

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Študijný program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**Mgr. Miroslava Hančárová**

Analýza variant v počte kopií (CNV) v genómech pacientov  
s mentálnou retardáciou

Analysis of copy number variant (CNV) in genomes of patients  
with mental retardation

**Dizertačná práca**

Školiteľ: Prof. Ing. Zdeněk Sedláček DrSc.

Praha, 2012

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som riadne uviedla a citovala všetky použité pramene a literatúru. Súčasne prehlasujem, že práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Súhlasím s trvalým uložením elektronickej verzie mojej práce v databáze systému medziuniverzitného projektu Theses.cz za účelom sústavnej kontroly podobnosti kvalifikačných prác.

V Prahe, 31.10.2012

Miroslava Hančárová

Hančárová, Miroslava. Analýza variant v počte kopií (CNV) v genómech pacientov s mentálnou retardáciou. Analysis of copy number variant (CNV) in genomes of patients with mental retardation. Praha, 2012. Strany 160s. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky. Školitel Sedláček, Zdeněk, Prof. Ing. DrSc.

## **Pod'akovanie**

Rada by som na tomto mieste úprimne poďakovala predovšetkým svojmu školiteľovi Prof. Ing. Zdeňkovi Sedláčkovi, DrSc. za neskutočnú trpezlivosť počas celého vedenia môjho postgraduálneho štúdia, za množstvo cenných rád, ochotu vždy pomôcť a nájsť si čas kedykoľvek bolo treba a v neposlednom rade za láskavý, ľudský prístup.

Ďakujem tiež kolektívu genetickej poradne pod vedením pani primárky MUDr. Markéty Havlovicovej, doc. MUDr. Taťáne Maříkovej CSc., MUDr. Markéte Vlčkovej, MUDr. Martine Simandlovej, MUDr. Marcele Malíkovej, MUDr. Šárke Vejvalkovej a MUDr. Alene Puchmajerovej a spolupracovníkom, ktorí sa podieľali na vzniku tejto práce RNDr. Drahuške Novotnej, Mgr. Jane Drábovej, RNDr. Marii Trkovej PhD., Ing. Věre Bečvářovej, MUDr. Markéte Kubričanovej Žaliovej PhD. a doc. RNDr. Zuzane Zemanovej CSc..

Veľmi rada by som poďakovala aj kolegom a priateľom Mgr. Betke Dleskovej Ph.D., RNDr. Petrovi Vasovčákovi Ph.D., Mgr. Zuzane Mušovej Ph.D., RNDr. Petre Hedvičákovej a MUDr. Pavlovi Tesnerovi za všetku pomoc a podporu.

Taktiež veľká vďaka patrí za pomoc priateľovi a mojej rodine za podporu počas celého štúdia.

## Abstrakt

Mentálna retardácia (MR) je časté veľmi heterogénne neurovývojové ochorenie s prevalenciou v populácii 2,5-3 %. Prispenie genetických faktorov k rozvoju MR je vysoké, ale v mnohých prípadoch zostáva etiológia ochorenia neobjasnená. Najnovšie štúdie prostredníctvom arrayových metód poukázali na častejší výskyt variant v počte kópií (copy number variants-CNV) u pacientov s týmto ochorením. Patogénne CNV boli identifikované u 10-15 % pacientov s idiopatickou MR a normálnym karyotypom.

Cieľom práce bola celogenómová analýza ziskov a strát genetického materiálu v súbore českých pacientov s MR a dôkladná bioinformatická analýza zistených genetických zmien pre určenie ich pravdepodobného klinického významu.

Analýza na SNP array HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina) bola prevedená u 183 pacientov s idiopatickou MR, normálnym karyotypom a bez expanzie v géne *FMRI*. Dáta boli analyzované dvoma nezávislými programami, GenomeStudio a QuantiSNP, a ich výstupy boli podrobené dvom kolám dôkladnej bioinformatickej analýzy. Výsledkom bola klasifikácia CNV do 4 rôznych kategórií: patogénne CNV, pravdepodobne patogénne CNV, CNV s nejasnou klinickou signifikanciou a benígne CNV. S výnimkou benígnych CNV boli všetky ostatné CNV potvrdzované nezávislou metódou ako FISH, MLPA, QFPCR atď.

Celkovo bolo posudzovaných 1207 nálezov, pričom priemerný počet na pacienta bol 6,6. V prvom kole analýzy bolo 1080 nálezov klasifikovaných ako pravdepodobne bezvýznamné a zvyšných 127 aberácií bolo nezávisle overovaných. Po overení a druhom kole bioinformatickej analýzy bolo 21 CNV klasifikovaných ako patogénne lebo boli už jasne asociované s MR, a 19 CNV bolo zaradených ako pravdepodobne patogénne. Spolu boli tieto aberácie zachytené u 13,1 % prípadov, v zhode s publikovanými štúdiami. Zachytených bolo aj 39 CNV s nejasnou klinickou signifikanciou. Naše nálezy prispeli k definovaniu nových mikrodelečných syndrómov podmieňujúcich rozvoj MR, k rozšíreniu fenotypového spektra niektorých veľmi vzácných syndrómov, alebo k zúženiu kritickej oblasti syndrómov.

Identifikácia jasne patogénneho CNV má okamžité klinické dôsledky pre genetické poradenstvo v rodine. CNV klasifikované ako pravdepodobne patogénne či CNV s nejasnou klinickou signifikanciou sú zaujímavé výskumne, keďže môžu poukázať na nové kauzálne gény. Ich klinické využitie je však v súčasnosti limitované a posúdenie ich kauzality vyžaduje opakované prehodnocovanie, keďže informácie o efekte CNV neustále pribúdajú.

**Kľúčové slová:** mentálna retardácia, SNP array, varianty v počte kópií (CNV), mikrodelecia, mikroduplikácia

## Abstract

Mental retardation (MR) is a very heterogeneous common neurodevelopmental disorder with a population prevalence of 2,5-3 %. The importance of genetic factors in MR is high but in a significant number of cases the etiology remains unexplained. Recent studies using array methods pointed to frequent occurrence of copy number variants (CNVs) in MR. Pathogenic CNVs were identified in 10-15 % patients with idiopathic MR and normal karyotype.

The aim of our work was the analysis of genome-wide gains and losses of genetic material in a group of Czech patients with MR and a thorough bioinformatic analysis of the genetic changes identified aiming at the assessment of their clinical significance.

SNP array analysis was performed using the HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina) in 183 patients with idiopathic MR, normal karyotype and no *FMRI* gene expansion. Data were analyzed using two programmes, Genome Studio and QuantiSNP. The findings were subjected to two rounds of thorough bioinformatic analysis. This led to classification of CNVs into 4 categories: pathogenic CNVs, probably pathogenic CNVs, CNVs with uncertain clinical significance and benign CNVs. With the exception of the benign variants, all CNVs were confirmed using an independent laboratory method such as FISH, MLPA, QFPCR etc.

A total of 1207 findings were assessed with an average number of findings per patient of 6.6. In the first round of analysis 1080 findings were classified as probably not significant. The remaining 127 findings were independently verified and subjected to the second round of bioinformatic analysis. This led to the classification of 21 CNVs as pathogenic and clearly associated with MR, and 19 CNVs as probably pathogenic. Together, these CNVs were identified in 13.1 % of cases, similar to published studies. Additional 39 CNVs were classified as CNVs of unclear clinical significance. Our findings contributed to the definition of new microdeletion syndromes associated with MR, helped to define the phenotypic spectra of some of these very rare syndromes, or narrowed down the critical region of the syndromes.

The identification of a clearly pathogenic CNV has immediate clinical consequences for better genetic counseling in the family. The CNVs classified as probably pathogenic or of unclear significance are valuable for research as they could point to new disease genes. However, their clinical usefulness is limited at present and their causality has to be repeatedly re-evaluated using the continuously growing databases of benign and pathogenic CNVs.

**Key words:** mental retardation, SNP array, copy number variants (CNV), microdeletion, microduplication

## Zoznam skratiek

A	adenín
ADHD	hyperkinetická porucha (attention-deficit hyperactivity disorder)
BAF	frekvencia alely B (B allele frequency)
BMI	index telesnej hmotnosti (body mass index)
bp	pár báz
C	cytozín
CGH	komparatívna genómová hybridizácia (comparative genomic hybridization)
CNS	centrálny nervový systém
CNV	varianty v počte kópií (copy number variants)
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECARUCA	European Cytogenetics Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
FoSTeS	invázia nového reťazca do replikačnej vidličky (fork stalling and template switching)
G	guanín
ISCA	International Standard Cytogenetic Array Consortium
IQ	inteligentný koeficient (intelligence quotient)
IUGR	intrauterinná rastová retardácia (intrauterine growth restriction)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCR	nízko-frekvenčné repetície (low copy repeats)
LINE	dlhé roztrúsené repetície (long interspersed nucleotide elements)
LRR	logaritmus pomeru pozorovanej a očakávanej intenzity fluorescencie na pozícii čipu odpovedajúcej vyšetrovanému SNP (log R ratio)
MKCH-10	Medzinárodná klasifikácia chorôb, 10. vydanie
MLPA	multiplexná na ligácii závislá amplifikácia prób (multiplex ligation-dependent probe amplification)
MMBIR	mikrohomológiou sprostredkovaná replikácia, indukovaná zlomom (microhomology-mediated break-induced replication)
MR	mentálna retardácia
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAHR	nealelická homológna rekombinácia (nonallelic homologous recombination)
NGS	sekvenovanie novej generácie (next generation sequencing)
NHEJ	nehomológne spájanie koncov (nonhomologous end joining)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
QF-PCR	kvantitatívna fluorescenčná polymerázová reťazová reakcia (quantitative fluorescent polymerase chain reaction)
RGB	aditívny systém miešania farieb: červená-zelená-modrá (color model red-green-blue)
RNA	ribonukleová kyselina
SINE	krátke roztrúsené repetície (long interspersed nucleotide elements)
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (single nucleotide polymorphism)
STR	krátka tandemová repetícia (short tandem repeat)
T	tymín

## Obsah

Zoznam skratiek .....	7
Obsah .....	8
1. Úvod .....	10
1.1. Definícia mentálnej retardácie a terminológia .....	10
1.2. Členenie mentálnej retardácie podľa hodnoty IQ (pásma MR) .....	10
1.3. Pridružené znaky a komorbidity .....	12
1.4. Príčiny vzniku MR .....	13
1.4.1. Negenetické príčiny vzniku MR .....	13
1.4.2. Genetické príčiny vzniku MR .....	14
1.5. Varianty v počte kópií (copy number variants - CNV) .....	16
1.5.1. Definícia a základná charakterizácia CNV .....	16
1.5.2. Mechanizmy vzniku CNV .....	17
1.5.3. Metódy detekcie CNV .....	18
1.5.4. CNV a asociácia s ochoreniami .....	21
1.5.5. Klinická interpretácia CNV .....	26
1.6. Diagnostika a liečba MR .....	29
2. Ciele práce .....	31
3. Materiál a metódy .....	32
3.1. Pacienti a kritéria k ich zaradeniu do súboru .....	32
3.2. Metódy .....	33
3.2.1. Analýza na SNP array a spracovanie primárnych dát .....	33
3.2.2. Bioinformatická analýza výsledkov SNP array .....	34
3.2.3. Metódy nezávislého overenia výsledkov SNP array a určenia pôvodu aberácie .....	35
4. Výsledky a diskusia .....	40
4.1. Charakteristika vyšetrovaného súboru .....	40
4.2. Skrining CNV a algoritmy ich detekcie .....	41
4.3. Predbežné hodnotenie kauzality CNV .....	43
4.3.1. Vypracovanie postupu pre predbežné hodnotenie kauzality CNV .....	43
4.3.2. Príklad postupu predbežného hodnotenia kauzality CNV u vybraného pacienta .....	46
4.3.3. Prehľad nálezov po predbežnom hodnotení kauzality .....	48
4.4. Potvrdenie vybraných CNV nezávislými metódami .....	52
4.4.1. Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia .....	52
4.4.2. Metóda MLPA s komerčne dostupnými kitmi .....	54



4.4.3.	Kvantitatívna fluorescenčná PCR .....	56
4.4.4.	Sekvenovanie DNA .....	58
4.4.5.	Analýza rodičov pomocou SNP array .....	59
4.4.6.	Analýza pacienta pomocou SNP array s vyšším rozlíšením (700 K).....	61
4.4.7.	Metóda MLPA s vlastnými syntetickými próbami .....	61
4.4.8.	Prehľad nezávislého overovania.....	63
4.5.	Konečná interpretácia CNV .....	65
4.5.1.	Vypracovanie postupu pre konečnú interpretáciu CNV .....	65
4.5.2.	Príklad postupu analýzy u vybraného pacienta .....	66
4.5.3.	Prehľad klasifikácie nálezov po druhom kole analýzy .....	66
4.6.	Celkový prehľad jednotlivých nálezov podľa kategórií .....	68
4.6.1.	Benígne CNV .....	68
4.6.2.	Patogénne CNV .....	69
4.6.3.	Pravdepodobne patogénne CNV .....	81
4.6.4.	CNV s nejasnou klinickou signifikanciou.....	90
4.7.	Záchyt, spektrum a interpretácia aberácií .....	94
5.	Záver.....	98
	Použitá literatúra.....	99
	Prílohy .....	109

# 1. Úvod

## 1.1. Definícia mentálnej retardácie a terminológia

Mentálna retardácia (MR) je trvalý stav zastaveného alebo neúplného duševného vývoja, ktorý je charakterizovaný hlavne porušením všetkých zložiek inteligencie tj. poznávacích, rečových, motorických a sociálnych schopností, diagnostikovaný počas vývojového obdobia (do 18. roku života). MR sa môže vyskytnúť bez alebo súčasne s inými somatickými alebo duševnými poruchami. K októbru 2012 bolo v databáze OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) 1959 výsledkov k pojmu MR, čo svedčí o nesmiernej heterogenite a rozšírení tohto ochorenia.

Na základe zákona S.2781 (Rosa's law) bol v USA od roku 2010 nahradený termín mentálna retardácia termínom „intellectual disability“. Aj keď má tento termín širší význam a okrem mentálneho postihnutia zahŕňa aj niektoré iné poruchy, odôvodnením jeho používania je etické hľadisko. Termín retardácia či retardovaný totiž nie je používaný iba v odbornej klinickej praxi, ale aj u širokej verejnosti, a môže byť pre postihnutých jedincov schopných porozumieť reči zraňujúci a dehonestujúci. Pretože je však termín MR v súčasnej dobe v českom prostredí bežne používaný a lepšie zažitý, je v tejto práci používaný, aj keď s vedomím, že v budúcnosti bude pravdepodobne nahradený iným.

Prevalencia MR sa udáva v rozmedzí 2,5-3 % v populácii, v závislosti na metóde a kritériách detekcie (Kaufman 2010). Problémy s učením má však až 10 % detí. MR častejšie postihuje mužov ako ženy v pomere 1,5:1 (Kaufman 2010).

## 1.2. Členenie mentálnej retardácie podľa hodnoty IQ (pásma MR)

Medzinárodná klasifikácia chorôb (10. vydanie, MKCH-10) (WHO 1992) rozdeľuje MR na základe hodnôt inteligenčného koeficientu (IQ) do štyroch základných kategórií (Tabuľka 1) a dvoch kategórií vedľajších s týmito charakteristikami (Vagnerova 2004):

Tabuľka 1: Základné rozdelenie mentálnych retardácií na základe hodnôt IQ.

typ MR	označenie MKCH-10	hodnota IQ	mentálny vek (roky)	zastúpenie medzi pacientami s MR	zastúpenie v populácii
ľahká	F70	50-69	9-12	80 %	2,6 %
stredne ťažká	F71	35-49	6-9	12 %	0,4 %
ťažká	F72	21-34	3-6	7 %	0,2 %
hlboká	F73	> 20	> 3	1 %	0,03 %

### *F70 Ľahká mentálna retardácia*

U postihnutých sa najskôr začne prejavovať psychomotorické oneskorenie, neskôr problémy s oneskoreným vývojom reči, poruchou reči a malou slovnou zásobou. Väčšina pacientov je diagnostikovaná až počas školskej dochádzky, kedy sa prejavujú najzávažnejšie problémy: obmedzenosť logického, abstraktného a mechanického myslenia, slabá pamäť a oneskorená jemná aj hrubá motorika. Pacienti sú schopní zvládnuť výučbu v špeciálnej škole, dosiahnuť samostatnosť v osobnej starostlivosti a v zamestnaní môžu vykonávať málo kvalifikované manuálne práce. Sú však emocionálne a sociálne nezrelí. Navyše sa individuálne môžu pridružiť poruchy správania, vývojové poruchy, autizmus, či epilepsia.

