v oogenezi matky a následná postzygotická korekce trizomické konstituce časného embrya vyloučením normálního paternálního chromozomu (trisomy rescue).

Molekulárně genetické nálezy nezávislé na primární aberaci

U čtyř jedinců byly negativní výsledky array CGH motivací k dalšímu vyšetřování, které následně identifikovalo patogenní varianty v genu asociovaném s popsanou AD poruchou, jenž se nacházel mimo zlomová místa balancované aberace. Fenotyp pacientů plně odpovídal dané AD chorobě a lze proto předpokládat, že chromozomová přestavba je u těchto nosičů skutečně balancovaná a na jejich abnormálním fenotypu se nikterak nepodílí.

Gen SCN1A

V genomové DNA pacientky T31 s maternálně zděděnou translokací $t(1;11)(p36.1;q13)$, trpící od čtvrtého měsíce věku epilepsií, byla prokázána *de novo* substituce c.1047T>G (p.Tyr349*) v genu *SCN1A* (MIM*182389), ležícím v 2q24.3. Porucha funkce *SCN1A* je spojena s AD epileptickou encefalopatií známou jako syndrom Dravetové (MIM#1607208), projevující se závažnou myoklonickou epilepsií s časným nástupem v prvním roce života. Nalezená mutace u pacientky T31 vede ke vzniku předčasného terminačního kodonu a lze ji s velkou pravděpodobností považovat za kauzální.

Gen COL4A5

U pacienta T13, nosiče translokace $t(16;18)(p11.21;q13.3)$ s poruchou sluchu a ledvin, byla nalezena patogenní substituce v genu *COL4A5* (MIM*303630), ležícím v Xq22.3. Mutace *COL4A5* způsobují X-vázanou formu Alportova syndromu (MIM#1301050), mající gonozomálně dominantní (XLD) dědičnost a projevující se postižením glomerulů ledvin, senzoneurální hluchotou a typickými patologickými změnami na očích. Nalezenou mutaci u pacienta T13 lze považovat za kauzální a s velkou pravděpodobností je zděděná od mírněji postižené matky s pozitivní rodinnou anamnézou pro výskyt hluchoty a selhání ledvin.

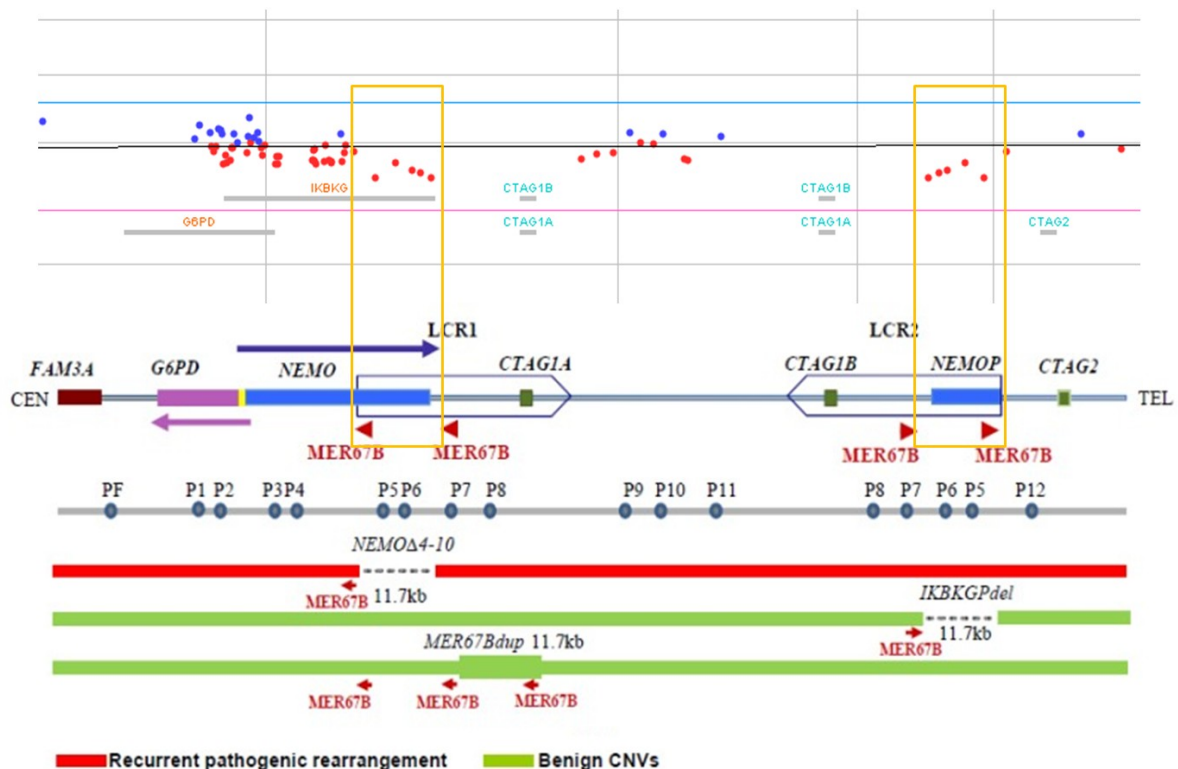
Gen SHOX

U pacientky T4, nosičky *de novo* reciproké translokace $t(X;13)(q21.2;p11.2)$, která byla vyšetřována z důvodu malého vzrůstu, byla nalezena dosud nepopsaná substituce c.120G>C p.(Glu40Asp) ve vysoce konzervované doméně genu *SHOX* (MIM*312865) v Xp22.33. Mutace a delece tohoto genu jsou spojeny s familiárním malým vzrůstem (short stature, idiopathic familial, MIM#1300582) [Ballabio a kol., 1989; Fukami a kol., 2016]. Vyšetření rodiny ukázalo, že i matka a sestra probandky jsou nosičkami stejné mutace. Zatímco u matky bylo antropologické vyšetření v normě, sestra měla progredující růstovou retardaci méně závažného charakteru než probandka.

Gen *IKBK*G

U pacientky T15 s podezřením na incontinentia pigmenti byla detekována *de novo* delece exonů 4-10 genu *IKBK*G (MIM*300248) v Xq28. Dívka má balancovanou translokaci t(7;22)(q11.21;q11.2) zděděnou od matky. *IKBG* kóduje kinázu činnou v mnoha drahách a jeho mutace (v 80 – 90 % delece exonů 4-10) způsobují XLD incontinentia pigmenti (MIM#1308300).

Deleci nelze jednoznačně array CGH identifikovat. Oblast exonů 4-10 *IKBK*G totiž není unikátní a při rutinním vyšetření jsou příslušné sondy vyloučeny z analýzy. Důvodem je invertovaná segmentální duplikace 22 kb distálně od genu *IKBK*G obsahující pseudogen *IKBKGP1* tvořený exony 3-10 a gen *CTAG1B*, který je invertovanou kopií *CTAG1A*, ležícího distálně od *IKBK*G [Aradhya a kol., 2001]. Obě 35,5 kb repetice jsou z více než 99 % homologické a metoda array CGH je nerozliší. Rekurentní delece *IKBK*G způsobující incontinentia pigmenti jsou potencovány rekombinací mezi 870 bp dlouhými repeticemi *MER67B*, které lemují oblast exonů 4-10 v genu i pseudogenu. Metodou array CGH nelze stanovit, zda je deletován gen či pseudogen (Obr. 30).



Obr. 30. Schéma rozmístění analytických sond v exonu 4 – 10 genu *IKBK*G, pokud nejsou vyloučeny z analýzy, viz žluté obdélníky. Schematické zobrazení struktury invertované segmentální duplikace části genu *IKBK*G a umístění repetice potencující rekurentní CNV v této oblasti. Převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1472/figure/i-p.F6/?report=objectonly>, upraveno.

Závěr

Zkoumali jsme, do jaké míry přispívají karyotypováním zjištěné zdánlivě balancované chromozomové aberace k abnormálnímu fenotypu jejich nosičů, a do jaké míry jsou u nich za postižení odpovědné jiné genetické defekty, které s touto primární aberací nesouvisí. V hlavní části studie byly u všech 54 zařazených pacientů (z nichž 32 mělo reciproké translokace, šest robertsonské translokace, 12 inverze a čtyři komplexní přestavby) hledány metodou array CGH CNV na zlomech aberací i mimo ně. U pacientů bez nálezu pozoruhodné CNV pak byly ve snaze objasnit jejich fenotyp použity další molekulárně cytogenetické metody, zejména BA FISH, a u některých pak i metody doplňující, včetně molekulárně genetických.

Naše studie prokázala širokou a pestrou škálu genetických mechanismů, které mohou podmiňovat postižení u nosičů zjevně balancovaných chromozomových aberací. U celkem 17 pacientů bylo nalezeno celkem 34 CNV, které zasluhovaly další pozornost. U šesti nepříbuzných pacientů byly nalezeny kryptické CNV na zlomech aberace; tyto CNV však byly klasifikovány jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní pouze u dvou jedinců (každý nesl po dvou takových CNV). Oproti tomu bylo v souboru dalších sedm jedinců, u nichž byly nalezeny patogenní nebo pravděpodobně patogenní CNV, které ovšem se zlomy aberace nijak nesouvisely a nacházely se jinde v genomu (z toho tři pacienti nesli po dvou CNV).

Podrobnější analýza provedená u několika případů prokázala mnohem vyšší komplexitu aberace, než jak byla popsána na základě vyšetření karyotypu, a je možné, že taková vyšší komplexita, včetně například CNV nedetekovatelných pomocí array CGH nebo dalších zlomů přerušujících geny, může být zodpovědná za postižení dalších pacientů. Vyšší komplexita nesla ve všech případech znaky chromotripse a tento fenomén je pravděpodobně častější, než se dříve předpokládalo.

Z array CGH negativních pacientů byli vybráni tři, u nichž se v blízkosti předpokládaných zlomů primární aberace nacházel gen asociovaný s fenotypem podobným postižení pacienta. Přímé přerušení tohoto genu zlomem (při absenci CNV na zlomu) u nich bylo testováno metodou BA FISH. Přerušení ani jednoho z kandidátních genů se nepodařilo touto metodou prokázat, nicméně nelze zcela vyloučit možnost pozičního efektu blízkého zlomu na funkci zmíněných genů.

Jedna pacientka se znaky syndromu Prader-Willi nesla translokaci s účastí chromozomu 15 zděděnou od nepostižené matky. Pacientka byla vyšetřena metodou

MS MLPA, která potvrdila přispění translokace ke vzniku tohoto syndromu mechanismem maternální uniparentální heterodisomie. Ta byla u pacientky výsledkem chybné segregace translokovaných chromozomů do vajíčka, následované procesem trisomy rescue, který odstranil paternální chromozom 15.

Doplňující molekulárně genetické analýzy cílené na geny vytipované podle specifického fenotypu pacienta pomohly objasnit genetickou příčinu postižení u dalších čtyř pacientů, u kterých byly nalezeny substituční nukleotidové varianty v genech *SCN1A*, *COL4A5* a *SHOX*, a na array CGH nedetekovatelná intragenová delece v genu *IKBK1*. Jednalo se tedy opět o vysvětlení fenotypu pacienta zcela nezávislé na jeho chromozomové aberaci.

Naše pozorování potvrzují domněnku, že patogenní a pravděpodobně patogenní CNV se v oblastech zlomových míst nacházejí častěji u *de novo* aberací ve srovnání s aberacemi zděděnými. Naše studie také ve shodě s předchozími údaji ukazuje, že podstatná část zdánlivě balancovaných aberací může být ve skutečnosti nebalancovaná, a proto by analýza array CGH měla být nedílnou součástí vyšetření *de novo* i familiárních zjevně balancovaných přestaveb. Naše studie rovněž poukazuje na nezbytnost kombinace cytogenetických, molekulárně cytogenetických a molekulárně genetických metod pro lepší poznání povahy a případné patogeneze těchto aberací.

Je pravděpodobné, že nastupující širší využití celogenomového sekvenování odhalí podstatně vyšší komplexitu přestaveb identifikovaných ve světelném mikroskopu a také mnohé strukturní varianty, které nejsou karyotypováním a ani array CGH detekovatelné vůbec. Toto zvýšení rozlišovací schopnosti a citlivosti bude ovšem vykoupeno, aspoň v přechodném období, obtížemi s jednoznačnou interpretací obrovského množství nových nálezů.

Použitá literatura

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061–1073.
- Abyzov A, Li S, Kim DR, Mohiyuddin M, Stütz AM, Parrish NF, Mu XJ, Clark W, Chen K, Hurles M, et al. 2015. Analysis of deletion breakpoints from 1,092 humans reveals details of mutation mechanisms. *Nat Commun.* 6:7256.
- Alkan C, Coe BP, Eichler EE. 2011. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet.* 12(5):363-76.
- Alsolami R, Knight SJ, Schuh A. 2013. Clinical application of targeted and genome-wide technologies: can we predict treatment responses in chronic lymphocytic leukemia? *Per Med.* 10(4):361–376.
- Altiner Ş, Kutlay NY, İlhan O. 2016. Constitutional Trisomy 8 Mosaicism with Persistent Macrocytosis. *Cytogenet Genome Res.* 150(1):35-39.
- Andrée B, Hillemann T, Kessler-Icekson G, Schmitt-John T, Jockusch H, Arnold HH, Brand T. 2000. Isolation and characterization of the novel Popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev Biol.* 223(2):371–382.
- Aradhya S, Bardaro T, Galgoczy P, Yamagata T, Esposito T, Patlan H, Ciccodicola A, Munnich A, Kenwrick S, Platzer M, et al. 2001. Multiple pathogenic and benign genomic rearrangements occur at a 35 kb duplication involving the NEMO and LAGE2 genes. *Hum Mol Genet.* 10(22):2557–2567.
- Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA. 2001. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet.* 10(14):1475-83.
- Aristidou C, Koufaris C, Theodosiou A, Bak M, Mehrjouy MM, Behjati F, Tanteles G, Christophidou-Anastasiadou V, Tommerup N, Sismani C. 2017. Accurate Breakpoint Mapping in Apparently Balanced Translocation Families with Discordant Phenotypes Using Whole Genome Mate-Pair Sequencing. *PLoS One.* 12(1):e0169935.
- Aristidou C, Theodosiou A, Bak M, Mehrjouy MM, Constantinou E, Alexandrou A, Papaevripidou I, Christophidou-Anastasiadou V, Skordis N, Kitsiou-Tzeli S, et al. 2018. Position effect, cryptic complexity, and direct gene disruption as disease mechanisms in de novo apparently balanced translocation cases. *PLoS One* 13(10): e0205298.
- Ashraf T, Collinson MN, Fairhurst J, Wang R, Wilson L C, Foulds N. 2015. Two further patients with the 1q24 deletion syndrome expand the phenotype: A possible role for the miR199-214 cluster in the skeletal features of the condition. *Am J Med Genet A.* 167(12):3153-3160.