### *F71 Stredne ťažká mentálna retardácia*

Postihnutí jedinci sa dokážu učiť len mechanicky, predovšetkým na praktickej úrovni. Niektorí si osvoja základy čítania, písania a počítania, avšak v ich reči sa vyskytujú len jednoduché vety s veľmi chudobným slovníkom. V dospelosti sú schopní vykonávať pod dohľadom jednoduchú manuálnu prácu. Málokedy sú však schopní viesť samostatný život, hoci väčšina dokáže navodzovať kontakty, komunikovať a podieľať sa na jednoduchých sociálnych aktivitách. U časti pacientov je prítomný detský autizmus alebo iná pervazívna vývojová porucha, ďalej sa môže pridružiť epilepsia, alebo iné neurologické poruchy či vrodené vývojové vady.

### *F72 Ťažká mentálna retardácia*

Väčšina jedincov trpí výraznou poruchou motoriky alebo inými pridruženými defektmi, ktoré poukazujú na poškodenie alebo nesprávny vývoj centrálného nervového systému (CNS). Typická je celková neobratnosť. Reč je jednoduchá, obmedzená na jednotlivé slová, alebo sa nevytvára vôbec. Stav pacientov vyžaduje trvalú asistenciu ďalších osôb.

### *F73 Hlboká mentálna retardácia*

U pacientov je ťažké stanoviť presnú hodnotu IQ, často sa iba odhaduje. V najlepšom prípade sú postihnutí jedinci schopní veľmi primitívnej neverbálnej komunikácie, častejšie však nespoznávajú ani svoje okolie a majú značne obmedzenú schopnosť porozumieť požiadavkám. Väčšina pacientov je imobilných alebo výrazne obmedzených v pohybe, pričom často trpia automatickými stereotypnými pohybmi. K samotnej mentálnej zaostalosti bývajú pridružené ťažké neurologické poruchy ako napr. epilepsia, poškodenie zraku a sluchu, a často býva prítomné aj sebapoškodzovanie spojené s nízkym prahom bolesti.

## *F78 a F79 Iná mentálna retardácia a nešpecifikovaná mentálna retardácia*

O inej MR hovoríme vtedy, ak nie je možné stanoviť stupeň MR podľa obvyklých metód pre pridružené somatické alebo sensorické postihnutie. Pacient je buď nevidiaci, nepočujúci, nerozprávajúci, alebo má ťažké poruchy správania či autizmus. Termín nešpecifikovaná MR sa uvádza v prípadoch, kedy je MR preukázaná, ale nie je dostatok informácií pre zaradenie do jednej z predchádzajúcich kategórií.

### 1.3. Pridružené znaky a komorbidity

MR je výsledkom mnohých porúch funkcie CNS a u detí tretím najčastejším neurologickým defektom po detskej mozgovej obrne a epilepsii. Štruktúrne anomálie mozgu sú diagnostikované u 10-15 % pacientov so významným poškodením intelektu, u väčšiny jedincov však nie sú rozpoznateľné žiadne morfológické abnormality. Patologické zmeny sú primárne lokalizované v kortikálnych štruktúrach vrátane mediálnej temporálnej kôry, a taktiež v hipokampe. Najčastejšími malformáciami CNS sú defekty neurálnej trubice, hydrocefalus a mikrocefália. Menej časté sú poruchy migrácie neuroblastov (lissencefálie) a agenéza svorového telesa - corpus callosum.

Na základe pridružených znakov je možné rozdeľovať MR na syndrómovú a nesyndrómovú. Syndrómová MR je spojená s dysmorfizmom a malformáciami. Vo väčšej alebo menšej miere je MR súčasťou viac než 800 genetických syndrémov evidovaných v databáze OMIM. Medzi najčastejšie patria Downov syndrém, syndrém fragilného chromozómu X či fetálny alkoholový syndrém. Nesyndrómová MR je v tradičnom pojatí prostá, bez ďalších zreteľných klinických znakov, dysmorfizmov a malformácií. Patria sem defekty v konkrétnych génoch, napríklad v géne *GDII* na chromozóme X, ktorý sa podieľa na vezikulárnom transporte neurotransmiterov. Zatiaľ čo syndrómová MR je jasne definovaná a ľahko rozpoznateľná, jednoznačné zaradenie k nesyndrémovej MR býva diskutabilné. U pacientov s poruchou kognitívnych funkcií je náročné diagnostikovať jemné neurologické anomálie a psychiatrické ochorenia, ktoré nemusia byť tak zjavné. Podobne aj symptómy niektorých syndrémov môžu byť tak nenápadné, že bez cieleného zamerania sa na ne (napríklad na základe predchádzajúcej identifikácie špecifického genetického defektu u pacienta) je ich diagnostika veľmi náročná (Kaufman 2010). Delenie na syndrómovú a nesyndrómovú MR je preto častokrát nejasné.

Samotná MR nie je asociovaná so zvýšenou mierou predčasného úmrtia. Závažným problémom sú však rôzne komorbidity pridružené k MR. U ľudí s mentálnym postihnutím sa

vyskytujú vo zvýšenej miere fyzické či psychické zdravotné problémy v porovnaní s bežnou populáciou (Kwok a Cheung 2007). Z neurologických komorbidít je najčastejšia epilepsia, zhruba u 26 % mentálne retardovaných. Jedinci s MR navyše vykazujú častejšie rezistenciu na antiepileptiká (McGrother 2006). Časté sú aj hyperkinetická porucha (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD), sebapoškodzovanie, depresie, bipolárna porucha, úzkostné poruchy, obsedantno-kompulzívna porucha, porucha správania, tiky a iné stereotypné správanie. Schizofrénia sa u pacientov s MR vyskytuje s prevalenciou 3 % v porovnaní s 0,8 % v bežnej populácii. Poruchy videnia sú taktiež u ľudí s MR oveľa častejšie, až u 92 % pacientov, pričom závažnosť zrakového postihnutia koreluje so stupňom MR (van den Broek 2006). U týchto pacientov je veľmi častým problémom aj obezita.

U pacientov s ľahkou formou MR sa dĺžka života nelíši od bežnej populácie. Najčastejším dôvodom úmrtia pacientov s hlbokou formou MR sú ochorenia respiračného systému (Patja 2001). U pacientov so stredne ťažkou až hlbokou MR sú častým dôvodom úmrtia tiež kongenitálne abnormality, ochorenia nervového systému a zmyslových orgánov, ochorenia urogenitálneho systému či zažívacieho traktu, cerebrovaskulárne ochorenia a choroby obehového ústrojenstva (Tyler a McGrother 2009).

#### 1.4. Príčiny vzniku MR

Príčinou vzniku MR môžu byť genetické defekty a/alebo environmentálne, negenetické faktory. Približne u 40-60 % pacientov však zostáva príčina vzniku postihnutia neznáma (Rauch 2006).

##### 1.4.1. Negenetické príčiny vzniku MR

Environmentálne faktory podmieňujúce vznik MR môžu pôsobiť prenatálne, perinatálne i postnatálne. Najčastejšími prenatálnymi príčinami sú expozícia teratogénom (antagonisti kyseliny listovej, antikonvulzíva, antikoagulanty, kumarinové deriváty ako warfarín, opiáty, deriváty ortuti, pesticídy a ťažké kovy či alkohol), expozícia infekčným agensom (Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, vírus rubeoly, cytomegalovírus, varicella-zoster vírus, herpes simplex vírus, vírus HIV), hyperpyrexia, hypotyreóza a iné ochorenia matky s možnosťou teratogénneho vplyvu na vývoj plodu (materská fenylketonúria). Najčastejšou negenetickou príčinou rozvoja MR vo vyspelých krajinách je fetálny alkoholový syndróm podmieňujúci až 8 % prípadov ľahkej formy MR (May a Gossage 2001).

Perinatálne, počas pôrodu či tesne po ňom, môže dôjsť k vzniku MR v dôsledku hypoxie plodu, vaskulárnych porúch, nedonosenosti či nízkej pôrodnej váhy. V postnatálnom období môžu spôsobiť poškodenie mozgu či nervovej sústavy úrazy hlavy, topenie sa, neuroinfekcie či intoxikácia napríklad olovom alebo ortuťou. Medzi ďalšie rizikové faktory patrí podvýživa, nedostatočná zdravotná starostlivosť, nedostatočná hygiena a sociokultúrna deprivácia.

#### 1.4.2. Genetické príčiny vzniku MR

MR je najčastejším dôvodom pre návštevu klinického genetika, napriek tomu sa genetická príčina tohto ochorenia odhalí len v necelých 40-50 % všetkých prípadov (Rauch 2006).

Cytogeneticky viditeľné chromozómové aberácie, numerické či štruktúrne, tvoria približne 16 % prípadov geneticky podmienenej MR (Leonard a Wen 2002; Rauch 2006). Najčastejší Downov syndróm tvorí približne 10 % prípadov (Rauch 2006). Iné numerické či nebalancované štruktúrne aberácie sa vyskytujú s kumulatívnou frekvenciou približne 4,6 %, balancované chromozómové prestavby ako recipročné translokácie a inverzie tvoria menej než 1 % prípadov (Ropers 2010). Klinicky rozpoznateľné mikrolečné syndrómy ako Prader-Willi, Angelman, Williams, Smith-Magenis, Miller-Dieker a DiGeorge, sa vyskytujú u 4,7 % pacientov (Rauch 2006). Skrining subtelomerických oblastí chromozómov metódami FISH (fluorescenčná *in situ* hybridizácia) či MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) odhalí 1,3-2 % pacientov (Rauch 2006; Ledbetter a Martin 2007).

Na vzniku MR sa podieľajú aj defekty v konkrétnych génoch, pričom najčastejším je defekt génu *FMRI* u syndrómu fragilného chromozómu X. Ten je spolu s ďalšími X-viazanými syndrómami diagnostikovaný asi u 10 % pacientov. V súčasnosti je známych viac ako 90 génov na chromozóme X podmieňujúcich vznik MR, u autozómov sa ich množstvo odhaduje na 800 až 850 (Ropers 2010). Prvé z identifikovaných defektných génov boli gény kódujúce signálne molekuly v dráhe Rho či Rab GTPáz (*GDII*, *PAK3*, *ARHGEF6*) alebo gény pre proteíny asociované s remodelingom chromatinu (*RPS6KA3*, *ATRX*). Neskôr boli nájdené mutácie v génoch dôležitých pre správnu funkciu neurónov ako sú proteínové zložky synaptických veziklov alebo komponenty potrebné pre ich správnu formáciu (*SYN1*, *SLC6A8*, *NLGN4*, *DLG3*) a veľké množstvo nových transkripčných faktorov (*ZNF41*, *ZNF81*, *ZNF674*) (Raymond a Tarpey 2006). Na vzniku MR sa môžu podieľať aj chybné interleukínové receptory (Chelly 2006).



## 1.5. Varianty v počte kópií (copy number variants - CNV)

### 1.5.1. Definícia a základná charakterizácia CNV

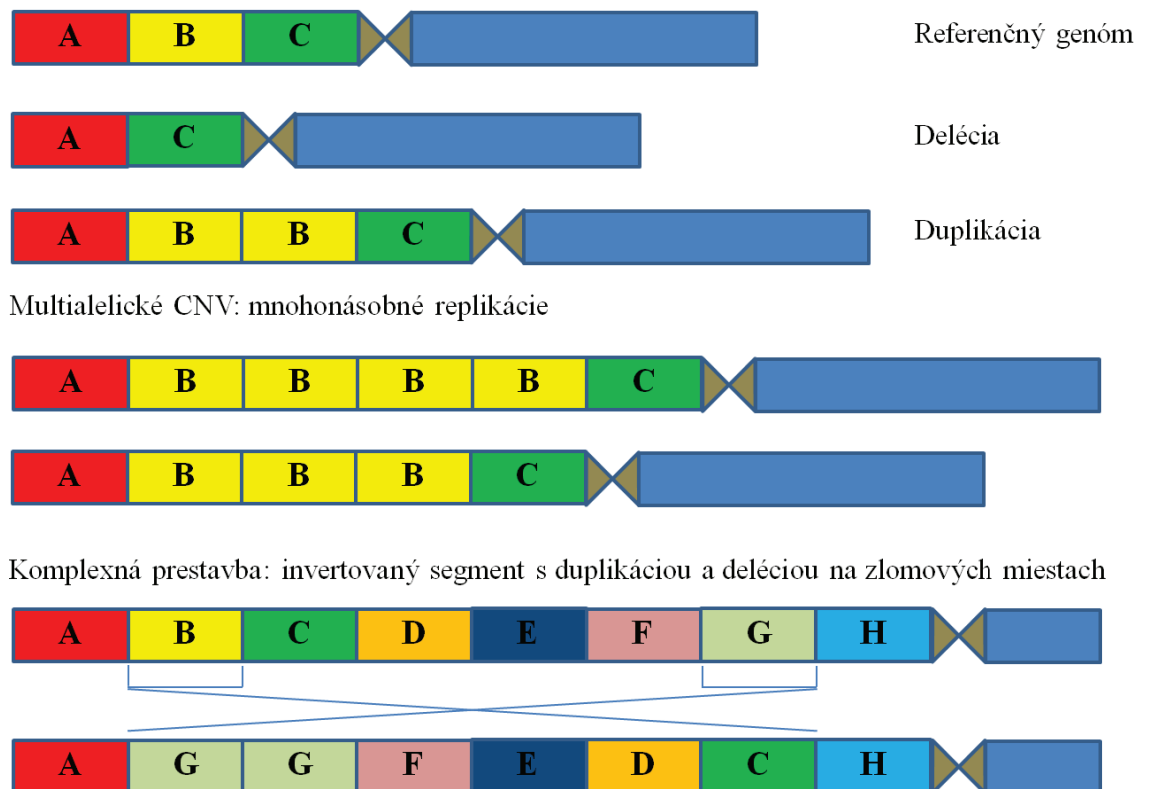
Ľudský genóm obsahuje veľké množstvo variant v rozsahu od jedného páru báz až po rozsiahle chromozómové prestavby. S rozvojom arrayových metód došlo k odhaleniu množstva delécií a duplikácií, označovaných ako varianty v počte kópií (copy number variants - CNV) či polymorfizmus v počte kópií (CNP). V roku 2004 Iafrate (2004) a Sebat (2004) nezávisle na sebe vyšetrili súbory zdravých jedincov dvomi arrayovými technikami a identifikovali prekvapivo vysoký počet CNV v genóme. V Databáze genómových variant (Database of Genomic Variants, DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>) je k októbru 2012 katalogizovaných 66 741 CNV u zdravých jedincov. Pokrývajú viac než 240 Mb ľudského referenčného genómu, čo je približne 12-15 % euchromatínovej časti genómu (Carter 2007), najmenej 6 % z každého chromozómu (Redon 2006). CNV sú najčastejším typom štruktúrnych variácií v ľudskom genóme (Sebat 2004; Redon 2006), a tak významne prispievajú ku genetickej heterogenite populácie. CNV majú vyššiu mutačnú rýchlosť per lokus ako SNP (jednonukleotidový polymorfizmus) a sú asi vo významnej miere zodpovedné za evolúciu ľudských génov a celého genómu prostredníctvom duplikácií či triplikácií génov a presúvania exónov (Stankiewicz a Lupski 2010), či za adaptáciu na rôzne environmentálne vplyvy. Tradične je termín CNP používaný, ak je frekvencia minoritnej alely v populácii 1 % alebo vyššia. Avšak u variant v počte kópií nemusia byť frekvencie kvôli rozdielom v použitej metóde detekcie spoľahlivo určené, a preto sa zvyčajne používa termín CNV bez ohľadu na frekvenciu.

CNV sú úseky DNA dlhé od 1 kb po niekoľko Mb prítomné vo variabilnom počte kópií v porovnaní s referenčným genómom (Feuk 2006a; Lupski 2007). V novšej štúdií Lee a Scherer (2010) navrhujú úpravu definície CNV znížením minimálnej dĺžky. Usudzujú, že počiatočný dĺžkový limit nad 1 kb bol daný iba obmedzenou rozlišovacou schopnosťou technológií používaných na ich detekciu, a že ľudský genóm obsahuje veľké množstvo variant menších ako 1 kb. Tieto CNV však stále nie je možné spoľahlivo identifikovať, pretože zatiaľ nie sú široko dostupné celogenómové molekulárne metódy s takýmto rozlíšením.

CNV sú stabilné a môžu byť dedičné, ale spontánne môžu vznikáť aj nové prestavby. Presný mechanizmus vzniku CNV ale nie je úplne známy. K ich vzniku prispievajú mechanizmy podobné tým, aké sa uplatňujú pri vzniku mikroskopicky pozorovateľných chromozomálnych prestavieb. Mnohé CNV vznikajú v oblastiach segmentálnych duplikácií, ktoré k prestavbám predisponujú. Jednoduché CNV sa vyskytujú vo forme delécie alebo



tandemovej či inzerčnej duplikácie. Mnohé CNV však vznikli komplexnejším mechanizmom a ich súčasná podoba odráža históriu jednotlivých krokov zahrňujúcu viaceré prestavby genetického materiálu (Obrázok 2). Súčasťou CNV môžu byť celé gény, časti génov, komplexy susediacich génov alebo len nekódujúca DNA. Napriek intenzívnemu úsiliu nám presnejšie údaje o celkovom množstve, pozícii, veľkosti, génovom obsahu a populačnej frekvencii CNV zatiaľ chýbajú.



Obrázok 2: Ukážka možných typov CNV.

### 1.5.2. Mechanizmy vzniku CNV

Na vytváraní CNV sa podieľajú molekulárne mechanizmy v priebehu meiotickej rekombinácie i počas mitózy (Vissers 2009). Počas meiózy môžu CNV vzniknúť v procese nealelickej homológnej rekombinácie (nonallelic homologous recombination, NAHR). Môžu byť podmienené ale aj na homológii nezávislým dejom – nehomológnym spájaním koncov (nonhomologous end joining, NHEJ). Dôležitú úlohu majú mechanizmy reparácie DNA spojené s replikáciou, ktoré využívajú mikrohomológiu nukleotidov na zlomových miestach a môžu tak byť zodpovedné za vytvorenie novej genómovej prestavby. Ide o mechanizmy, kedy dôjde k pozastaveniu či kolapsu replikačnej vidličky a následnej zámene templátu –

invázii nového reťazca do replikačnej vidličky (fork stalling and template switching, FoSTeS) a taktiež o mikrohomológiu sprostredkovanú replikáciu, indukovanú zlomom (microhomology-mediated break-induced replication, MMBIR).

Na vznik CNV môže mať vplyv lokálna genómová architektúra. CNV sú často obklopené blokmi DNA nazývanými segmentálne duplikácie či nízkofrekvenčné repetície (low copy repeats, LCR). Ide o fragmenty DNA dlhšie ako 1 kb s viac než 90 % sekvenčnou identitou, ktoré prispievajú k lokálnej genómovej nestabilite. Ak LCR dosiahnu približne 97 % identitu a nachádzajú sa od seba vo vzdialenosti menšej než 10 Mb, môžu sprostredkovať NAHR. Ta môže prebiehať aj medzi inými repetitívnymi sekvenciami, napríklad dvoma Alu elementmi z kategórie SINE, či L1 elementmi z kategórie LINE. Ak rekombinácia prebieha medzi dvoma rovnako orientovanými repetíciami, dochádza k vytvoreniu delécie alebo reciprokej duplikácie genómového segmentu medzi nimi. NAHR medzi opačne orientovanými repetíciami vedie k vzniku inverzie. Týmto mechanizmom vzniká väčšina rekurentných genómových prestavieb. Unikátne, nerekurentné prestavby majú rôzne dĺžky a rozptýlené zlomové miesta, ktoré sa ale takisto vyskytujú prednostne v okolí LCR. Môžu vznikáť mechanizmami NHEJ, FoSTeS či MMBIR. NHEJ je zodpovedný za opravu dvojreťazcových zlomov v DNA. Opravený reťazec DNA má často v mieste zlomu vmedzerené nukleotidy, vytvárajúce tzv. molekulárnu jazvu, vďaka ktorým je rozpoznateľný. V porovnaní s NAHR tieto mechanizmy nevyžadujú LCR alebo iné repetície, ale môžu byť takisto vyvolané lokálnou genómovou architektúrou.

Častokrát je k odhaleniu mechanizmu vzniku nutná detailná analýza zlomových miest na úrovni jednotlivých báz. Počet prerušení DNA nutných k sformovaniu CNV sa líši medzi jednotlivými mechanizmami. Pre NAHR a NHEJ sú vo všeobecnosti nutné dve dvojreťazcové prerušenia DNA. U mechanizmov založených na replikácii, ako sú FoSTeS a MMBIR, je nutný iba jeden zlom DNA. Dĺžka CNV nie je závislá na mechanizme vzniku (Vissers 2009).

### 1.5.3. Metódy detekcie CNV

V súčasnej dobe sú najpoužívanejšími metódami pre detekciu CNV arrayová komparatívna genómová hybridizácia (array CGH), analýza na SNP array a sekvenovanie novej generácie.

#### *Array CGH*

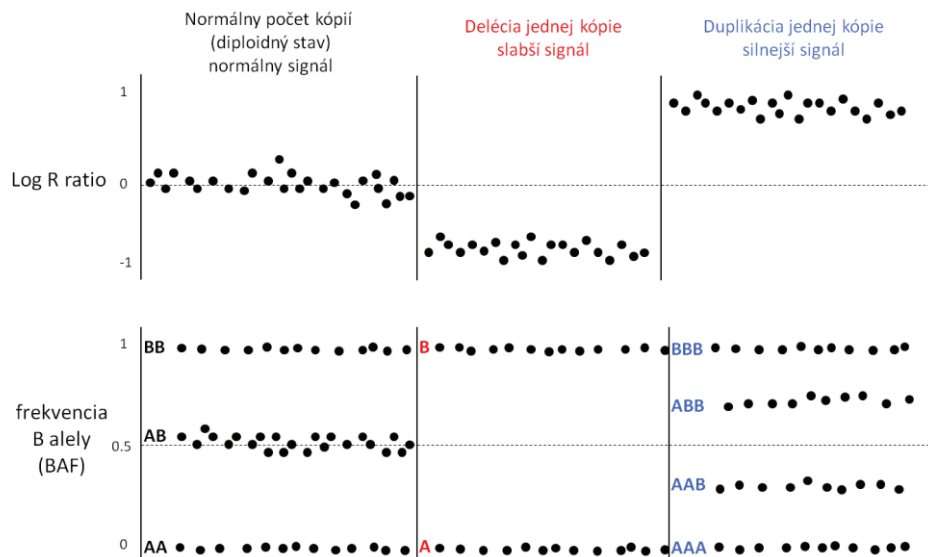
Táto metóda spája výhody klasickej CGH a DNA čipov pre detekciu delécií a duplikácií v genómoch pacientov (Edelmann a Hirschhorn 2009). Princíp metódy je

podobný ako u klasickej CGH, avšak na rozdiel od nej sa nevyužívajú metafázne chromozómy ale krátke fragmenty DNA, ktoré sú naviazané na čip. Pomocou odlišných fluorochrómov je označená kontrolná a testovaná DNA. Označené DNA sú zmiešané v rovnakom pomere a hybridizované na fragmenty DNA na čipe. Po hybridizácii sa odmytím odstráni nenaviazaná DNA a následné hodnotenie prebieha pomocou skeneru, ktorý nasníma laserom obraz čipu do počítača. Špeciálny počítačový program potom hodnotí každý spot na čipe a stanoví pomer intenzity signálu oboch fluorochrómov (Bejjani a Shaffer 2006).

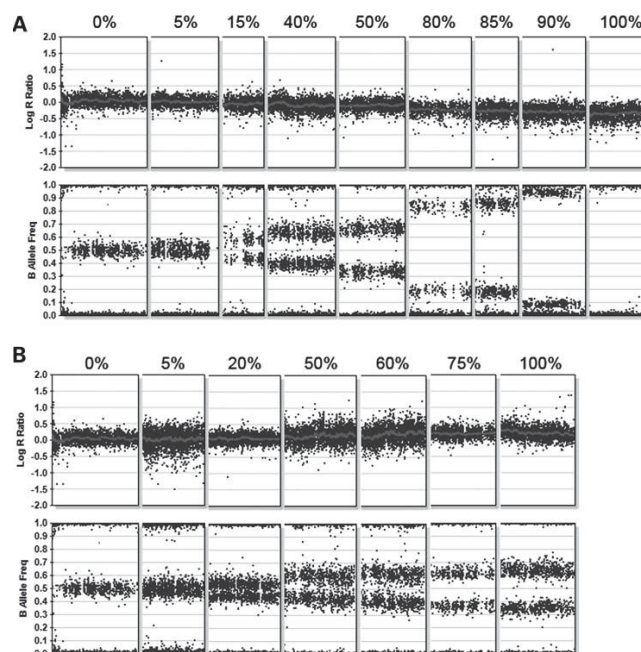
### *SNP array*

Metóda je ďalším druhom analýzy na DNA čipe. Je založená na detekcii SNP a umožňuje genotypovanie, detekciu zmien v počte kópií, mozaiek a uniparentálnej dizómie (Gijbers 2009). Metóda zisťuje genotyp vyšetrovanej DNA v niekoľko sto tisícoch až miliónoch SNP pomocou hybridizácie vyšetrovanej DNA na čip so zakotvenými oligonukleotidovými sondami. Postupov zistenia konkrétneho genotypu je niekoľko a môžu využívať napríklad predĺženie zakotveného oligonukleotidu o jednu bázu podľa komplementarity s hybridizovanou vyšetrovanou DNA.

SNP array ponúkajú oproti array CGH okrem údaju o pomere pozorovanej a očakávanej intenzity fluorescencie u vyšetrovaných SNP (Log R Ratio, LRR) aj údaj o frekvencii alely B (B Allele Frequency, BAF), čiže informáciu o genotype. U autozomálnych SNP predstavujú hodnoty LRR oscilujúce okolo nuly prítomnosť 2 kópií, čiže normálny stav diploidného organizmu. BAF môže nadobúdať hodnotu 0, ktorá predstavuje homozygotný stav alely A – AA, hodnotu 0,5 predstavujúcu heterozygotný stav AB a hodnotu 1 predstavujúcu homozygotný stav alely B – BB. V prípade, že intenzita fluorescencie v danom úseku chromozómu klesá (hodnoty LRR sa pohybujú v rozmedzí 0 až -1), je daný úsek DNA prítomný len v 1 kópii a zaznamenávame deléciu. V takomto prípade v danom úseku nie je možná heterozygotita a pozorujeme iba hodnoty BAF 0 – prítomná iba alela A alebo 1 – prítomná iba alela B (Obrázok 3). V prípade, že intenzita fluorescencie v danom úseku chromozómu stúpa (hodnoty LRR sa pohybujú v rozmedzí 0 – 1), je daný úsek DNA prítomný v 3 (alebo viac) kópiách a zaznamenávame duplikáciu (amplifikáciu). BAF nadobúda u duplikácií až 4 možných hodnôt: 0 predstavuje genotyp AAA, hodnota v rozmedzí 0,25 až 0,5 predstavuje genotyp AAB, hodnota v rozmedzí 0,5 až 0,75 predstavuje genotyp ABB a hodnota 1 predstavuje genotyp BBB (Obrázok 3). Okrem delécií a duplikácií je možné touto metódou zachytiť aj rôzne typy mozaiek. Podľa percentuálneho zastúpenia aberovanej línie buniek je možné pozorovať rôzne odchýlky v LRR a BAF (Obrázok 4).



Obrázok 3: Ukážka detekcie normálneho diploidného stavu, delécie a duplikácie jednej kópie pomocou SNP array (upravené podľa Ku 2012).

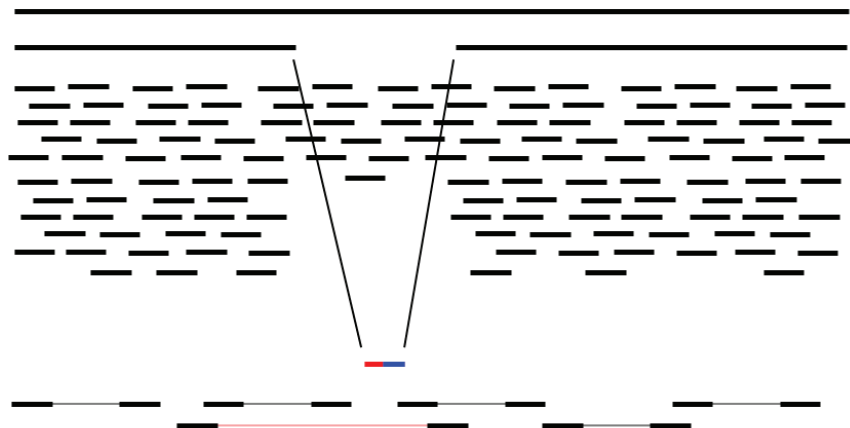


Obrázok 4: Ukážka detekcie rôznych typov mozaiek pomocou SNP array. (A) delécia v mozaike, (B) duplikácia v mozaike (prevzaté od Conlin 2010).

### *Sekvenovanie novej generácie*

Metódy sekvenovania novej generácie (next generation sequencing, NGS) pracujú na rôznych princípoch, ale ich zhodným výstupom je veľké množstvo fragmentov sekvencie, ktoré je možné poskladať na kostre referenčného genómu. CNV, napríklad deléciu, je potom možné v týchto dátach identifikovať na základe poklesu pokrytia - množstva fragmentov sekvencie v úseku genómu, ktorý je prítomný iba v jednej kópii, identifikáciou tzv. junction

fragmentov priamo v nukleotidovej sekvencii, či pri sekvenovaní spárovaných koncov fragmentov DNA známej dĺžky na základe diskrepancie medzi vzdialenosťou sekvencií mapovaných na referenčný genóm a známou dĺžkou sekvenovaných fragmentov (Obrázok 5).



Obrázok 5: Detekcia delécie pomocou NGS. Delécia sa prejaví menším počtom fragmentov sekvencie v deletovanej oblasti, prítomnosťou tzv. junction fragmentov a neodpovedajúcou vzdialenosťou sekvencií spárovaných koncov väčších fragmentov.

#### 1.5.4. CNV a asociácia s ochoreniami

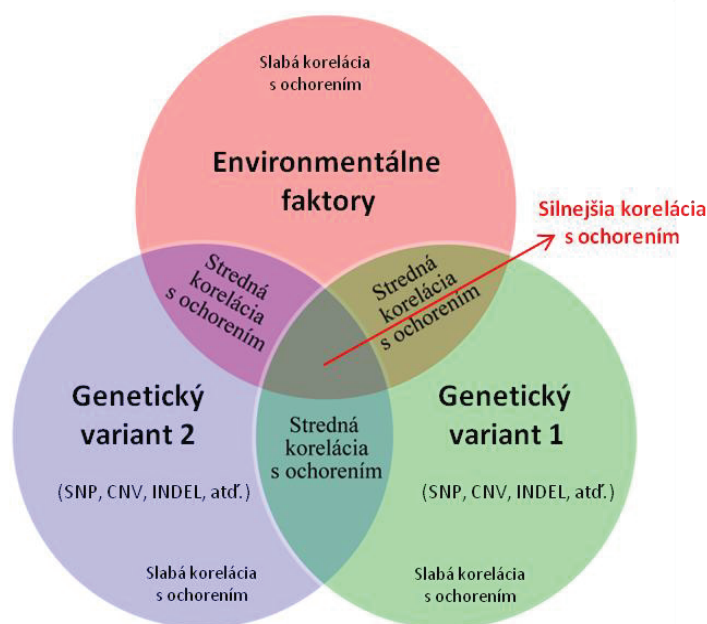
Najnovšie štúdie arrayovými metódami poukázali na silnú asociáciu CNV s množstvom ochorení. Viac než 41 % identifikovaných CNV sa prekrýva so známymi génmi (Henrichsen 2009) a prispievajú tak pravdepodobne nielen k bežnej fenotypovej variabilite, ale aj k predispozícii k rôznym ochoreniam.