- Bache I, Hjorth M, Bugge M, Holstebro S, Hilden J, Schmidt L, Brondum-Nielsen K, Bruun-Petersen G, Jensen PK, Lundsteen C, et al. 2006. Systematic re-examination of carriers of balanced reciprocal translocations: A strategy to search for candidate regions for common and complex diseases. *Eur J Hum Genet.* 14(4):410–417.
- Backx L, Seuntjens E, Devriendt K, Vermeesch J, Van Esch H. 2011. A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. *Cytogenet Genome Res.* 132(3):135-43.
- Ballabio A, Bardoni B, Carozzo R, Andria G, Bick D, Campbell L, Hamel B, Ferguson-Smith MA, Gimelli G, Fraccaro M. 1989. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec.86(24):10001-5.
- Bandyopadhyay R, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL, Shaffer LG. 2002. Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet.* 71(6):1456–1462.
- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. 2008. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet.* 82(4):927-36.
- Baptista J, Prigmore E, Gribble SM, Jacobs PA, Carter NP, Crolla JA. 2005. Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals. *Eur J Hum Genet.* 13(11):1205-12.
- Bardai G, Lemyre E, Moffatt P, Palomo T, Glorieux FH, Tung J, Ward L, Rauch F. 2016. Osteogenesis Imperfecta Type I Caused by COL1A1 Deletions. *Calcif Tissue Int.* 98(1):76-84.
- Baris H, Bejjani BA, Tan W-H, Coulter DL, Martin JA, Storm AL, Burton BK, Saitta SC, Gajecka M, Ballif BC, et al. 2006. Identification of a novel polymorphism -- The duplication of the NPHP1(nephronophthisis 1) gene. *Am J Med Genet A.* 140A(17):1876-9.
- Bartnik M, Nowakowska B, Derwińska K, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Kędzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Bezniakow N, et al. 2014. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *J Appl Genet.* 55(1):125-44.
- Bellucco FT, Rodrigues de Oliveira-Júnior H, Santos Guilherme R, Bragagnolo S, Alvarez Perez AB, Ayres Meloni V, Melaragno MI. 2019. Deletion of Chromosome 13 due to Different Rearrangements and Impact on Phenotype. *Mol Syndromol.* 10(3):139-146.

- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, et al. 2009. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat Genet.* 41(3):359–364.
- Bisgaard AM, Kirchhoff M, Tümer Z, Jepsen B, Brøndum-Nielsen K, Cohen M, Hamborg-Petersen B, Bryndorf T, Tommerup N, Skovby F. 2006. Additional chromosomal abnormalities in patients with a previously detected abnormal karyotype, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* 140(20):2180-7.
- Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. 2001. Schizophrenia and affective disorders-cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet.* 69(2):428-33.
- Bonczek O, Balcar VJ, Šerý O. 2017. PAX9 gene mutations and tooth agenesis: A review. *Clin Genet.* 92(5):467-476.
- Boschann F, Stuurman KE, de Bruin C, van Slegtenhorst M, van Duyvenvoorde HA, Kant SG, Ehmke N. 2019. TGDS pathogenic variants cause Catel-Manzke syndrome without hyperphalangy. *Am J Med Genet A.* 182(3):431-436.
- Brothman AR, Schneider NR, Saikevych I, Cooley LD, Butler MG, Patil S, Mascarello JT, Rao KW, Dewald GW, Park JP, et al. 2006. Cytogenetic heteromorphisms: survey results and reporting practices of giemsa-band regions that we have pondered for years. *Arch Pathol Lab Med.* 130(7):947-9.
- Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D, Delatycki M, Gardner RJ, Hunter M, James PA, Kannu P, et al. 2009. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet.* 46(2):123-31.
- Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, et al. 2000. Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype – phenotype delineation in man. *J Med Genet* 37(11):858-65.
- Bühler EM. 1983. Unmasking of heterozygosity by inherited balanced translocations. Implications for prenatal diagnosis and gene mapping. *Ann Genet.* 26(3):133-7.
- Buyse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. 2009. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet* 52(6):398-403.
- Calcagno DQ, Takeno SS, Gigeck CO, Leal MF, Wisnieski F, Chen ES, Araújo TMT, Lima EM, Melaragno MI, Demachki S, et al. 2016. Identification of *IL11RA* and *MELK* amplification in gastric cancer by comprehensive genomic profiling of gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol.* 22(43):9506-9514.

- Calounova G, Novotna D, Simandlova M, Havlovicova M, Zumrová A, Kocarek E, Sedlacek Z. 2006. Prader-Willi syndrome due to uniparental disomy in a patient with a balanced chromosomal translocation. *Neuro Endocrinol Lett.* 27(5):579-85.
- Carvalho CM, Ramocki MB, Pehlivan D, Franco LM, Gonzaga-Jauregui C, Fang P, McCall A, Pivnick EK, Hines-Dowell S, Seaver LH, et al. 2011. Inverted genomic segments and complex triplication rearrangements are mediated by inverted repeats in the human genome. *Nat Genet.* 43(11):1074–81.
- Chatron N, Haddad V, Andrieux J, Desir J, Boute O, Dieux, Baumann C, Drunat S, Gérard M, Bonnet C, et al. 2015. Refinement of genotype-phenotype correlation in 18 patients carrying a 1q24q25 deletion. *Am J Med Genet A*, 167A(5):1008-1017.
- Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arkesteijn G, et al. 2008. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. *Genome Res.* 18(7):1143-9.
- Chen CP, Lin SP, Lee CL, Chern SR, Wu PS, Chen YN, Chen SW, Wang W. 2017. Recurrent 2q13 microduplication encompassing MALL, NPHP1, RGP6, and BUB1 associated with autism spectrum disorder, intellectual disability, and liver disorder. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 56(1):98-101.
- Chen W, Ullmann R, Langnick C, Menzel C, Wotschovsky Z, Hu H, Döring A, Hu Y, Kang H, Tzschach A, et al. 2010. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet.* 18(5):539-43.
- Chiang C, Jacobsen JC, Ernst C, Hanscom C, Heilbut A, Blumenthal I, Mills RE, Kirby A, Lindgren AM, Rudiger SR, et al. 2012. Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet.* 44(4):390-7, S1.
- Ciccione R, Giorda R, Gregato G, Guerrini R, Giglio S, Carrozzo R, Bonaglia MC, Priolo E, Laganà C, Tenconi R, et al. 2005. Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists? *Hum Genet.* Oct. 117(6):571-82.
- Collins RL, Brand H, Redin CE, Hanscom C, Antolik C, Stone MR, Glessner JT, Mason T, Pregno G, Dorrani N, et al. 2017. Defining the diverse spectrum of inversions, complex structural variation, and chromothripsis in the morbid human genome. *Genome Biol.* 18(1):36.
- Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. 2013. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet.* 132(10):1077-130.

- Conroy JM, Grebe TA, Becker LA, Tsuchiya K, Nicholls RD, Buiting K, Horsthemke B, Cassidy SB, Schwartz S. 1997. Balanced translocation 46,XY,t(2;15)(q37.2;q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet.* 61(2):388-94.
- Córdova-Fletes C, Domínguez MG, Delint-Ramirez I, Martínez-Rodríguez HG, Rivas-Estilla AM, Barros-Núñez P, Ortiz-López R, Neira VA. 2015. A de novo t(10;19)(q22.3;q13.33) leads to ZMIZ1/PRR12 reciprocal fusion transcripts in a girl with intellectual disability and neuropsychiatric alterations. *Neurogenetics.* 16(4):287-98.
- Cote GB, Papadakou-Lagoyanni S, Metaxotou C. 1981. A de novo interstitial deletion of band q21 on chromosome 6. *Ann Genet.* 24(3):170-1.
- Crackower MA, Scherer SW, Rommens JM, Hui CC, Poorkaj P, Soder S, Cobben JM, Hudgins L, Evans JP, Tsui LC. 1996. Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Hum Mol Genet.* 5(5):571-9.
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, et al. 2007. Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 44(12):750-62.
- de Laat W, Duboule D. 2013. Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. *Nature* 502(7472):499–506.
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, et al. 2012. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 367(20):1921-9.
- de Voer RM, Hahn MM, Mensenkamp AR, Hoischen A, Gilissen C, Henkes A, Spruijt L, van Zelst-Stams WA, Kets CM, Verwiel ET, et al. 2015. Deleterious Germline BLM Mutations and the Risk for Early-onset Colorectal Cancer. *Sci Rep.* 5:14060.
- Dixon JR, Gorkin DU, Ren B. 2016. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. *Mol Cell.* 62(5):668-80.
- Dixon J, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu J, Ren B. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature.* 485(7398):376-80.
- Dong Z, Wang H, Chen H, Jiang H, Yuan J, Yang Z, Wang WJ, Xu F, Guo X, Cao Y, Zhu et al. 2018. Identification of balanced chromosomal rearrangements previously unknown among participants in the 1000 Genomes Project: implications for interpretation of structural variation in genomes and the future of clinical cytogenetics. *Genet Med.* 20(7):697-707.

- Dupont JM, Cuisset L, Cartigny M, Le Tessier D, Vasseur C, Rabineau D, Jeanpierre M. 2002. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. *Am J Med Genet.* 111(4):405-8.
- Ehmke N, Caliebe A, Koenig R, Kant SG, Stark Z, Cormier-Daire V, Wieczorek D, Gillissen-Kaesbach G, Hoff K, Kawalia A, et al. 2014. Homozygous and compound-heterozygous mutations in TGDS cause Catel-Manzke syndrome. *Am J Hum Genet.* 95(6):763-70.
- Eisfeldt J, Pettersson M, Vezzi ., Wincent J, Kaller M, Gruselius J, Nilsson D, Syk Lundberg E, Carvalho CMB, Lindstrand A. 2019. Comprehensive structural variation genome map of individuals carrying complex chromosomal rearrangements. *PLoS Genet.* 15(2):e1007858.
- Ekblom R, Wolf JBW. 2014. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol Appl.* 7(9):1026–1042.
- Erdogan F, Chen W, Kirchhoff M, Kalscheuer VM, Hultschig C, Müller I, Schulz R, Menzel C, Bryndorf T, Ropers HH, Ullmann R. 2006. Impact of low copy repeats on the generation of balanced and unbalanced chromosomal aberrations in mental retardation. *Cytogenet Genome Res.* 115(3-4):247-53.
- Falzarano SM, Navas M, Simmerman K, Klein EA, Rubin MA, Zhou M, Magi-Galluzzi C. 2010. ERG rearrangement is present in a subset of transition zone prostatic tumors. *Mod Pathol.* 23(11):1499-506.
- Fantes JA, Boland E, Ramsay J, Donnai D, Splitt M, Goodship JA, Stewart H, Whiteford M, Gautier P, Harewood L, et al. 2008. FISH mapping of de novo apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality. *Am J Hum Genet.* 82(4):916-26.
- Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M. 1995. Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet.* 4(3):415-22.
- Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, Yntema H, Dijkhuizen T, Lugtenberg D, Verheij J, Green A, Hordijk R, Reardon W, et al. 2011. Balanced into array: genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 19(11):1152-60.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. 2006. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 7(2):85-97.
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. 2009. DECIPHER: database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using Ensembl resources. *Am J Hum Genet.* 84(4):524–533.

- Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. 2009. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. *Eu J Hum Genet.* 17(7):897-903.
- Fukami M, Seki A, Ogata T. 2016. SHOX Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature. *Mol Syndromol.* 7(1):3-11.
- Gajecka M, Glotzbach CD, Jarmuz M, Ballif BC, Shaffer LG. 2006. Identification of cryptic imbalance in phenotypically normal and abnormal translocation carriers. *Eur J Hum Genet.* 14(12):1255-62.
- Ganguly R, Hong CS, Smith LG, Kornblum HI, Nakano I. 2014. Maternal embryonic leucine zipper kinase: key kinase for stem cell phenotype in glioma and other cancers. *Mol Cancer Ther.* 13(6):1393-8.
- Genesio R, Fontana P, Mormile A, Casertano A, Falco M, Conti A, Franzese A, Mozzillo E, Nitsch L, Melis D. 2015. Constitutional chromothripsis involving the critical region of 9q21.13 microdeletion syndrome. *Mol Cytogenet.* 8:96.
- Gijsbers AC, Bosch CA, Dauwerse JG, Giromus O, Hansson K, Hilhorst-Hofstee Y, Kriek M, van Haeringen A, Bijlsma EK, et al. 2010. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. *Eur J Med Genet.* 53(5):227-33.
- Gijsbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E, Ruivenkamp CAL. 2009. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: Test arrays first. *Eur J Hum Genet.* 17(11):1394-402.
- Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. 2011. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res.* 135(3-4):222-7.
- Gilling M, Dullinger JS, Gesk S, Metzke-Heidemann S, Siebert R, Meyer T, Brondum-Nielsen K, Tommerup N, Ropers HH, et al. 2006. Breakpoint cloning and haplotype analysis indicate a single origin of the common inv(10)(p11.2q21.2) mutation among northern Europeans. *Am J Hum Genet.* 78(5):878-883.
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Gueneri S, Selicorni A, Stumm M, et al. 2002. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *Am J Hum Genet.* 71(2):276-85.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, et al. 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet.* 42(3):203-9.
- Gloyn AL, Ellard S, Shepherd M, Howell RT, Parry EM, Jefferson A, Levy ER, Hattersley AT. 2002. Maturity-onset diabetes of the young caused by a balanced translocation

- where the 20q12 break point results in disruption upstream of the coding region of hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4A) gene. *Diabetes*. 51(7):2329-33.
- Gribble SM, Ng BL, Prigmore E, Fitzgerald T, Carter NP. 2009. Array painting: a protocol for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *Nat Protoc*. 4(12):1722–1736.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, et al. 2005. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet*. 42(1):8-16.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 1(1):4.
- Halgren C, Nielsen NM, Nazaryan-Petersen L, Silaharoglu A, Collins RL, Lowther C, Kjaergaard S, Frisch M, Kirchhoff M, Brøndum-Nielsen K, et al. 2018. Risks and recommendations in prenatally detected de novo balanced chromosomal rearrangements from assessment of long-term outcomes. *Am J Hum Genet*. 102(6):1090-1103.
- Happ H, Schilter KF, Weh E, Reis LM, Semina EV. 2016. 18q21.11 Microdeletion in Two Patients with Syndromic Peters Anomaly. *Am J Med Genet A*. 170(9):2471–2475.
- Harewood L, Schütz F, Boyle S, Perry P, Delorenzi M, Bickmore WA, Reymond A. 2010. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res*. 20(5):554-64.
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet*. 10(8):551-64.
- Heidemann S, Plendl H, Vater I, Gesk S, Exeler-Telker JR, Grote W, Siebert R, Caliebe A. 2010. Maternal uniparental disomy 15 in a fetus resulting from a balanced familial translocation t(2;15)(p11;q11.2). *Prenat Diagn*. 30(2):183-5.
- Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ, Eisenman R, Fan Y, Farra CG, Ferguson HL, et al. 2008. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet*. 82(3):712-22.
- Hiller B, Bradtke J, Balz H and Rieder H. 2004. "CyDAS Online Analysis Site". <http://www.cydas.org/OnlineAnalysis/>.
- Hirschfeldova K, Solc R. 2017. Comparison of SHOX and associated elements duplications distribution between patients (Léri-Weill dyschondrosteosis/idiopathic short stature) and population sample. *Gene*. 627:164-168.