So CNV sú spájané komplexné ochorenia ako MR (Koolen 2008; Ropers 2010; Cooper 2011; Kaminsky 2011) a autizmus (Sebat 2007; Cho 2009), ďalej schizofrénia (Walsh 2008; Xu 2008), epilepsia (Helbig 2009), Parkinsonova (Singleton 2003) a Alzheimerova choroba (Rovelet-Lecrux 2006), bipolárna porucha (Lachman 2007), pankreatitída (Le Marechal 2006), kardiovaskulárne ochorenia (Pollex a Hegele 2007), Crohnova choroba (McCarroll 2008), astma (Tamer 2004), nádorové ochorenia (Shlien a Malkin 2009), citlivosť k infekcii HIV, psoriáza, systémový lupus erythematosus a mnoho iných ochorení (Stankiewicz a Lupski 2010). Neustále pribúdajú asociácie s ďalšími ochoreniami.

Patogénne CNV u pacientov s neurovývojovými ochoreniami sú zhromažďované v databázach ako DECIPHER - Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (<http://decipher.sanger.ac.uk/>), International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium (<https://www.iscaconsortium.org/>) alebo ECARUCA - European Cytogenetics Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations

(<http://www.ecaruca.net/>). Kontinuálne zaradovanie potenciálne patogénnych CNV spolu s klinickým obrazom pacienta do týchto databáz napomáha k potvrdeniu patogenity daných CNV, ich správnej klinickej interpretácii a kvalifikovanému genetickému poradenstvu v postihnutých rodinách.

CNV môžu narušiť expresiu génov v danom regióne a tým viesť k rozvoju ochorenia. Fenotypový prejav ochorenia bude závisieť okrem iného aj na tom, ako CNV zasiahnu gény citlivé na dávku (dosage-sensitive) či ich regulačné oblasti. Podľa typu citlivosti autozomálneho génu na dávku rozlišujeme haploinsuficientné gény (u ktorých sa fenotypovo prejaví delécia jednej alely) a triplosenzitívne gény (u ktorých sa fenotypovo prejaví duplikácia jednej alely). Niektoré gény spadajú do oboch kategórií, pričom fenotypový prejav zvýšenej a zníženej dávky sa môže líšiť. Zároveň je pravdepodobné, že k rozvoju fenotypových prejavov ochorenia nedochádza vplyvom iba jediného CNV, ale vzájomnou kombináciou rôznych CNV a iných genetických variant, napríklad SNP (Obrázok 6).

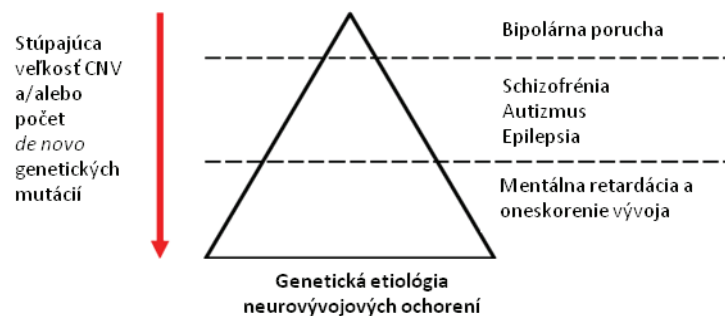


Obrázok 6: Kumulatívny vplyv faktorov ovplyvňujúcich náchylnosť k polygénnym ochoreniam. Schematické znázornenie viacerých genetických variant a environmentálnych faktorov, ktoré sa podieľajú na spoluvytváraní polygénnych ochorení (upravené podľa Almal a Padh 2012).

Najčastejšie sú CNV asociované s neurovývojovými ochoreniami. Tie sa vyznačujú nedostatočným vývojom či neobvyklou veľkosťou mozgu, a sú často spájané s kognitívnou, neurologickou či psychiatrickou poruchou. Ide o zastrešujúci pojem, ktorý zahŕňa rôzne, navzájom sa prelínajúce diagnózy. Zaradujú sa sem MR, oneskorený vývoj, autizmus, schizofrénia či bipolárna porucha. Aj napriek zdanlivo odlišnej primárnej diagnóze sa už

mnoho rokov predpokladá vzájomný fenotypový prekryv týchto ochorení pri súčasnej značnej klinickej heterogenite. Napríklad u jedincov s autizmom môže, ale nemusí byť prítomná aj MR. Obdobný klinický prekryv môže byť pozorovaný aj u psychiatrických ochorení, ako je bipolárna porucha a schizofrénia. Podobne jedinci so schizofrénom vykazujú ako komorbiditu rôzne závažné defekty kognitívnych funkcií ako aj štruktúrne defekty mozgu. Pacienti s epilepsiou majú vyššiu pravdepodobnosť rozvoja psychóz, kým pacienti s MR a schizofrénom sú viac predisponovaní k rozvoju epilepsie.

Veľké množstvo pozorovaní naznačuje, že tento fenotypový prekryv by mohol byť dôsledkom aj prekryvu genetického. Neurovývojové ochorenia zdieľajú spektrum podobných zachytených patogénnych CNV. Z hľadiska každého ochorenia sú veľmi vzácne, avšak celkovo v rámci skupiny neurovývojových ochorení sú relatívne časté. Pre túto skupinu ochorení bol navrhnutý tzv. oligénny model. Jeho princípom je, že so závažnosťou neurovývojového ochorenia postupne stúpa počet detegovaných CNV u pacienta ako aj ich veľkosť (Coe 2012). Najmenej CNV a s najmenšou veľkosťou bolo zachytených u pacientov s bipolárnou poruchou, naopak pacienti s MR majú CNV v najväčšom počte a najväčších rozmerov spomedzi pacientov s neurovývojovými ochoreniami (Obrázok 7). Najčastejšie detegované CNV u neurovývojových ochorení so zameraním na MR sumarizuje Tabuľka 2.



Obrázok 7: Oligénny model pre vytváranie fenotypov u neurovývojových ochorení (upravené podľa Coe 2012).

Tabuľka 2: Rekurentné CNV v ľudskom genóme podmieňujúce či predisponujúce k MR a iným neurovývojovým ochoreniam s dôrazom na tzv. nové syndrómy (klasické mikrodielečné syndrómy sú uvádzané najmä pokiaľ existuje ich zrkadlový duplikačný protejšok. (upravené podľa Ropers 2010).

genómový región / názov	behaviorálny / kognitívny fenotyp	dysmorfické znaky	nepostihnutí nosiči
<b>1q21</b> mikrodielečný sy.	ľahká až stredne ťažká MR, schizofrénia, autizmus	mikrocefália, katarakty, srdcové abnormality	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>1q21</b> mikroduplikačný sy.	rizikový faktor pre MR a spektrum autistických porúch	makrocefália, vrodené vývojové vady	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>2p15-p16</b> mikrodielečný sy.	stredne ťažká až ťažká MR	mikrocefália, hypoplázia optického nervu, hydronefróza, faciálny dys., neprospevanie, kamptodaktília	-
<b>3q29</b> mikrodielečný sy.	ľahká až stredne ťažká MR, autizmus	mikrocefália, faciálny dysmorfizmus, ataxia, deformity hrudnej steny, dlhé špicaté prsty	-
<b>3q29</b> mikroduplikačný sy.	ľahká až stredne ťažká MR	mikrocefália, oftalmologické problémy	nepostihnutí rodičia
<b>5q35</b> mikrodielečný sy. (Sotos)	MR, ťažké poruchy učenia	nadmerný vzrast, makrocefália, dysmorfická tvár	-
<b>7q11.23</b> mikroduplikačný/triplikačný sy.	ľahká MR, autizmus, oneskorenie reči, epilepsia	trigonocefália typu II, kortikálna dysplázia, rastová retardácia	-
<b>8p23.1</b> mikrodielečný sy.	MR, hyperaktivita	kongenitálna difragmatická hernia, srdcová vada, kryptorchizmus	-
<b>9q22.3</b> mikrodielečný sy.	MR, hyperaktivita, psychomotorické oneskorenie	makrocefália, trigonocefália, faciálny dys., nadmerný vzrast	-
<b>15q13.1</b> mikroduplikačný sy.	MR, schizofrénia, autizmus	-----	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>15q13.3</b> mikrodielečný sy	rizikový faktor pre MR, schizofréniu, autizmus a epilepsiu	faciálny dysmorfizmus, klimodaktília	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>15q24</b> mikrodielečný sy.	ľahká MR	rastová retardácia, mikrocefália, abnormality prstov, hypospádia, abnormálne riedke väzivové tkanivo, faciálny dysmorfizmus	-
<b>15q24</b> mikroduplikačný sy.	oneskorenie vývoja	dysmorfické faciálne rysy, abnormality prstov a genitálii	nepostihnutí rodičia
<b>16p11.2</b> mikrodielečný sy.	MR, autizmus, vývojová porucha, motorické oneskorenie, epilepsia, poruchy správania, oneskorenie reči	makrocefália, vrodené vývojové vady	nepostihnutí rodičia
<b>16p11.2</b> mikroduplikačný sy.	schizofrénia, bipolárna porucha, autizmus, motorické oneskorenie, oneskorenie reči, ADHD	mikrocefália, vrodené vývojové vady	kontroly
<b>16p11.2-p12</b> mikrodielečný sy.	MR	rekurentné ušné infekcie, minoritné faciálny dys., neprospevanie	-



genómový región / názov	behaviorálny / kognitívny fenotyp	dysmorfické znaky	nepostihnutí nosiči
<b>16p13.1</b> mikroduplicačný sy.	MR, rizikový faktor pre epilepsiu a schizofréniu	dysmorfické rysy	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>16p13.1</b> mikroduplicačný sy.	rizikový faktor pre MR, autizmus a epilepsiu	-----	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>17p13.3</b> mikroduplicačný sy. (Miller-Dieker, gén <i>LIS1</i> )	MR, epilepsia	lisencefália	-
<b>17p11.2</b> mikroduplicačný sy. (Smith-Magenis)	MR, hyperaktívita, sebašpoškozovanie, poruchy spánku	chrapľavý hlas, brachydaktília, hypotónia	-
<b>17p11.2</b> mikroduplicačný sy. (Potocki-Lupski)	ľahká MR, ADHD, autizmus	neonatálna hypotónia, neprospevanie, spánková apnoe, kardiovaskulárne abnormality	-
<b>17q11.2</b> mikroduplicačný sy. (gén <i>NFI</i> )	MR	nerovnomerná kožná pigmentácia, hypertelorizmus, hrubé faciálne rysy	-
<b>17q12</b> mikroduplicačný sy.	MR	ochorenie obličiek, hepatopatia, MODY	-
<b>17q12</b> mikroduplicačný sy.	rizikový faktor pre ľahkú až stredne ťažkú MR a epilepsiu	-----	nepostihnutí rodičia, kontroly
<b>17q21.31</b> mikroduplicačný sy. (Koolen-De Vries)	MR, poruchy učenia	neonatálna hypotónia, vrodené vady srdca a obličiek, s vekom hrubnúce faciálne rysy, orálno-motorická dyspraxia	-
<b>17q21.31</b> mikroduplicačný sy.	MR, ťažké oneskorenie psychomotorického vývoja, slabá sociálna interakcia	mikrocefália, abnormality prstov, hirzutizmus, faciálny dysmorfizmus	-
<b>22q11</b> mikroduplicačný sy. (DiGeorge)	ľahké poruchy učenia, oneskorenie reči, schizofrénia	vrodené vady srdca a obličiek, neonatálna hypokalcémia, velofaryngeálna insuficiencia, faciálny dysmorfizmus	-
<b>22q11</b> mikroduplicačný/triplikačný sy.	MR, poruchy učenia	rastová retardácia, muskulárna hypotónia, oneskorený psychomotorický vývoj	nepostihnutí rodičia
<b>22q11.21-q11.23</b> mikroduplicačný sy.	MR	faciálny dysmorfizmus, rastová retardácia, vrodené vady srdca, mierne skeletálne abnormality	-
<b>22q11.21-q11.23</b> mikroduplicačný sy.	MR, nerozvinutá reč alebo oneskorenie reči, neschopnosť chôdze, apraxia a dysartria	faciálny dysmorfizmus	nepostihnutí rodičia
<b>22q13</b> mikroduplicačný sy. (Phelan-McDermid, gén <i>SHANK3</i> )	celkové vývojové oneskorenie, nerozvinutá reč či ťažké oneskorenie reči, autistické správanie	minoritné dysmorfické znaky	-
<b>Xp22.31</b> mikroduplicačný sy.	MR	X-viazaná ichthyóza	-
<b>Xp22.31</b> mikroduplicačný sy.	MR, oneskorenie reči	mikrocefália	nepostihnutí rodičia
<b>Xq28</b> mikroduplicačný sy. (gén <i>MECP2</i> )	ťažká MR, ťažká hypotónia, oneskorenie reči, epilepsia	rekurentné infekcie	-

### 1.5.5. Klinická interpretácia CNV

Klinická interpretácia CNV zatiaľ výrazne zaostáva za technickými možnosťami ich detekcie. Je to náročná procedúra pozostávajúca z viacerých krokov. Opiera sa o štúdium údajov v literatúre a v rôznych databázach a z časti je založená na hodnotení signifikancie génov zahrnutých v prestavbe. V súčasnosti ešte stále nie sú definované štandardné postupy ako posudzovať a interpretovať výsledky arrayových metód. V dôsledku toho je hodnotenie patogenity CNV stále čiastočne subjektívny proces a potenciálne môže viesť k nezrovnalostiam v interpretácii CNV, u ktorých korelácia genotyp - fenotyp nebola ešte jednoznačne potvrdená na dostatočnom počte podobných pacientov v rámci rôznych štúdií.

Definícia CNV neberie zreteľ na klinický impakt danej variácie, čo môže byť mätúce pre klinických genetikov, ktorí doteraz brali chromozómové varianty ako zmeny bez klinickej signifikancie. Termín CNV je používaný aj u pacientov s rôznymi ochoreniami, aj u zdravých kontrol. Naše vedomosti ohľadom genómových imbalancií sa neustále vyvíjajú a je teda nutné klinickú signifikanciu nejasného CNV opakovane preskúmať. CNV, ktoré sa najprv mohlo javiť ako klinicky nevýznamné, môže byť za podpory nových informácií prehodnotené na kauzálne pre dané ochorenie a opačne. Kým ale nebude k dispozícii spoľahlivý kľúč na určenie patogenity a kauzality CNV, bude mať toto súhrnné označenie svoje opodstatnenie. Pre uľahčenie klasifikácie boli navrhnuté rôzne, zatiaľ nejednotné systémy kategorizácie klinickej signifikancie CNV. Medzi najjednoduchšie patrí rozdelenie na patogénne CNV, benígne CNV a CNV s neznámou klinickou signifikanciou (Lee 2007). Posudzované hrubé kritériá pri hodnotení patogenity CNV uvádza Tabuľka 3.

Jedným z prvých kritérií pri určovaní patogenity CNV je určenie dedičnosti. Ak CNV vzniklo *de novo*, je väčšia pravdepodobnosť, že môže podmieňovať ochorenie. Varianty zdedené od zdravého rodiča boli v minulosti automaticky kategorizované ako benígne. S pribúdajúcimi informáciami o asociácii CNV s ochoreniami sa od tohto striktného zaradenia upúšťa. U CNV zdedeného od zdravého rodiča by sa mal preskúmať širší rodokmeň. Ak pacient nesie rovnaké CNV ako ďalší postihnutý člen rodiny, podporuje to patogenitu CNV. Aj ďalšie podrobnejšie vyšetrenie nepostihnutého rodiča môže odhaliť predtým nepostrehnutú jemnú manifestáciu ochorenia. Svoje môže zohrávať aj neúplná penetrancia, variabilná expresivita, mozaicizmus u rodiča, epistáza, epigenetika či environmentálne faktory (Feuk 2006b). Zdedené delečné CNV môže byť patogénne, ak u pacienta odkryje recesívnu mutáciu na alele pochádzajúcej od druhého rodiča. Pri hodnotení kauzality CNV by sa mali zohľadniť aj technické limitácie metódy ako nízke rozlíšenie, ktoré neumožňuje presné určenie dĺžky

CNV. V niektorých prípadoch nemá zdedené CNV u pacienta a rodiča úplne zhodnú veľkosť a až dôkladnejšia analýza odhalí iné umiestnenie zlomov, ktoré môže vysvetliť rozdiel vo fenotype medzi pacientom a rodičom (Lee 2007).

Tabuľka 3: Posudzované kritéria pri hodnotení patogenity CNV (upravené podľa Miller 2010).