- Hofmeister W, Nilsson D, Topa A, Anderlid BM, Darki F, Matsson H, Tapia Páez I, Klingberg T, Samuelsson L, Wirta V, et al. 2015. CTNND2-a candidate gene for reading problems and mild intellectual disability. *J Med Genet.* 52(2):111–22.
- Holland AJ, Cleveland DW. 2012. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med.* 18(11):1630-8.
- Hopkin RJ, Schorry E, Bofinger M, Milatovich A, Stern HJ, Jayne C, Saal HM. 1997. New insights into the phenotypes of 6q deletions. *Am J Med Genet.* 70(4):377-86.
- Horigome H, Takano T, Hirano T, Kajima T, Ohtani S. 1991. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 6 associated with absent pulmonary valve. *Am J Med Genet.* 38(4):608-11.
- Hulley BJ, Hummel M, Cook LL, Boyd BK, Wenger SL. 2003. Trisomy 8 Mosaicism: Selective Growth Advantage of Normal Cells vs. Growth Disadvantage of Trisomy 8 Cells. *Am J Med Genet.* 116A(2):144-6.
- Imai K, Shimadzu M, Kubota T, Morio T, Matsunaga T, Park YD, Yoshioka A, Nonoyama S. 2006. Female hyper IgM syndrome type 1 with a chromosomal translocation disrupting CD40LG. *Biochim Biophys Acta.* 1762(3):335-40.
- Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S, Keay AJ, Syme J. 1974. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann Hum Genet.* 37(4):359-76.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Smilko EE, Milam AH, Sheffield VC, Stone EM. 2003. Crumbs homolog 1 (CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet.* 12(9):1073-8.
- Jordan MA, Marques I, Rosendorff J, De Ravel TJL. 1998. Trisomy 8 mosaicism: a further five cases illustrating marked clinical and cytogenetic variability. *Genet Couns.* 9(2):139-46.
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST, et al. 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med.* 13(9):777–784.
- Kato T, Kurahashi H, Emanuel BS. 2012. Chromosomal translocations and palindromic AT-rich repeats. *Curr Opin Genet Dev.* 22(3):221–8.
- Kausch K, Haaf T, Köhler J, Schmid M. 1988. Complex chromosomal rearrangement in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet.* 31(2):415-20.
- Kishimoto K, Nomura J, Ellegood J, Fukumoto K, Lerch JP, Moreno-De-Luca D, Bourgeron T, Tamada K, Takumi T. 2017. Behavioral and neuroanatomical analyses in a genetic mouse model of 2q13 duplication. *Genes Cells.* 22(5):436-451.

- Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M, Tommerup N, Tümer Z, Lespinasse J, Jensen PK, Wirth J, Lundsteen C. 2000. High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *Eur J Hum Genet.* 8(9):661-8.
- Kleinjan DA, Lettice LA. 2008. Long-range gene control and genetic disease. *Adv Genet.* 61:339-88.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet.* 7(10):1611-8.
- Kleinjan DA, van Heyningen V. 2005. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet.* 76(1):8-32.
- Kloosterman WP, Cuppen E. 2013. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. *Curr Opin Cell Biol.* 25(3):341-8.
- Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hochstenbach R, Poot M, Cuppen E. 2011. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet.* 20:1916–1924.
- Kloosterman WP, Hochstenbach R. 2014. Deciphering the pathogenic consequences of chromosomal aberrations in human genetic disease. *Mol Cytogenet.* 7:100.
- Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen MJ, van Binsbergen E, Renkens I, Duran K, Ballarati L, Vergult S, Giardino D, Hansson K, et al. 2012. Constitutional Chromothripsis Rearrangements Involve Clustered Double-Stranded DNA Breaks and Nonhomologous Repair Mechanisms. *Cell Rep.* 1:648–655.
- Knoll R, Postel R, Wang J, Kratzner R, Hennecke G, Vacaru AM, Vakeel P, Schubert C, Murthy K, Rana BK, et al. 2007. Laminin-alpha4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation.* 116(5):515–525.
- Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. 1984. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37(3):1035–1042.
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, et al. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 30(3):283-92.
- Kuner R, Fälth M, Pressinotti NC, Brase JC, Puig SB, Metzger J, Gade S, Schäfer G, Bartsch G, Steiner E, Klocker H, Sülthmann H. 2013. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high - grade prostate cancer. *J Mol Med (Berl).* 91(2):237-48.

- Ledig S, Preisler-Adams S, Morlot S, Liehr T, Wieacker P. 2015. Premature ovarian failure caused by a heterozygous missense mutation in POF1B and a reciprocal translocation 46,X,t(X;3)(q21.1;q21.3). *Sex Dev.* 9(2):86-90.
- Lieber MR. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 9:181-211.
- Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol.* 19(1):229-37.
- Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. 2012. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev.* 22(3):211-20.
- Lu J, Helton TD, Blanpied TA, Racz B, Newpher TM, Weinberg RJ, Ehlers MD. 2007. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron.* 55(6):874-889.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, et al. 2015. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell.* 161(5):1012-1025.
- Lupiáñez DG, Spielmann M, Mundlos S. 2016. Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. *Trends Genet.* 32(4):225-237.
- Lupski JR. 2015. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. *Environ Mol Mutagen.* 56(5):419-36.
- Maciejowski J, Li Y, Bosco N, Campbell PJ, de Lange T. 2015. Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell.* 163(7):1641-54.
- Madan K. 2012. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet A.* 158A(4):947-63.
- Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y. 1997. 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):806-815.
- Mademont-Soler I, Morales C, Armengol L, Soler A, Sanchez A. 2010. Description of the smallest critical region for Dandy-Walker malformation in chromosome 13 in a girl with a cryptic deletion related to t(6;13)(q23;q32). *Am J Med Genet Part A.* 152A:2308-2312.
- Manning M, Hudgins L. 2010. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 12(11):742-5.
- Masset H, Hestand MS, Van Esch H, Kleinfinger P, Plaisancié J, Afenjar A, Mollignier R, Schluth-Bolard C, Sanlaville D, Vermeesch JR. 2016. A Distinct Class of

- Chromoanagenesis Events Characterized by Focal Copy Number Gains. *Hum. Mutat.* 37(7):661-8.
- Marcozzi A, Pellestor F, Kloosterman WP. 2018. The Genomic Characteristics and Origin of Chromothripsis. *Methods Mol Biol.* 1769:3-19.
- Marie SK, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa AP, Oba-Shinjo SM, Cohen T, Camargo AA, Kosoy A, Carlotti CG, Toledo S, et al. 2008. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer.* 122(4):807-15.
- McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, Shapero MH, de Bakker PI, Maller JB, Kirby A, et al. 2008. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet.* 40(10):1166-74.
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds). 2016. *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*, Karger, Basel.
- McKusick VA, Amberger JS. 1993. The morbid anatomy of the human genome: chromosomal location of mutations causing disease. *J Med Genet.* 30(1):1-26.
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesomepele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, et al. 2006. 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):625-33.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, et al. 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 86(5):749-64.
- Miller K, Arslan-Kirchner M, Schulze B, Dudel-Neujahr A, Morlot M, Burck U, Gerresheim F. 1997. Mosaicism in trisomy 8: phenotype differences according to tissular repartition of normal and trisomic clones. *Ann Genet.* 40(3):181-4.
- Miller DE, Chow P, Gallagher ER, Perkins JA, Wenger TL. 2019. Catel-Manzke syndrome without Manzke dysostosis. *Am J Med Genet A.* 182(3):437-440.
- Moradkhani K, Cuisset L, Boisseau P, Pichon O, Lebrun M, Hamdi-Rozé H, Maurin ML, Gruchy N, Manca-Pellissier MC, Malzac P, et al. 2019. Risk estimation of uniparental disomy of chromosome 14 or 15 in a fetus with a parent carrying a non-homologous Robertsonian translocation. Should we still perform prenatal diagnosis? *Prenat Diagn.* 39(11):986-992.
- Morris CA, Mervis CB, Paciorkowski AP, Abdul-Rahman O, Dugan SL, Rope AF, Bader P, Hendon LG, Velleman SL, Klein-Tasman BP, Osborne LR. 2015. 7q11.23 Duplication syndrome: Physical characteristics and natural history. *Am J Med Genet A.* 167A(12):2916-35.

- Nakagome Y, Tanaka T, Hashimoto T, Kuyama M, Maruyama M. 1980. Interstitial deletion 6q in a malformed boy. *Ann Genet.* 23(1):49-51.
- Narendran A, Hawkins LM, Ganjavi H, Vanek W, Gee MF, Barlow JW, Johnson G, Malkin D, Freedman MH. 2004. Characterization of bone marrow stromal abnormalities in a patient with constitutional trisomy 8 mosaicism and myelodysplastic syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* 21(3):209-21.
- Naritomi K, Izumikawa Y, Ohshiro S, Yoshida K, Shimozawa N, Suzuki Y, Orii T, Hirayama K. 1989. Gene assignment of Zellweger syndrome to 7q11.23: report of the second case associated with a pericentric inversion of chromosome 7. *Hum Genet.* 84(1):79-80.
- Nazaryan L, Stefanou EG, Hansen C, Kosyakova N, Bak M, Sharkey FH, Mantziou T, Papanastasiou AD, Velissariou V, Liehr T, et al. 2014. The strength of combined cytogenetic and mate-pair sequencing techniques illustrated by a germline chromothripsis rearrangement involving FOXP2. *Eur J Hum Genet.* 22:338–343.
- Nguyen MH, Morel F, Pennamen P, Parent P, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Basinko A, Roche S, De Braekeleer M, Perrin A. 2015. Balanced complex chromosome rearrangement in male infertility: case report and literature review. *Andrologia.* 47(2):178-85.
- Nielsen J, Wohlert M. 1991. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13 - year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet.* 87:81–83.
- Nilsson D, Pettersson M, Gustavsson P, Förster A, Hofmeister W, Wincent J, Zachariadis V, Anderlid BM, Nordgren A, Mäkitie O, et al. 2017. Whole-genome sequencing of cytogenetically balanced chromosome translocations identifies potentially pathological gene disruptions and highlights the importance of microhomology in the mechanism of formation. *Hum Mutat.* 38(2):180-192.
- Nisenberg O, Pegg AE, Welsh PA, Keefer K, Shantz LM. 2006. Overproduction of cardiac S-adenosylmethionine decarboxylase in transgenic mice. *Biochem J.* 393(Pt 1):295–302.
- Nowakowska B. 2017. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genet.* 58(4):449-457.
- Nowell PC, Hungerford DA. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25:85–109.
- Ou Z, Stankiewicz P, Xia Z, Breman AM, Dawson B, Wiszniewska J, Szafranski P, Cooper ML, Rao M, Shao L, et al. 2011. Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes. *Genome Res.* 21(1):33–46.

- Page SL, Shin JC, Han JY, Choo KH, Shaffer LG. 1996. Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet.* 5(9):1279-88.
- Palomares M, Delicado A, Mansilla E, de Torres ML, Vallespin E, Fernandez L, Martinez-Glez V, Garcia-Minaur S, Nevado J, Simarro FS, et al. 2011. Characterization of a 8q21.11 microdeletion syndrome associated with intellectual disability and a recognizable phenotype. *Am J Hum Genet.* 89(2):295-301.
- Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C. 2004. 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):647-53.
- Peeters H, Voz ML, Verschueren K, De Cat B, Pendeville H, Thienpont B, Schellens A, Belmont JW, David G, Van De Ven WJ, et al. 2006. *Sesn1* is a novel gene for left – right asymmetry and mediating nodal signaling. *Hum Mol Genet.* 15(22):3369–3377.
- Pellestor F. 2019. Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. *Mol Cytogenet.* 12:6.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P. 2011). Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update.* 17(4):476-94.
- Pengfei J, Deli Z. 2013. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK): A Novel Regulator in Cell Cycle Control, Embryonic Development, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 14(11):21551-60.
- Pfundt R, Veltman JA. 2012. Structural genomic variation in intellectual disability. *Methods Mol Biol.* 838:77-95.
- Pickard MR, Green AR, Ellis IO, Caldas C, Hedge VL, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. 2009. Dysregulated expression of *Fau* and *MELK* is associated with poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 11(4):R60.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(9):2934-8.
- Poot M, Haaf T. 2015. Mechanisms of Origin, Phenotypic Effects and Diagnostic Implications of Complex Chromosome Rearrangements. *Mol Syndromol.* 6(3):110-34.
- Rai A, Srivastava P, Phadke SR. 2019. Deletion 7q21.2q22.1 in a case with split hand-split foot malformation, sensorineural hearing loss and intellectual disability: Phenotype subtypes and the correlation with genotypes. *Eur J Med Genet.* 62(12):103597.
- Ramirez JM, Rodríguez FA, Echeverría MI, Vargas AL, Calderón AE, Miatello RM, Renna NF. 2019. *SHOX* Duplication and Tall Stature in a Patient with Xq Deletion and Vascular Disease. *Case Rep Genet.* 2019:2691820.

- Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Rao Aiden EL. 2014. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 159(7):1665-80.
- Rasmussen MB, Kreiborg S, Jensen P, Bak M, Mang Y, Lodahl M, Budtz-Jørgensen E, Tommerup N, Tranebjærg L, Rendtorff ND. 2016. Phenotypic subregions within the split-hand/foot malformation 1 locus. *Hum Genet*. 135(3):345-57.
- Ravel C, Berthaut I, Bresson JL, Siffroi JP, Genetics Commission of the French Federation of C. 2006. Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10,000 sperm donor karyotypes. *Hum Reprod*. 21(6):1484-9.
- Redin C, Brand H, Collins RL, Kammin T, Mitchell E, Hodge JC, Hanscom C, Pillalamarri V, Seabra CM, Abbott MA, et al. 2017. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. *Nat Genet*. 49(1):36-45.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, et al. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 444(7118):444-54.
- Ripperger T, Tauscher M, Praulich I, Pabst B, Teigler-Schlegel A, Yeoh A, Göhring G, Schlegelberger B, Flotho C, Niemeyer CM, Steinemann D. 2011. Constitutional trisomy 8p11.21q11.21 mosaicism: a germline alteration predisposing to myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 155(2):209-17.
- Rosenfeld JA, Amrom D, Andermann E, Andermann F, Veilleux M, Curry C, Fisher J, Deputy S, Aylsworth AS, Powell CM, et al. 2012. Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics*. 13(1):31-47.
- Rowley JD. 1973. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243(5405):290-293.
- Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM. 2007. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS One*. 2(7):e594.
- Sanchez O, Escobar JJ, Yunis JJ. 1973. A simple G-banding technique. *Lancet*. 2(7823):269.
- Schayek H, Laitman Y, Katz LH, Pras E, Ries-Levavi L, Barak F, Friedman E. 2017. Colorectal and Endometrial Cancer Risk and Age at Diagnosis in BLMAsh Mutation Carriers. *Isr Med Assoc J*. 19(6):365-367.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, et al. 2009. 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):291-6.
- Schluth-Bolard C, Diguët F, Chatron N, Rollat-Farnier PA, Bardel C, Afenjar A, Amblard F, Amiel J, Blesson S, Callier P, et al. 2019. Whole genome paired-end sequencing elucidates functional and phenotypic consequences of balanced chromosomal rearrangement in patients with developmental disorders. *J Med Genet.* 56(8):526-535.
- Schluth-Bolard C, Labalme A, Cordier MP, Till M, Nadeau G, Tevissen H, Lesca G, Boutry-Kryza N, Rossignol S, Rocas D, et al. 2013. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. *J Med Genet.* 50(3):144-50.
- Schwartz MF, Kaffe S, Wallace S, Desnick RJ. 1984. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 6 [del(6) (q16q22)]: case report and review of the literature. *Clin Genet.* 26(6):574-8.
- Seabright M. 1972. Human chromosome banding. *Lancet.* 1(7757):967.
- Seo GH, Kang E, Cho JH, Lee BH, Choi JH, Kim GH, Seo EJ, Yoo HW. 2015. Turner syndrome presented with tall stature due to overdosage of the SHOX gene. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 20(2):110-3.
- Shah S, Schrader KA, Waanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, Wechsler J, Yang J, Hayes J, Klein RJ, et al. 2013. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genet.* 45(10):1226-1231.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. 1985. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315(6020):550–554.
- Simioni M, Artiguenave F, Meyer V, Sgardioli IC, Viguetti-Campos NL, Lopes Monlleó I, Maciel-Guerra AT, Steiner CE, Gil-da-Silva-Lopes VL. 2017. Genomic Investigation of Balanced Chromosomal Rearrangements in Patients with Abnormal Phenotypes. *Mol Syndromol.* 8(4):187-194.
- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC. 2008. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet.* 1:15.
- Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofler S, Pimentel D, et al. 2005. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J Biol Chem.* 280(21):20814–20823.
- Slamova Z, Nazaryan-Petersen L, Mehrjouy MM, Drabova J, Hancarova M, Marikova T, Novotna D, Vlckova M, Vlckova Z, Bak M, et al. 2018. Very short DNA segments

- can be detected and handled by the repair machinery during germline chromothriptic chromosome reassembly. *Hum Mutat.* 39(5):709-716.
- Sobreira NL, Gnanakkan V, Walsh M, Marosy B, Wohler E, Thomas G, Hoover-Fong JE, Hamosh A, Wheelan SJ, Valle D. 2011. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Genome Res.* 21(10):1720-7.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 12(4):368-75.
- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, et al. 2005. Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *New Eng J Med.* 353(16):1694-701.
- South ST, Rector L, Aston E, Rowe L, Yang SP. 2010. Large clinically consequential imbalances detected at the breakpoints of apparently balanced and inherited chromosome rearrangements. *J Mol Diagn.* 12(5):725-9.
- Srivastava S, Engels H, Schanze I, Cremer K, Wieland T, Menzel M, Schubach M, Biskup S, Kreiß M, Ende S, et al. 2016. Loss-of-function variants in HIVEP2 are a cause of intellectual disability. *Eur J Hum Genet.* 24(4):556-61.
- Stagi S, Lapi E, Pantaleo M, Carella M, Petracca A, De Crescenzo A, Zelante L, Riccio A, de Martino M. 2015. A new case of de novo 6q24.2q25.2 deletion on paternal chromosome 6 with growth hormone deficiency: a twelve-year follow-up and literature review. *BMC Med Genet.* 16: 69.
- Stankiewicz P, Beaudet AL. 2007. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 17(3):182-92.
- Stankiewicz P, Lupski JR. 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 18(2):74-82.
- Steinfeld H, Cho MT, Retterer K, Person R, Schaefer GB, Danylchuk N, Malik S, Burns Wechsler S, Wheeler PG, van et al. 2016. Mutations in HIVEP2 are associated with developmental delay, intellectual disability, and dysmorphic features. *Neurogenetics.* 17(3):159-64.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, et al. 2011. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell.* 144(1):27-40.
- Stenman JM, Wang B, Campbell K. 2003. Tlx controls proliferation and patterning of lateral telencephalic progenitor domains. *J Neurosci.* 23(33):10568–10576.

- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto N. 2014. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole - genome sequencing. *J Hum Genet.* 59(12):649-54.
- Tabet AC, Verloes A, Pilorge M, Delaby E, Delorme R, Nygren G, Devillard F, Gérard M, Passemard S, Héron D, et al. 2015. Complex nature of apparently balanced chromosomal rearrangements in patients with autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 6:19
- Taipale M, Kaminen N, Nopola-Hemmi J, Haltia T, Myllyluoma B, Lyytinen H, Muller K, Kaaranen M, Lindsberg PJ, Hannula-Jouppi K, Kere J. 2003. A candidate gene for developmental dyslexia encodes a nuclear tetratricopeptide repeat domain protein dynamically regulated in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20):11553-8.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, Kirby A, Liu S, Muddukrishna B, Ohsumi TK, et al. 2011. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. *Am J Hum Genet.* 88(4):469-81.
- Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. 1982. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(24):7837–7841.
- Tayebi N, Jamsheer A, Flöttmann R, Sowinska-Seidler A, Doelken SC, Oehl-Jaschkowitz B, Hülsemann W, Habenicht R, Klopocki E, Mundlos S, Spielmann M. 2014. Deletions of exons with regulatory activity at the *DYNC1H1* locus are associated with split-hand/split-foot malformation: array CGH screening of 134 unrelated families. *Orphanet J Rare Dis.* 9:108.
- Thomas NS, Morris JK, Baptista J, Ng BL, Crolla JA, Jacobs PA. 2010. De novo apparently balanced translocations in man are predominantly paternal in origin and associated with a significant increase in paternal age. *J Med Genet.* 47(2):112-5.
- Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, Rowley SM, Choong DY, Tothill RW, Thorne H; kConFab, Barnes DR, Li J, et al. 2012. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes *FANCC* and *BLM* as potential breast cancer susceptibility alleles. *PLoS Genet.* 8(9):e1002894.
- Tommerup N. 1993. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet.* 30(9):713-27.
- Trembath DG, Semina EV, Jones DH, Patil SR, Qian Q, Amendt BA, Russo AF, Murray JC. 2004. Analysis of Two Translocation Breakpoints and Identification of a Negative Regulatory Element in Patients With Rieger's Syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 70(2):82-91.