Hlavné kritéria		CNV je pravdepodobne	
		patogénne	benígne
1.	a.		X
	b.	X	
	c.	X	
2.	a.		X
	b.	X	
3.	a.		X
	b.	X	
4.		X	
5.	a.	X	
	b.		X
Vedľajšie kritéria			
1.	a.	X	
	b.	X	
2.	a.		X
	b.	X	
3.		X	
4.			X

Pre ďalšie posúdenie patogenity CNV je overovaná jeho prítomnosť v databázach CNV a v publikáciách. Nález podobného CNV asociovaného s obdobným fenotypom, aký je pozorovaný u pacienta, v databáze patogénnych CNV ako DECIPHER, ECARUCA či ISCA konzorcium, pravdepodobne svedčí o jeho patogenite. Je nutné zvážiť kvalitu publikácie, technické prevedenie, rozlišovaciu schopnosť, riziko falošnej pozitivity, použitie kontrolnej populácie a nezávislé potvrdenie nálezu. Ďalším dôležitým faktorom je dĺžka CNV, ktorá by nemala byť signifikantne dlhšia ani kratšia ako u CNV, s ktorými sa porovnáva. Ak skúmané CNV nebolo zatiaľ asociované s patologickým fenotypom, prehľadávanie Databázy genómových variant (DGV) môže odhaliť opakovaný výskyt tohto CNV u zdravých jedincov, na základe čoho ho môžeme kategorizovať ako benígne. Najvhodnejšie je porovnávať CNV pacienta s kontrolným súborom rovnakého etnika vyšetrovaného rovnakým typom arraye.

V prípade, že CNV nebolo pozorované u iných pacientov ani u zdravých jedincov, ide o CNV s neznámou klinickou signifikanciou a je nutné zvažovať ďalšie kritéria ako typ aberácie, jej dĺžku, počet kópií v ktorých sa CNV vyskytuje, či jeho génový obsah.

Duplikácia a delécia toho istého génu môže viesť k inému fenotypovému prejavu, preto je vždy nutné hodnotiť delécie a duplikácie v rovnakom úseku génomu zvlášť. Všeobecne sa duplikácie považujú za lepšie tolerované genetické zmeny ako delécie (Brewer 1999). Delécie jednej kópie sú však bežne pozorované aj u zdravých jedincov. Až 740 kb dlhý úsek DNA môže byť u ľudí prítomný len v jednej kópii bez patologického fenotypového prejavu, a priemerná dĺžka autozomálnych CNV prítomných v jednej kópii u zdravej populácie je ~15-20 kb (Conrad 2006). Delečné CNV jednej kópie môže byť benígne, ale homozygotná delécia môže viesť ku klinicky rozpoznateľnému fenotypu. Interpretácia rôznych CNV rovnakého úseku je teda značne náročná. CNV bežne duplikované u zdravých jedincov môže byť v haploidnej konfigurácii patogénne. Podobne CNV vyskytujúce sa bežne v žiadnej, jednej alebo v dvoch kópiách už nemusí byť tolerované, ak jeho množstvo vzrastie na viac než dve kópie na bunku (Lee 2007).

Dôležitá je aj dĺžka a génový obsah CNV. Klinicky relevantné, patogénne CNV sú v porovnaní s benígnymi obvykle dlhšie, s mediánom dĺžky 2,76 Mb oproti mediánu dĺžky 0,43 Mb u benígnych CNV (de Vries 2005). Spoľahlivejším indikátorom klinickej signifikancie je množstvo a typ génov v CNV. Rozsiahle CNV zahrňuje gény citlivé na dávku s väčšou pravdepodobnosťou, avšak rovnako môže zasiahnuť oblasť chudobnú na gény či nekódujúcu DNA, a takéto CNV je v organizme dobre tolerované. Okrem samotných génov môžu byť zasiahnuté aj regulačné sekvencie. Tie môžu byť vzdialené až 6 Mb od génu, ktorého transkripciu ovplyvňujú (Stranger 2007), čo takisto sťažuje interpretáciu CNV.

Všetky tieto faktory zohľadnil Riggs (2011) a zostavil zatiaľ najnovší a najpodrobnejší postup pre určovanie klinickej signifikancie CNV. Vytvoril 5 kategórií pre úroveň dôkazov svedčiacich o vplyve génovej dávky na fenotyp.

Prvá kategória zahrňuje CNV haploinsuficientných či triplosenzitívnych génomových úsekov s dostatočným dôkazom pre vplyv na fenotyp. Tieto CNV sa preto klinicky interpretujú ako patogénne. Dostatočný dôkaz predstavujú CNV týchto regiónov u najmenej 3 nezávislých jedincov s obdobným, dobre charakterizovaným fenotypom. CNV musia byť popísané v najmenej dvoch publikáciách. V prípade popisu iba v jedinej publikácii je nutná ďalšia podpora napr. nepublikovaní pacienti v rôznych databázach. Takéto CNV by nemali byť prítomné u normálnej populácie. Ak sa však vyskytujú aj u normálnej populácie, musí byť dobre zdokumentovaná ich neúplná penetrancia a/alebo variabilná expresivita.

Druhá kategória zahrňuje CNV so zatiaľ neúplným dôkazom pre vplyv na fenotyp. Interpretujú sa ako pravdepodobne patogénne alebo s nejasnou signifikanciou. CNV týchto regiónov musia byť prítomné najmenej u 2 nepríbuzných pacientov s podobným fenotypom.

CNV môžu byť zdedené od zdravých rodičov. Je sem možné zaradiť aj CNV odhalené s vyššou frekvenciou v rozsiahlych case-control štúdiách avšak bez presne definovaného fenotypu.

Tretia kategória zahŕňa genómové úseky s nedostatočným dôkazom pre vplyv génovej dávky na fenotyp. Ich CNV sa klinicky interpretujú ako nejasné. Do tejto kategórie spadajú regióny, u ktorých bolo popísané len jediné delečné či duplikačné CNV alebo aj CNV odhalené s vyššou frekvenciou v case-control štúdiách, bez definovaného fenotypu.

Štvrtá kategória je tvorená CNV v genómových úsekoch bez akéhokoľvek dôkazu podporujúceho vplyv génovej dávky na klinický fenotyp. Tieto CNV sa preto klinicky interpretujú ako nejasné alebo pravdepodobne benígne.

Do piatej kategórie patria CNV v úsekoch, v ktorých je vplyv génovej dávky nepravdepodobný. Tieto CNV sa často vyskytujú v normálnej populácii a klinicky sa interpretujú ako pravdepodobne benígne alebo benígne.

## 1.6. Diagnostika a liečba MR

Moderná diagnostika MR je vždy medziodborová, preto v komplexnom algoritme diagnostiky MR majú svoje miesto vedľa psychiatrických a psychologických metód aj postupy neurologické, moderné zobrazovacie metódy, analýza porúch metabolizmu a ďalšie biochemické prístupy, a v neposlednom rade aj vyšetrenia genetické.

Diagnostika MR u detí začína zväčša rozpoznaním vývojového oneskorenia pediatrom. Ten sleduje hrubú a jemnú motoriku, vývoj reči, sebaobslužnosť a sociálne správanie. U detí mladších ako 5 rokov hovoríme o vývojovom oneskorení alebo o psychomotorickej retardácii, termín MR je používaný až u detí, u ktorých je možné spoľahlivo stanoviť hodnotu IQ (Moeschler a Shevell 2006). Špecialista psychológ stanovuje mieru mentálneho postihnutia, psychiatier možné pridružené mentálne poruchy. Klinický genetik zaznamenáva podrobnú osobnú (postnatálnu i prenatalnú) a rodinnú anamnézu, prevádza klinické vyšetrenie, indikuje vyšetrenie karyotypu, syndrómu fragilného chromozómu X, subtelomerických oblastí, prípadne iné ciele molekularno - genetické, metabolické či neurologické testy. S rozvojom nových genetických metód sú k dispozícii aj celogenómové vyšetrenia s vysokým rozlíšením ako sú arrayové metódy či NGS, avšak niektoré z nich sa prevádzajú zatiaľ len výskumne.

Včasná diagnostika poruchy umožňuje skoré zostavenie komplexného plánu terapeutických postupov pre daného pacienta zahrňujúce špeciálne vzdelávanie, jazykovú terapiu či terapiu správania. S MR sa spája aj obezita spôsobená obmedzenou fyzickou aktivitou. Existuje len veľmi málo programov zameraných na zdravý životný štýl týchto

pacientov (Bazzano 2009). Pre ľudí s poruchou kognitívnych funkcií neexistuje žiadna špeciálna farmakologická liečba (Rueda a Schmitter-Edgecombe 2009). Predpisované liečivá sú zamerané na zmiernenie pridružených psychiatrických ochorení či porúch správania. Dôležitým aspektom liečby je aj zmiernovanie bolesti, hlavne u pacientov s hlbokou a ťažkou formou MR, dôsledky ktorej sa prejavujú ako plač, krik, grimasy, ochranné pozície ako fetálna poloha či zastrasovanie, pohojdávanie sa a agresivita.

Vo vyspelých krajinách dnes fungujú veľmi efektívne opatrenia proti špecifickým príčinám MR, vďaka ktorým sa znižuje výskyt negeneticky podmienenej MR. Tieto opatrenia zahŕňujú prevenciu kongenitálnej hypotyreózy používaním jodizovanej soli, podávanie kyseliny listovej počas tehotenstva pre zníženie frekvencie neurologických defektov a zavedenie očkovania proti rubeole, čiernemu kašľu a ovčím kiahňam. Zlepšenie tehotenskej starostlivosti a pôrodnickej praxe prispelo nemalou mierou k významnému zníženiu perinatálnej hypoxie a tiež prenosu infekčných ochorení, ktoré môžu spôsobiť poškodenie mozgu. Potlačenie niektorých príčin vzniku MR je ale značne komplikovanejšie, napríklad odstránenie kultúrnej deprivácie, podvýživy, chudoby či zlepšenie zdravotnej starostlivosti. Osvetou je možné bojovať proti konsanguinite a užívaniu alkoholu či drog počas tehotenstva.

MR je hlavným socio-ekonomickým problémom zdravotnej starostlivosti, ale v porovnaní s autizmom a schizofréniou sa jej dostáva len málo záujmu verejnosti. Samotní odborníci, nevládne organizácie či rodičovské združenia nevnímajú MR ako zdravotný stav, ale skôr ako sociálny a vzdelávací problém. Kvôli nevyhnutnej stálej starostlivosti je MR najnákladnejšia spomedzi diagnóz zaradených v MKCH-10, prevyšuje aj náklady na liečbu demencie či dokonca rakoviny.

## 2. Ciele práce

Predmetom práce bola celogenómová analýza ziskov a strát genetického materiálu v súbore českých pacientov s rôznymi formami MR a snaha o čo naj dôkladnejšiu bioinformatickú analýzu zistených genetických zmien pre určenie ich pravdepodobného klinického významu. Hlavným cieľom práce bolo identifikovať s použitím molekulárne cytogenetických, molekulárne genetických a bioinformatických metód CNV potenciálne podmieňujúce vznik MR u našich pacientov a porovnať naše nálezy s už publikovanými kohortami pacientov. Vo vytipovaných úsekoch boli podrobne posúdené všetky potenciálne kandidátne gény a možné mechanizmy ich deregulácie (zmena génovej dávky, prerušenie génu atď.). Dôkladná genetická analýza našich pacientov tak môže prispieť k pochopeniu etiológie MR ako aj k pochopeniu mechanizmov, ktorými submikroskopické aberácie vznikajú. Práca bola súčasťou európskeho projektu Improving Diagnoses of Mental Retardation in Children in Eastern Europe and Central Asia through Genetic Characterization and Bioinformatics/Statistics (CHERISH), v ktorom bolo naše pracovisko jedným z partnerov.

Čiastkovými cieľmi našej práce, ktoré sú opísané v tejto dizertačnej práci, bolo:

1) Vypracovanie optimálneho algoritmu laboratórnych a bioinformatických analýz postaveného primárne na vyšetrení pomocou SNP arrayí a na voľne dostupných bioinformatických nástrojoch a databázach, ktorý umožní efektívnu identifikáciu CNV a posúdenie ich kauzality pre postihnutie u pacientov s MR.

2) Identifikácia CNV už skôr asociovaných s MR a ďalšie detailné štúdium týchto prípadov pre zlepšenie všeobecnej znalosti daného, zvyčajne veľmi vzácného syndrómu (korelácia genotyp - fenotyp, fenotypové spektrum, intra- a inter - familiálna variabilita, penetrancia, expresivita, zúženie kritickej oblasti syndrómu, interakcia viacerých defektov (viaczásahový model), populačné štruktúrne varianty predisponujúce ku vzniku aberácie).

3) Identifikácia a analýza CNV, ktoré doteraz neboli u MR popísané alebo nemohli byť v predchádzajúcich štúdiách jasne interpretované, a ktoré môžu ukázať na nové prestavby a gény hrajúce úlohu v rozvoji MR, alebo u ktorých môže identifikácia ďalších pacientov podporiť ich úlohu pri vzniku MR.

4) Porovnanie nálezov v našom súbore s nálezmi v publikovaných súboroch pacientov s MR s ohľadom na frekvenciu záchytu (výťažnosť vyšetrenia) a spektrum nálezov.

### 3. Materiál a metódy

#### 3.1. Pacienti a kritéria k ich zaradeniu do súboru

Do štúdie celogenómovej analýzy CNV bolo zahrnutých 183 českých pacientov (123 chlapcov a 60 dievčat, priemerný vek 11 rokov) zo 172 rodín s MR. Prevažujúca časť pacientov bola indikovaná Oddelením klinickej genetiky ÚBLG 2. LF a FN Motol, ktoré sa dlhodobo zaoberá zberom a štúdiom pacientov s MR. Po podpísaní informovaného súhlasu (u detí zákonným zástupcom) k laboratórnemu genetickému vyšetreniu bola všetkým pacientom a väčšine ich rodičov odobraná periférna krv. Jeden alikvót bol použitý pre cytogenetické vyšetrenie. Z druhého alikvótu bola z krvných lymfocytov izolovaná DNA automaticky pomocou prístroja AutoGen Flex STAR extractor (AutoGen, Holliston, USA) s využitím kitu FlexiGene DNA AGF Kit (QIAGEN, Hilden, Nemecko). Vstupnými kritériami k zaradeniu pacientov do štúdie bola MR akéhokoľvek stupňa, normálny či zdanlivo balancovaný karyotyp (s výnimkou jednej pacientky cze047p, ktorá mala suspektnú inv dup del(3p)) a absencia expanzie v géne *FMRI* alebo iného známeho genetického defektu. Karyotypovanie s použitím štandardných postupov bolo prevedené na ÚBLG 2. LF UK a FN Motol (Drahuše Novotná). Analýza génu *FMRI* bola prevedená kitom Fragile X PCR (Abbott, North Chicago, USA) a následnou fragmentačnou analýzou na genetickom analyzátoe ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA) a nájdené expanzie boli nezávisle potvrdené metódou Southern blot. Vyšetrenia boli takisto prevedené na ÚBLG 2. LF UK a FN Motol (Zuzana Mušová). Všetky analýzy uvedené v ďalšom texte, u ktorých nie je uvedené meno žiadneho spolupracovníka, boli prevedené autorkou práce.

Vyšetrované rodiny boli označené skratkou cze a číslom, napr. cze001. Pacienti boli označení dodatočným písmenom p (cze001p), viacerí pacienti v rodine (najčastejšie súrodenci) pA či pB (cze001pA či cze001pB, nezávisle na poradí súrodencov). Rodičia boli označení nasledovne: matky písmenom m (cze001m), otcovia písmenom f (cze001f).

V celkovom počte 183 pacientov bolo aj šesť pacientov z piatich rodín (Tabuľka 4) s vopred známymi nálezmi. V týchto prípadoch bolo cieľom vyšetrenia pomocou SNP array spresniť rozsah týchto známych aberácií zachytených rôznymi metódami s nižším rozlíšením a tak prispieť ku klasifikácii ich kauzality.