- Tzschach A, Hoffmann K, Hoeltzenbein M, Bache I, Tommerup N, Bommer C, Körner H, Kalscheuer V, Ropers HH. 2006. Molecular characterization of a balanced chromosome translocation in psoriasis vulgaris. *Clin Genet.* 69(2):189-93.
- Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Chiaie BD, Mortier G, Menten B, et al. 2009. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 52(2-3):94-100.
- Vandeweyer G, Kooy RF. 2009. Balanced translocations in mental retardation. *Hum Genet.* 126(1):133-47.
- van Dijk FS, Huizer M, Kariminejad A, Marcelis CL, Plomp AS, Terhal PA, Meijers-Heijboer H, Weiss MM, van Rijn RR, Cobben JM, Pals G. 2010. Complete COL1A1 Allele Deletions in Osteogenesis Imperfecta. *Genet Med.* 12(11):736-41.
- van Silfhout AT, van den Akker PC, Dijkhuizen T, Verheij JBG, Olderode-Berends MJW, Kok K, Sikkema-Raddatz B, van Ravenswaaij-Arts CMA. 2009. Split hand/foot malformation due to chromosome 7q aberrations (SHFM1): additional support for functional haploinsufficiency as the causative mechanism. *Eur J Hum Genet.* 17(11):1432-8.
- Van Vooren S, Coessens B, De Moor B, Moreau Y, Vermeesch JR. 2007. Array comparative genomic hybridization and computational genome annotation in constitutional cytogenetics: suggesting candidate genes for novel submicroscopic chromosomal imbalance syndromes. *Genet Med.* 99:642–649.
- Vergult S, Van Binsbergen E, Sante T, Nowak S, Vanakker O, Claes K, Poppe B, Van der Aa N, van Roosmalen MJ, Duran K, et al. 2014. Mate pair sequencing for the detection of chromosomal aberrations in patients with intellectual disability and congenital malformations. *Eur J Hum Genet.* 22(5):652–659.
- Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. 2012. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 33(6):906-15.
- Vervoort VS, Viljoen D, Smart R, Suthers G, DuPont BR, Abbott A, Schwartz CE. 2002. Sorting nexin 3 (SNX3) is disrupted in a patient with a translocation t(6;13)(q21;q12) and microcephaly, microphthalmia, ectrodactyly, prognathism (MMEP) phenotype. *J Med Genet.* 39(12):893-9.
- Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. 2010. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet.* 47(5):289-97.
- Vlckova M, Trkova M, Zemanova Z, Hancarova M, Novotna D, Raskova D, Puchmajerova A, Drabova J, Zmitkova Z, Tan Y, Sedlacek Z. 2012. Mechanism and genotype-

- phenotype correlation of two proximal 6q deletions characterized using mBAND, FISH, array CGH, and DNA sequencing. *Cytogenet Genome Res.* 136(1):15-20.
- Warburton D. 1991. 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):995-1013.
- Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO. 2013. Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat Rev Genet.* 14(2):125-38.
- Westerfield L, Darilek S, van den Veyver IB. 2014. Counseling Challenges With Variants of Uncertain Significance and Incidental Findings in Prenatal Genetic Screening and Diagnosis. *J Clin Med.* 3(3):1018-32.
- Whitby H, Tsalenko A, Aston E, Tsang P, Mitchell S, Bayrak-Toydemir P, Hopkins C, Peters G, Bailey DK, Bruhn L, Brothman AR. 2008. Benign copy number changes in clinical cytogenetic diagnostics by array CGH. *Cytogenet Genome Res.* 123(1-4):94-101.
- Wierenga KJ, Jiang Z, Yang AC, Mulvihill JJ, Tsinoremas NF. 2013. A clinical evaluation tool for SNP arrays, especially for autosomal recessive conditions in offspring of consanguineous parents. *Genet Med.* 15(5): 354–360.
- Wilch ES, Morton CC. 2018. Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations. *Adv Exp Med Biol.* 1044:1-14.
- Xu XJ , Lv F, Liu Y, Wang JY, Song YW, Asan, Wang JW, Song LJ , Jiang Y, Wang O, Xia WB, et al. 2016. A Cryptic Balanced Translocation Involving COL1A2 Gene Disruption Cause a Rare Type of Osteogenesis Imperfecta. *Clin Chim Acta.* 460:33-9.
- Yasuda Y, Hashimoto R, Fukai R, Okamoto N, Hiraki Y, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Taniike M, Mohri I, et al. 2014. Duplication of the NPHP1 gene in patients with autism spectrum disorder and normal intellectual ability: a case series. *Ann Gen Psychiatry.* 13:22.
- Zepeda-Mendoza CJ, Ibn-Salem J, Kammin T, Harris DJ, Rita D, Gripp KW, MacKenzie JJ, Gropman A, Graham B, Shaheen R, et al. 2017. Computational prediction of position effects of apparently balanced human chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet.* 101(2):206-217.

Přílohy- publikace z projektu postgraduálního studia autorky

Publikace 1 (IF: 4.453)

Slamova Z, Nazaryan-Petersen L, Mehrjouy MM, Drabova J, Hancarova M, Marikova T, Novotna D, Vlckova M, Vlckova Z, Bak M, Zemanova Z, Tommerup N, Sedlacek Z. 2018. Very short DNA segments can be detected and handled by the repair machinery during germline chromothriptic chromosome reassembly. *Hum Mutat.* 39(5):709-716.

Publikace 2 (IF: 1.331)

Brisset S, **Slamova Z**, Dusatkova P, Briand-Suleau A, Milcent K, Metay C, Simandlova M, Sumnik Z, Tosca L, Goossens M, Labrune P, Zemankova E, Lebl J, Tachdjian G, Sedlacek Z. 2014. Anophthalmia, hearing loss, abnormal pituitary development and response to growth hormone therapy in three children with microdeletions of 14q22q23. *Mol Cytogenet.* 7(1):17.

Publikace 3 (IF: 1.159)

Vlckova M, Hancarova M, Drabova J, **Slamova Z**, Koudova M, Alanova R, Mannik K, Kurg A, Sedlacek Z. 2014. Monozygotic twins with 17q21.31 microdeletion syndrome. *Twin Res Hum Genet.* 17(5):405-10.

Publikace 4 (IF: 1.423)

Vlckova M, Trkova M, Zemanova Z, Hancarova M, Novotna D, Raskova D, Puchmajerova A, Drabova J, **Zmitkova Z**, Tan Y, Sedlacek Z. 2012. Mechanism and genotype-phenotype correlation of two proximal 6q deletions characterized using mBAND, FISH, array CGH, and DNA sequencing. *Cytogenet Genome Res.* 136(1):15-20.

Publikace 5 (IF 3.739)

Hancarova M, Drabova J, **Zmitkova Z**, Vlckova M, Hedvicakova P, Novotna D, Vlckova Z, Vejvalkova S, Marikova T, Sedlacek Z. 2012. Array comparative genome hybridization in patients with developmental delay: two example cases. *N Biotechnol.* 29(3):321-4.