Tabuľka 4: Prehľad pacientov s vopred známymi nálezmi.

pacient	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	pôvod aberácie	metóda detekcie
cze001p	del	8p subtel	mat	FISH
cze022p	del	10p subtel	<i>dn</i>	MLPA, FISH
cze043p	del	3p subtel	pat	MLPA
cze047p	inv dup del	3p	<i>dn</i>	karyotyp
cze054pA	del	17q21	<i>dn</i>	BAC CGH array
cze054pB	del	17q21	<i>dn</i>	BAC CGH array

## 3.2. Metódy

### 3.2.1. Analýza na SNP array a spracovanie primárnych dát

Celogenómová analýza CNV bola prevedená pomocou vysoko rozlišovacej SNP array HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina, San Diego, USA), umožňujúcej genotypovanie SNP ako aj odhad počtu kópií. Arraye majú pokrytie približne 300 tisíc prób na genóm (300 K, 1 próba/10 kb). Prvých 60 pacientov bolo autorkou vyšetrených počas jej stáže na Institute of Molecular and Cell Biology, Department of Biotechnology, University of Tartu, Estónsko. Ďalších 123 pacientov bolo vyšetrených v spolupráci s laboratóriom Gennet, Praha (Marie Trková, Věra Bečvářová). Analýzy genómovej DNA pacientov boli prevedené podľa pokynov výrobcu arraye. Všetky analýzy museli spĺňať podmienku > 98 % call rate (percentuálny podiel úspešnosti odčítania intenzity fluorescenčného signálu) a iba také boli ďalej analyzované.

Hrubé dáta intenzity fluorescencie získané skenovaním SNP arraye skenerom BeadStation 500 (Illumina) boli spracované programom GenomeStudio Genotyping Module (Illumina). Algoritmus spracovania sa vzťahuje k vnútorným kontrolám (200 vzoriek zo súboru HapMap, Illumina). Spracovanie dát z pohlavných chromozómov týmto programom má výrazné nedostatky a komplikuje ďalšiu analýzu. Na spracovaných dátach bola prevedená detekcia CNV dvoma nezávislými softvérmi, a to modulom GenomeStudio CNV Analysis (Illumina) (ďalej len GenomeStudio) a QuantiSNP (University of Oxford, Oxford, UK) (Colella 2007). Tieto programy využívajú rôzne algoritmy a spracovávajú informácie ako o intenzite fluorescencie daného SNP (Log R Ratio, LRR), tak aj o genotype (B Allele Frequency, BAF). Za aberáciu bola v programe GenomeStudio považovaná rovnaká zmena LRR minimálne u 3 susediacich prób, čo predstavuje najcitlivejšie nastavenie softvéru. Výstupom programu GenomeStudio sú informácie o začiatku a konci aberácie, jej veľkosti, povahe a koeficient spoľahlivosti výskytu daného CNV, tzv. skóre (CNV confidence). Výška skóre nadobúda podľa veľkosti daného CNV a množstva zahrnutých prób hodnoty od 0 až po

tisíce. K následnej analýze sme postúpili všetky CNV s hodnotou skóre nad 35, ktorá je doporučeným nastavením softvéru. GenomeStudio umožňuje zobrazovať dáta v tabuľkovej ako aj grafickej podobe. Program QuantiSNP analyzuje CNV na základe skrytých Markovových modelov a taktiež poskytuje údaje o začiatku a konci aberácie, jej veľkosti, povahe a množstve SNP zahrnutých v aberácii. Má vlastný koeficient spoľahlivosti výskytu CNV, ktorý nadobúda hodnoty od 0 až po stovky. K následnej analýze sme postúpili všetky CNV s hodnotou skóre nad 10. Všetky koordináty našich výsledkov odpovedajú verzii ľudského genómu hg18 (NCBI36).

### 3.2.2. Bioinformatická analýza výsledkov SNP array

Získané výsledky primárnej analýzy boli podrobené dôkladnej bioinformatickej analýze, ktorej cieľom bolo posúdenie kauzality aberácií pre rozvoj MR. Analyzované boli všetky aberácie, bez ohľadu nato, či boli zachytené oboma programami alebo len jedným z nich. Všetky aberácie na pohlavných chromozómoch boli manuálne overené na grafoch LRR a BAF. Identifikácia variant, ktoré sú bežné v normálnej populácii a s MR pravdepodobne žiadny súvis nemajú, bola založená na porovnaní s databázami variant nájdených v rozličných súboroch normálnych kontrol. Jednou z nich bola databáza variant získaných analýzou 94 zdravých jedincov z českej populácie v rámci medzinárodného projektu skúmajúceho genetickú variabilitu v Európe (Nelis 2010). Nami získané varianty boli porovnávané taktiež so CNV zdravých jedincov zhromaždenými v databáze DGV (Database of Genomic Variants <http://projects.tcag.ca/variation>). Veľké súbory normálnych jedincov boli analyzované aj v projekte 1000 Genomes Project (Durbin 2010) a vo dvoch veľkých publikovaných štúdiách CNV u pacientov s MR (Kaminsky 2011, 15 749 pacientov a 10 118 kontrol, Cooper 2011, 15 767 pacientov a 8 329 kontrol).

Možné asociácie medzi CNV a konkrétnymi patologickými fenotypmi boli študované pomocou databáz obsahujúcich informácie o CNV spolu s klinickými údajmi o pacientoch (napr. DECIPHER <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomic/decipher/>) a so zoznamami aberácií a kandidátnych génov z publikácií a ich suplementárnych dát (Cooper 2011; Kaminsky 2011). K dispozícii nám boli aj údaje o CNV detegovaných u 350 pacientov s MR z ďalších národných súborov vyšetrených v rámci projektu CHERISH.

Funkcia génov zahrnutých v aberáciách bola zisťovaná pomocou databázy GeneCards (<http://genecards.org/>), ich možný podiel vo vytváraní patologického fenotypu v databázach ako OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) či PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Vzájomné génové interakcie boli skúmané s využitím databáz GeneMANIA

(<http://www.genemania.org/>) a String (<http://string-db.org/>). Pre prehľadné grafické porovnanie našich dát bola využívaná možnosť portálu UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) vkladať vlastné dáta užívateľov.

Pri rozhodovaní o patogenite CNV bolo prihlíadané aj na výsledky získané analýzou dát našich pacientov pomocou softvéru GeCCO (Genomic CNV Classification Objectively, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Holandsko) (Hehir-Kwa 2010). GeCCO je bioinformatický nástroj na klasifikovanie CNV a automatické odlišenie klinicky významných odchýlok u MR od benígnych variant. U každého CNV prehodnocuje štruktúrne a funkčné znaky daného regiónu zoradené v 13 kategóriách, z ktorých k najzásadnejším podľa autorov patrí množstvo LINE elementov či prítomnosť génov s myšími ortológmi, u ktorých ich knock-out vedie k rozvoju špecifických abnormalít nervového systému.

### 3.2.3. Metódy nezávislého overenia výsledkov SNP array a určenia pôvodu aberácie

#### 3.2.3.1. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) bola použitá k nezávislému overeniu výsledkov metódy SNP array a k určeniu pôvodu aberácie. FISH bola prevedená na preparátoch chromozómov s použitím komerčne dodávaných lokus-špecifických sond (Tabuľka 5) podľa pokynov výrobcov (BlueGnome, Cambridge, UK; Cytocell, Cambridge, UK). Signály boli hodnotené vo fluorescenčnom mikroskope Zeiss Axioimager Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Nemecko). Analýzy boli prevedené na ÚBLG 2. LF UK a FN Motol (Jana Drábová).

Tabuľka 5: Prehľad použitých sond FISH pre overenie výsledkov SNP array a určenie pôvodu aberácií.

vyšetovaná rodina	použitá sonda FISH	vyšetovaná rodina	použitá sonda FISH
cze004	RP11-101E7	cze075	RP11-143J24
cze013	RP11-65C21	cze086	RP11-145O15
cze017	RP11-760M1	cze089	RP4-736H5
	RP11-102D7	cze090	LPU016
cze020	RP11-156E8	cze096	RP11-3P22
cze033	RP11-416L21	cze108	RP11-89I4
cze053	RP11-59M22	cze110	RP11-147L13
cze056	RP11-279D17	cze139	RP11-146J19
cze060	RP11-39B6	cze140	RP11-145O15
	RP11-25H9	cze164	RP11-111H7
cze061	RP11-102N9	cze166	RP11-127P7
cze063	RP11-185G10	cze167	RP11-45M12
cze072	RP11-102N9	cze170	4qter
cze073	RP11-44A12		

### 3.2.3.2. Metóda MLPA s komerčne dostupnými kitmi

Ďalšou metódou nezávislého overenia nálezov zo SNP array a určenia pôvodu aberácie bola metóda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (Schouten 2002). Tabuľka 6 sumarizuje komerčne dostupné kity firmy MRC Holland (Amsterdam, Holandsko) použité v rámci štúdie podľa pokynov výrobcov. Produkty boli analyzované na genetickom analyzátore ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) podľa pokynov výrobcov. Vyhodnotenie elektroforetogramov bolo prevedené v programe GeneMapper (Applied Biosystems).

Tabuľka 6: Prehľad kitov MLPA použitých pre overenie výsledkov SNP array a určenie pôvodu aberácií.

vyšetovaná rodina	použitý kit MLPA	vyšetovaná rodina	použitý kit MLPA
cze002	P286A1	cze099	P297B1
cze025	P297B1	cze119	ME028B1
cze028	P182	cze124	P096
cze030	P324A1	cze137	P064B2
cze036	P070	cze140	P297B1
cze050	P379A1	cze158	P064B2
cze063	P181, P182		P096
cze066	P236	cze159	P379A1
cze075	P023B2		ME028B1
cze077	ME028B1	cze166	P064B2
cze078	P286A1		P096
cze087	P379A1	cze167	P182
cze094	P236	cze168	P080B1
cze098	P034	cze174	P064B2

### 3.2.3.3. Kvantitatívna fluorescenčná PCR

Ďalšou nezávislou metódou k overeniu výsledkov analýzy na SNP array a k zisteniu pôvodu aberácie bola kvantitatívna fluorescenčná PCR (QFPCR). Metóda bola aplikovaná na 16 rodín, ale z rôznych dôvodov (viď 4.4.3) bola úspešná iba u troch z nich (cze061, cze116 a cze158). Primery pre amplifikáciu PCR produktov boli navrhované v aberovaných úsekoch tak, aby tieto produkty obsahovali krátke tandemové repetície (STR, short tandem repeats) s čo najväčšou variabilitou, najmä di-, tri- i tetranukleotidové repeaty. Všetky použité PCR primery boli navrhnuté manuálne s podporou serveru UCSC Genome Browser. Ten umožňuje okrem iného identifikovať SNP alebo rozptýlené repetície, ktoré by mohli interferovať so správnou funkciou primerov, a simulovať *in silico* PCR, a tým overiť dĺžku PCR fragmentu, unikátnosť sekvencie primerov a súlad medzi teplotami nasadenia (annealingu) oboch primerov. Za účelom vizualizácie fragmentu bola DNA amplifikovaná s fluorescenčne značenými primermi (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR) alebo

s fluorescenčne značenými nukleotidami s využitím Atto488 PCR Labeling Kit (Jena Bioscience, Jena, Nemecko) podľa pokynov výrobcov v termocyklére iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Podmienky PCR, najmä annealingové teploty, sa líšili v závislosti na použítom páre primerov, vo všeobecnosti však reakcia prebiehala nasledovne: počiatočná denaturácia 95°C 5 min a potom (93°C 1 min, xx°C 1 min, 75°C 1 min) 33x a záverečná extenzia 75°C 7 min. Sekvencie všetkých primerov a podmienky PCR sú dostupné v elektronickej prílohe dizertačnej práce. Produkty značené pomocou fluorescenčne značených primerov neboli prečisťované, vnútorne značené produkty boli prečistené za pomoci QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). PCR produkty boli denaturované zmiešaním s deionizovaným formamidom Hi-Di (Applied Biosystems) a spolu s interným dĺžkovým štandardom GeneScan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems) boli analyzované pomocou kapilárnej elektroforézy v genetickom analyzátoe ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) podľa pokynov výrobcu. Vyhodnotenie elektroforetogramov bolo prevedené v programe GeneMapper (Applied Biosystems), pričom sa hodnotil počet peakov, ich relatívna výška a plocha a rodičovský pôvod fragmentov.

#### 3.2.3.4. Sekvenovanie DNA

K nezávislému overeniu výsledkov a k zisteniu prípadného rodičovského pôvodu či vzniku aberácie *de novo* bola u 5 rodín využitá aj metóda Sangerovho sekvenovania, z toho u troch rodín (cze051, cze063 a cze072) úspešne (vid' 4.4.4). Sekvenované boli PCR produkty obsahujúce vysoko polymorfne SNP obsiahnuté v rámci detegovaných aberácií. PCR primery boli navrhnuté manuálne s podporou UCSC Genome Browseru a PCR bola prevedená podobne ako v prípade fragmentačnej analýzy. Sekvencie všetkých primerov a podmienky PCR sú dostupné v elektronickej prílohe dizertačnej práce. PCR produkty boli purifikované systémom ExoSAP (Exonukleáza I + Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas, St. Leon-Rot, Nemecko) podľa odporúčania výrobcu. Sekvenovanie potom prebiehalo v reakcii v objeme 6 µl zloženej z: 10-200 ng templátovej DNA v závislosti na dĺžke analyzovaného PCR fragmentu, 2,5 pmol primeru a 2 µl sekvenačného kitu ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sekvenačná reakcia prebiehala v termocyklére TGradient (Biometra, Göttingen, Nemecko) za nasledujúcich podmienok: počiatočná denaturácia 96°C 1 min a potom (96°C 10 sek, 50°C 5 sek, 60°C 4 min) 25x. Produkt bol najskôr vyzrážaný pomocou roztoku 96 % etanolu a octanu sodného, potom sa peleta DNA prečistila 70% etanolom a po centrifugácii a úplnom vysušení sa k pelete pridalo 25 µl deionizovaného formamidu Hi-Di. Po úplnom rozpustení sa vzorky analyzovali pomocou

genetického analyzátoru ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) podľa pokynov výrobcu. Vyhodnotenie sekvenčných elektroforetogramov bolo prevedené v programe Sequence Analysis (Applied Biosystems).

### 3.2.3.5. Analýza DNA rodičov pomocou SNP array

Ďalšou metódou k overeniu výsledkov a hlavne k zisteniu pôvodu aberácie bolo vyšetrenie niektorých rodičov pacientov (Tabuľka 7) na rovnakom type SNP array (HumanCytoSNP-12 BeadChips) ako u pacienta. V prípade dostupnosti vyšetrovacieho materiálu a súhlasu s vyšetrením bola vyšetrená genómová DNA oboch rodičov. V niektorých prípadoch mohol byť vyšetrený iba jeden rodič. Všetky analýzy boli prevedené v spolupráci s laboratóriom Gennet, Praha (Marie Trková, Věra Bečvářová). Hrubé dáta boli analyzované takisto ako u pacientov.

Tabuľka 7: Prehľad rodičov vyšetrených metódou SNP array.

rodina	vyšetrená matka	vyšetrený otec	rodina	vyšetrená matka	vyšetrený otec
cze002	+	-	cze079	+	+
cze010	+	-	cze088	+	-
cze014	+	-	cze099	+	+
cze017	+	+	cze110	+	+
cze033	+	+	cze116	+	-
cze036	+	+	cze126	+	+
cze065	+	-	cze159	+	+
cze077	+	+			

### 3.2.3.6. Analýza DNA pacienta pomocou SNP array s vyšším rozlíšením (700 K)

K nezávislému overeniu výsledkov metódy SNP array bol u 5 pacientov s veľkým množstvom aberácií s nízkym skóre (cze069p, cze100p, cze104p, cze153p a cze165p) použitý iný druh SNP array (HumanOmniExpress, Illumina) s vyššou rozlišovacou schopnosťou (700 K). Všetky analýzy boli prevedené na KDHO 2. LF a FN Motol (Markéta Kubričanová Žaliová) podľa pokynov výrobcu. Detekcia CNV bola prevedená programom GenomeStudio.

### 3.2.3.7. Metóda MLPA s vlastnými syntetickými próbami

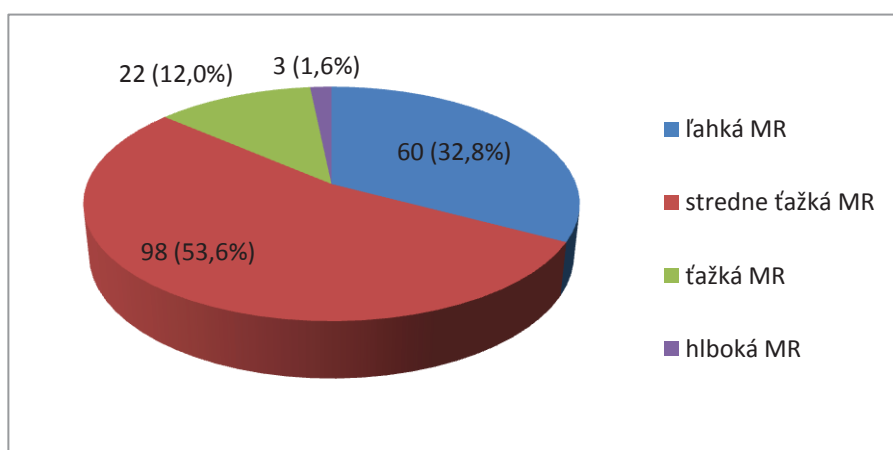
Okrem využitia komerčne dostupných kitov MLPA existuje možnosť navrhnuť vlastné syntetické próby MLPA podľa odporúčaní firmy MRC Holland. Táto alternatíva bola využitá v 18 rodinách (Tabuľka 19). Jedinečnosť navrhovaných sekvencií bola opäť overovaná s podporou serveru UCSC Genome Browser. Próby boli preferenčne navrhované do exónových oblastí génov. Každá próba vyžadovala overenie teploty nasadania

hybridizujúcej sekvencie ( $T_m$ ) a percentuálneho zastúpenia GC báz, ktoré boli zisťované pomocou odporúčaného programu Raw probe (MRC Holland). K zisteniu prípadného utvárania sekundárnych štruktúr v rámci navrhutej próby bola použitá webová aplikácia Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>) (Zuker 2003). Ako interná kontrola správnosti behu reakcie slúžil komerčne dodávaný referenčný kit P200 (MRC Holland) obsahujúci 13 referenčných prób, z toho 2 pre pohlavné chromozómy. Samotný postup prevedenia reakcií MLPA bol vykonaný podľa pokynov výrobcov. Sekvencie všetkých použitých oligonukleotidov sú dostupné v elektronickej prílohe dizertačnej práce. Produkty boli analyzované na genetickom analyzátore ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) podľa pokynov výrobcov. Vyhodnotenie elektroforetogramov bolo prevedené v programe GeneMapper (Applied Biosystems).

## 4. Výsledky a diskusia

### 4.1. Charakteristika vyšetřovaného súboru

Celogenómová analýza pomocou SNP array bola prevedená u pacientov s MR, ktorí pochádzali zo 172 rodín z celkového počtu 177 rodín zaradených do projektu CHERISH (cze001-cze179, pričom rodina cze068 bola vyradená na vlastnú žiadosť rodičov v priebehu projektu a u pacienta z rodiny cze128 bol tesne pred analýzou pomocou SNP array diagnostikovaný Angelmanov syndróm, pre ktorý bola rodina následne taktiež vylúčená). Pacienti z rodín cze016, cze019, cze021, cze049 a cze057 zahrnutí v projekte CHERISH nie sú predmetom dizertačnej práce, keďže neboli vyšetrení metódou SNP array, ale rôznymi typmi array CGH. Príklady aplikácie metódy array CGH pri vyšetrení pacientov s vývojovým oneskorením sú opísané v priložených autorkiných publikáciách 1-3. V 172 rodinách vyšetřovaných pomocou SNP array bolo analyzovaných celkom 183 pacientov. V jednej rodine (cze054) boli vyšetřené dvojčičky a v ďalších 10 rodinách (cze006, cze010, cze024, cze055, cze061, cze077, cze081, cze140, cze149, cze168) boli vyšetření dvaja postihnutí príbuzní, najčastejšie súrodenecké dvojice. O familiárny výskyt MR sa jednalo celkom u 17 rodín, u 153 rodín šlo o sporadický výskyt MR. U dvoch rodín bola informácia o sporadickom či familiárnom výskyte MR nedostupná, pretože pacienti boli adoptovaní (cze124, cze171). V súbore vyšetřovaných pacientov bola diagnostikovaná MR všetkých stupňov, najčastejšou bola stredne ťažká MR (Graf 1). Častejší výskyt stredne ťažkej MR v našom súbore oproti populácii je dôsledkom výraznejšieho zastúpenia týchto ťažších prípadov medzi pacientmi Oddelenia klinickej genetiky. Syndrómová MR sa vyskytovala v 91 rodinách, nesyrónová bola diagnostikovaná u 81 rodín. K MR malo 37 pacientov pridružený autizmus, častá bola taktiež faciálna stigmatizácia, hypotónia, epilepsia, ADHD, mikrocefália či strabizmus.

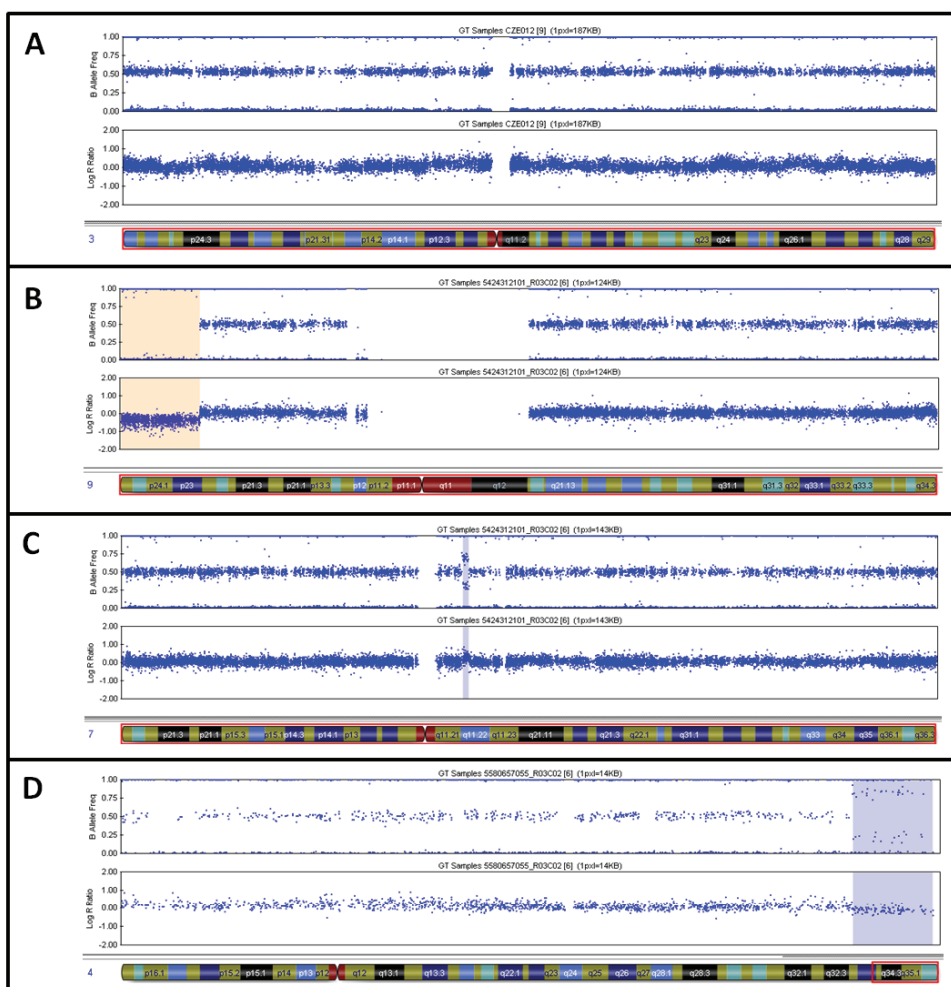


Graf 1: Rozloženie súboru 183 pacientov podľa stupňa MR.



## 4.2. Skríning CNV a algoritmy ich detekcie

Prvým krokom po spracovaní hrubých dát programom GenomeStudio Genotyping Module bola analýza primárnych dát, čiže prevedenie celogenómového skrínungu CNV pomocou programu GenomeStudio, ktorý označil CNV na základe analýz LRR a BAF u susediacich SNP. Ukážky grafického výstupu u aberácií zachytených v našom súbore ilustruje Obrázok 8. Obrázok 8 (A) zobrazuje normálny diploidný stav chromozómu. Delécie boli charakterizované poklesom LRR a absenciou heterozygotity v grafe BAF (Obrázok 8 (B)). Ukážku nami detegovanej duplikácie s viditeľným zvýšením LRR a hodnotami BAF okolo 0,33 a 0,66 predstavuje Obrázok 8 (C). V súbore našich pacientov bola zachytená aj heterozygotná delécia v 80 % mozaike (pokles LRR a súčasný neobvyklý posun BAF, frekvencia mozaicizmu potvrdená FISH) (Obrázok 8 (D)). Program GenomeStudio umožňuje aj tabuľkový výstup (Tabuľka 8), ktorý ponúka informácie o jednotlivých zachytených CNV.



Obrázok 8: Ukážka grafického výstupu z programu GenomeStudio. (A) normálny, diploidný stav, chromozóm 3 u pacienta cze012p, (B) delécia jednej kópie časti chromozómu 9 u pacienta cze089p zvýraznená ružovo, (C) duplikácia jednej kópie časti chromozómu 7 u pacienta cze089p zvýraznená modro, (D) delécia jednej kópie časti chromozómu 4 u pacienta cze170p v 80 % mozaike zvýraznená modro.

Okrem tohto základného a rutinne používaného programu GenomeStudio sme sa rozhodli pre zvýšenie záchytu a špecifity detekcie CNV použiť k skríningu CNV paralelne i program QuantiSNP a výsledky oboch algoritmov porovnať. Program QuantiSNP spracováva hodnoty LRR a BAF u susediacich SNP iným algoritmom, ale jeho výstupom je podobný tabuľkový prehľad nájdených CNV (Tabuľka 9).

Tabuľka 8: Ukážka tabuľkového výstupu z programu GenomeStudio. V stĺpci Comment, je skóre, ktoré udáva hodnotu koeficientu spoľahlivosti výskytu daného CNV.

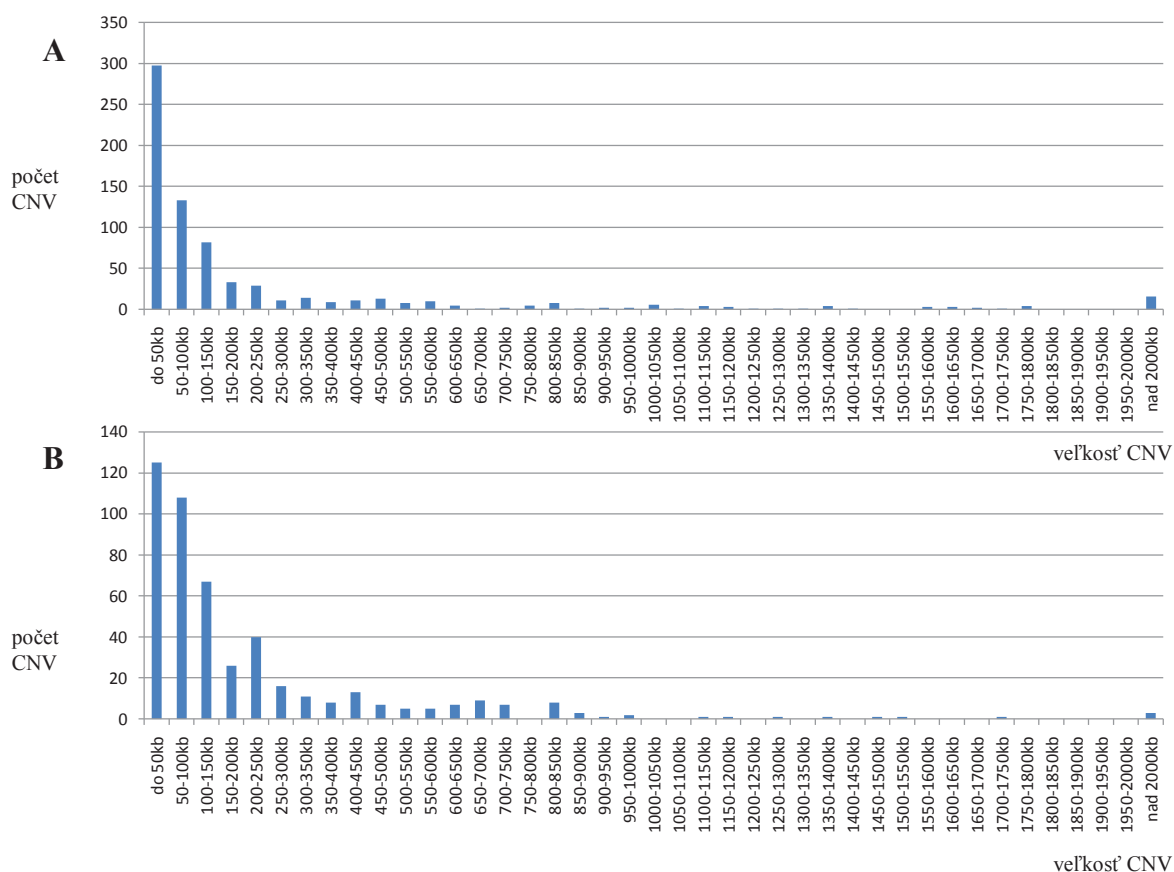
SampleID	Chr	Start	End	Size	Value	Comment
cze176p	6	168 031 952	168 323 543	291 591	3	217.1037
cze176p	8	137 799 462	137 919 193	119 731	1	46.18495

Tabuľka 9: Ukážka tabuľkového výstupu z programu QuantiSNP. V stĺpci Max Log BF (Log Bayes Factor of most probable copy number state) je skóre, ktoré udáva hodnotu koeficientu spoľahlivosti výskytu daného CNV.

Sample Name	Chr.	Start Position (bp)	End Position (bp)	Start Probe ID	End Probe ID	Length (bp)	No. Probes	Copy Number	Max. Log BF
cze176p	6	168 078 901	168 324 211	rs3800531	rs9455968	245311	57	3	121.118
cze176p	7	61 856 562	61 880 031	rs7293650	rs4628157	23470	6	1	19.9213
cze176p	8	137 799 462	137 919 193	rs2577047	rs16906415	119732	20	1	40.7722
cze176p	11	51 048 278	51 078 071	rs7294245	rs8189290	29794	6	1	17.8749
cze176p	15	19 788 917	20 063 682	rs2808159	rs35718158	274766	18	3	23.3327
cze176p	16	33 680 589	33 704 396	rs2519297	rs9930213	23808	3	0	10.6295
cze176p	16	34 307 201	34 359 021	rs1684568	rs7204396	51821	9	3	10.9507
cze176p	19	48 064 226	48 285 261	rs1064491	rs10426895	221036	7	1	14.5868

Prevedením celogenómovej analýzy u 183 pacientov a analýzou týmito dvoma nezávislými algoritmi bolo celkovo detegovaných 1207 aberácií. Je treba mať na pamäti, že v tomto počte sú zahrnuté aj falošne pozitívne nálezy, teda reálne neexistujúce aberácie. Program GenomeStudio zachytil pri svojom najcitlivejšom nastavení 394 aberácií, program QuantiSNP 1137. Oboma algoritmi súčasne bolo identifikovaných 324 aberácií. Celkovo bolo zachytených 658 delécií a 415 duplikácií spolu s 71 homozygotnými deléciami a 63 amplifikáciami (4 a viac kópií, softvér nie je schopný určiť ich presný počet). V priemere bol každý vyšetovaný pacient nosičom 6,6 CNV. Rozloženie veľkostí všetkých zachytených CNV zaznamenáva Graf 2. Odlišný algoritmus analýzy používaný dvoma programami pre skrínung CNV niekedy spôsoboval, že zlomy u CNV zachytených oboma softvéri boli mierne odlišné. Program QuantiSNP tiež niekedy rozdelil CNV, detegované programom GenomeStudio ako jednu aberáciu, na niekoľko menších. V týchto prípadoch bola dôležitá manuálna inšpekcia grafov LRR a BAF. Pri nezávislom overovaní aberácií bol v zhode

s očakávaním medzi CNV zachytenými cilivejším nastavením programu QuantiSNP nájdený vyšší podiel falošne pozitívnych nálezov, najmä medzi aberáciami menšieho rozsahu. Na druhú stranu sa ale potvrdila užitočnosť jeho nasadenia, pretože identifikoval aj niektoré CNV, ktoré programu GenomeStudio úplne unikli (viď 4.4.8).



Graf 2: Rozloženie nami zachytených CNV podľa veľkosti. (A) delécie a homozygotné delécie, (B) duplikácie a amplifikácie.

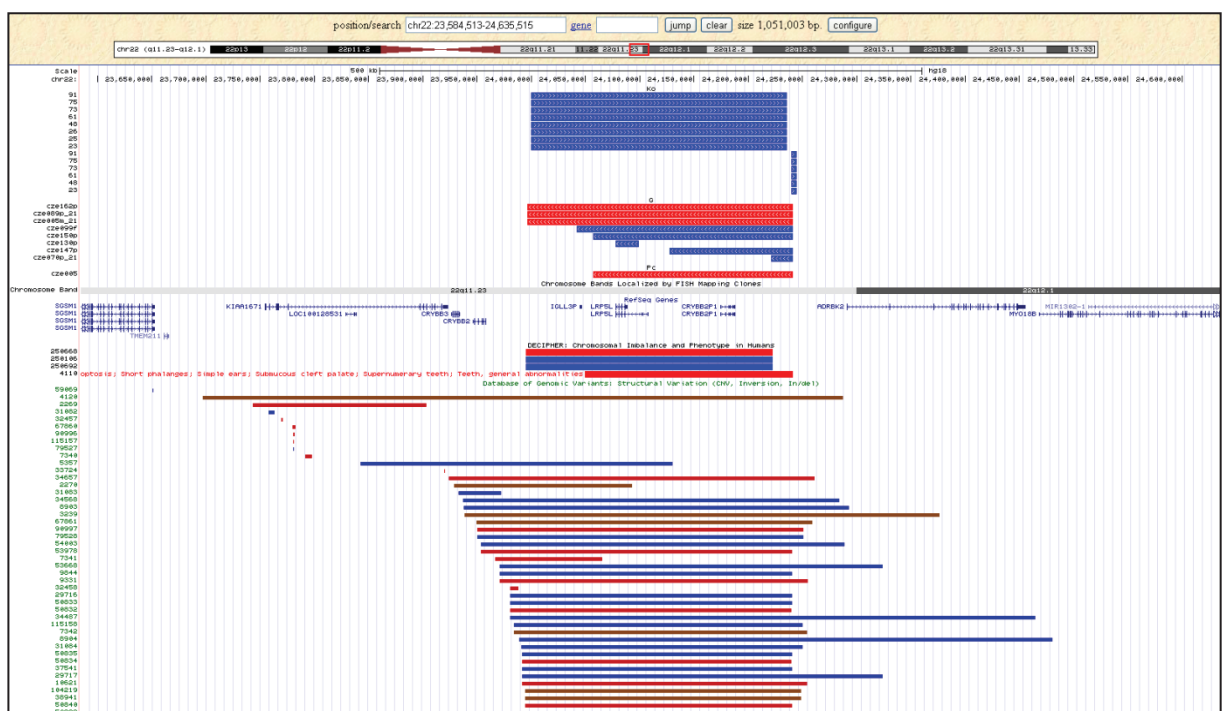
### 4.3. Predbežné hodnotenie kauzality CNV

#### 4.3.1. Vypracovanie postupu pre predbežné hodnotenie kauzality CNV

Súčasťou každej analýzy pomocou SNP array by malo byť nezávislé potvrdenie nálezov inou laboratórnou metódou. Bolo ale jasné, že obrovské celkové množstvo nájdených aberácií (1207) takýto postup u všetkých nálezov neumožňuje, a ani by to nebolo racionálne. Preto bolo ako ďalší krok vyhodnocovania výsledkov zaradené prvé kolo bioinformatickej analýzy. Cieľom tohto kroku bolo predovšetkým odfiltrovať pravdepodobne bezvýznamné nálezy, najmä bežné populačné CNV alebo artefakty, ktoré nebude potrebné ďalej podrobnejšie analyzovať. Na druhej strane bolo samozrejme možné zachytiť už na tejto úrovni známe

aberácie už asociované s MR. Výstupom predbežného hodnotenia kauzality CNV tak bola klasifikácia nálezov do jednej z troch kategórií: pravdepodobne bezvýznamné nálezy, známe patogénne CNV a nálezy vyžadujúce ďalšiu analýzu.

Pre uľahčenie tejto analýzy bolo potrebné dáta previesť do prehľadnejšej a ľahko hodnotiteľnej formy. Využili sme možnosť portálu UCSC Genome Browser vkladať vlastné dáta užívateľov. Po prevedení našich dát z tabuľkových výstupov programov GenomeStudio (Tabuľka 8) a QuantiSNP (Tabuľka 9) do formátu BED bolo možné tieto dáta prehľadne graficky zobrazit' a porovnávať s ďalšími súbormi dát v prostredí browseru (Obrázok 9). Súbor formátu BED obsahoval údaje o chromozóme nesúcom dané CNV, údaj o začiatku a konci CNV (v bp), označenie pacienta, skóre CNV, výstup programu GeCCO (+ pravdepodobne patogénne, - pravdepodobne benígne) a farebný kód CNV vo formáte RGB (červená pre delécie, modrá pre duplikácie a odtiene týchto farieb pre homozygotné delécie a amplifikácie).



Obrázok 9: Ukážka grafického zobrazenia bežného populačného polymorfizmu v prostredí UCSC Genome Browseru. V smere zhora nadol viditeľné umiestnenie oblasti v rámci chromozómu, CNV u českých kontrol (Ko), CNV u našich vyšetovaných pacientov (G, Pc), chromozómový pruh, gény nachádzajúce sa v oblasti, výstupy z databázy DECIPHER (pacienti) a výstupy z databázy DGV (normálne kontroly). Delécie sú aj v databázach štandardne zobrazované červenou farbou, duplikácie modrou, zmena počtu kópií v neznámom smere (v DGV) hnedou.

Do tejto formy boli prevedené dáta všetkých našich pacientov, publikovaných českých kontrol, dostupných pacientov z ďalších národných súborov projektu CHERISH, ako aj

informácie zo suplementárnych dát niektorých publikácií. UCSC Genome Browser umožnil na vybranom úseku chromozómu zobrazit' okrem hore uvedených našich či nami spracovaných dát taktiež aj gény nachádzajúce sa v danej oblasti, informácie o popísaných aberáciách z DGV, ako aj databáze DECIPHER, spolu s ďalšími bežne nastaviteľnými možnosťami tohto portálu, ako sú SNP, STR, repetitívne elementy apod.

V tomto prvom kole bioinformatickej analýzy boli krok po kroku manuálne prechádzané všetky chromozómové oblasti obsahujúce CNV u našich pacientov a s prihliadnutím na dostupné informácie boli nálezy klasifikované do jednej z troch vyššie uvedených kategórií. Tento postup vyhodnocovania bol čiastočne subjektívny. Pri hodnotení každého CNV boli brané do úvahy doporučené obecné kritériá pre hodnotenie patogenity CNV (viď 1.5.5) ako aj špecifická situácia v danej chromozómovej oblasti (napr. množstvo CNV, ktoré sa prekrývali s našimi, ako aj rozsah prekrytia).

Nálezy nachádzané opakovane aj medzi kontrolami z českej populácie či v DGV (rovnakej povahy - delécie/duplikácie) svedčali o prítomnosti bežných populačných variant. Tieto variabilné oblasti zahŕňali väčšinou delečné aj duplikačné CNV. Ak ale boli v oblasti v databázach prítomné iba napr. duplikačné CNV a náš pacient bol ako jediný nositeľom delécie, takáto aberácia nebola medzi pravdepodobne bezvýznamné nálezy zaradená. U väčšieho množstva pacientov boli taktiež opakovane zachytené zhodné nálezy vo vysoko repetitívnych oblastiach v okolí centromér niektorých chromozómov, vyskytujúce sa aj v iných štúdiách používajúcich identický typ arraye, a usúdili sme teda, že ide o artefakty metódy. Medzi pravdepodobne bezvýznamné nálezy boli zaradené aj CNV, ktoré neobsahovali žiadne gény, či CNV hlboko v intrónoch génov. V týchto oblastiach sa môžu vyskytovať dôležité regulačné oblasti, avšak v súčasnej dobe nie sú dostupné prostriedky pre ich analýzu. CNV, ktoré boli v rámci tohto kola bioinformatickej analýzy klasifikované ako pravdepodobne bezvýznamné nálezy, neboli už ďalej potvrdzované a analyzované. Pacienti, ktorí mali iba tieto nálezy, už neboli ďalej vyšetrovaní a znamenalo to pre nich záver vyšetrenia s negatívnym výsledkom, s ohľadom na rozlíšenie metódy a súčasné znalosti.

Pri rozhodovaní o patogenite CNV bol využívaný aj softvér GeCCO, ktorý by mal automaticky odlišit' klinicky významné odchýlky od benígnych variant (Tabuľka 10). Aberáciám označeným týmto programom ako patogénne bola síce venovaná zvýšená pozornosť, ale celkovo sa tento program príliš neosvedčil. Nebol schopný rozoznať niektoré z jasne patogénnych CNV už asociovaných s MR, v iných prípadoch označil za patogénne bežné populačné polymorfizmy, či vyhodnotil prakticky rovnaké CNV u dvoch rôznych pacientov u jedného ako klinicky významnú odchýlku, u druhého ako benígnu variantu.

Tabuľka 10: Ukážka výstupu z programu GeCCO. Odhad patogenity CNV programom je v poslednom stĺpci - MR. Seg Dup – segmentálne duplikácie, In Pathway – áno v prípade, že CNV obsahuje gén z databáze KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), In Phenotypes – áno v prípade, že CNV obsahuje gén s myšim ortológom, ktorý pri knock-oute spôsobuje poruchu CNS, Expression Gene – stabilita expresie génov prítomných v CNV, KA – nesynonymné substitúcie, KS – synonymné substitúcie, KAKS – pomer nesynonymných a synonymných substitúcií.

CNV id	ChrNr	StartPos	EndPos	Length	Sort	Number of LINE	LINE Density	Number of SINE	SINE Density	Number of Seg Dup
1	chr8	95870045	95878341	8297	GAIN	6	0.072315	6	0.072315	1
2	chr8	122891053	122901615	10563	LOSS	3	0.028401	6	0.056802	0
3	chr1	142655719	142719199	63481	LOSS	38	0.05986	46	0.072463	3
4	chr1	147305744	147453403	147660	LOSS	67	0.045375	51	0.034539	51

CNV id	Seg Dup Density	Number of Genes	Gene Density	In Pathway	In Phenotypes	Expression Genes	Evolution KA	Evolution KS	Evolution KAKS	MR
1	0.012053	1	0.012053	no	no	0.408597	0	0	0	No
2	0	0	0	no	no	?	?	?	?	Yes
3	0.004726	1	0.001575	no	no	0	0	0	0	Yes
4	0.034539	0	0	no	no	?	?	?	?	No

Naopak nález CNV dobre odpovedajúceho dĺžkou a umiestnením na chromozóme už známym patogénnym CNV, najmä keď bolo u nášho pacienta asociované s obdobným fenotypom, ako bol popísaný u iných nosičov týchto CNV, svedčal o jeho patogenite. Pre zaradenie CNV medzi patogénne ho bolo dôležité nájsť v databázach zhromažďujúcich patogénne CNV (DECIPHER, ISCA), v dátach z rozsiahlych súborov pacientov s MR, či v literatúre opisujúcej jednotlivé kazuistiky alebo v ďalších zdrojoch.

#### 4.3.2. Príklad postupu predbežného hodnotenia kauzality CNV u vybraného pacienta

Úplný postup vyhodnotenia je popísaný na príklade pacienta cze075p. CNV zachytené programami GenomeStudio a QuantiSNP a posúdené pomocou programu GeCCO zobrazuje Tabuľka 11. Niektoré nálezy (na chromozómoch 1, 7 a 10) boli zachytené iba programom QuantiSNP a môžu byť falošnými pozitivitami. U jedného nálezu identifikovali oba algoritmy mierne odlišné zlomy (aberácia na chromozóme 15) a jedno CNV program QuantiSNP pravdepodobne rozdelil na niekoľko menších (aberácia na chromozóme 22). Dáta boli prevedené do formátu BED a aberácie boli individuálne analyzované v prostredí UCSC Genome Browseru.

Tabuľka 11: Ukážka výsledkov primárnej analýzy CNV dvoma nezávislými programami GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS) u pacienta cze075p. Nález zacytený programom GenomeStudio sú zobrazené červeným písmom. Nález zacytený oboma algoritmi súčasne sú zvýraznené modrou farbou. Povaha aberácie 1 – delécia, 3 – duplikácia, G+ záver softvéru GeCCO svedčiaci pre súvis CNV s MR.

chr	začiatok aberácie	koniec aberácie	prvý SNP	posledný SNP	veľkosť aberácie (bp)	počet zahrnutých sond	povaha aberácie	nájdená programom	nami priradené číslo aberácie	skóre	GeCCO
1	1 200 826	1 237 357	rs6689813	rs12103	36 532	7	3	QS	1	15,28	-
7	71 680 977	71 951 080	rs4318932	rs13228725	270 104	18	3	QS	2	19,13	-
<b>7</b>	<b>89 394 100</b>	<b>89 528 689</b>			<b>134 589</b>		<b>1</b>	<b>GS</b>	<b>3</b>	<b>62,56</b>	<b>-</b>
7	89 394 100	89 528 689	rs4728843	rs12537087	134 590	20	1	QS	3	66,95	-
10	37 629 810	37 642 770	rs1926137	rs11011112	12 961	3	1	QS	4	11,59	G+
<b>14</b>	<b>19 283 777</b>	<b>19 490 411</b>			<b>206 634</b>		<b>3</b>	<b>GS</b>	<b>5</b>	<b>86,42</b>	<b>-</b>
14	19 283 777	19 490 411	rs17114296	rs2318495	206 635	13	3	QS	5	20,80	-
<b>15</b>	<b>26 849 239</b>	<b>28 443 879</b>			<b>1 594 640</b>		<b>1</b>	<b>GS</b>	<b>6</b>	<b>515,85</b>	<b>G+</b>
15	27 234 439	28 443 879	rs7174078	rs2604686	1 209 441	167	1	QS	6	414,70	G+
22	17 257 787	17 388 108	rs2543958	rs2871006	130 322	31	3	QS	7	27,96	-
<b>22</b>	<b>17 257 787</b>	<b>19 792 353</b>			<b>2 534 566</b>		<b>3</b>	<b>GS</b>	<b>7</b>	<b>1765,16</b>	<b>G+</b>
22	17 462 535	17 559 367	rs2525036	rs756651	96 833	24	3	QS	7	32,85	G+
22	17 589 682	17 748 723	rs2073756	rs5748165	159 042	29	3	QS	7	67,78	G+
22	17 800 959	17 965 836	rs12168943	rs5746795	164 878	42	3	QS	7	76,15	G+
22	18 023 245	19 601 462	rs1985884	rs5761353	1 578 218	238	3	QS	7	270,31	-
22	19 661 556	19 792 353	rs178271	rs140392	130 798	30	3	QS	7	56,92	-

Prvou zacytenou aberáciou u pacienta cze075p bola duplikácia 1p36.33. Táto aberácia je menšia a zachytil ju iba program QuantiSNP. V duplikovanom úseku sa síce vyskytujú 4 gény (*SCNN1D*, *ACAP3*, *PUSL1* a *CPSF3L*), ale aj časté CNV popísané v DGV v genómoch normálnych jedincov. Oblasť je zahrnutá v CNV aj u ďalších našich pacientov a kontrol. Preto je možné predpokladať, že ak táto duplikácia reálne existuje (má skóre iba 15,28), patrí medzi benigne CNV, ktoré sa v tejto vysoko polymorfnej oblasti bežne vyskytujú.

Na chromozóme 7 boli nájdené dve CNV. V duplikácii 7q11.22-q11.23 zachytenej iba programom QuantiSNP sa nachádza gén *TYWIB* a gén pre nekódujúcu RNA *SBDSP1*. Ľudský genóm obsahuje dva príbuzné gény s predpokladanou funkciou v syntéze wybutozínu (modifikovaného nukleotidu tRNA). Jedným z nich je *TYWIB*, ktorý je u niektorých jedincov inaktívovaný (pseudogén), zatiaľ čo u iných je stále funkčný (Noma a Suzuki 2006). Podľa DGV sa tu nachádza niekoľko CNV. Je teda pravdepodobné, že *TYWIB* nie je esenciálny, a táto duplikácia, ak reálne existuje, je polymorfizmus. V oblasti delécie 7q21.13 zachytenej oboma programami, nie sú žiadne gény. Vyskytujú sa tu rozsiahle CNV a na distálnej strane je blok segmentálnych duplikácií. Predpokladáme preto, že aj táto aberácia je polymorfizmus.

Delécia 10p11.21 zachytená iba programom QuantiSNP je takisto bez génov. V tejto oblasti priliehajúcej k centromére sa navyše vyskytujú časté CNV, takže aj v tomto prípade,

pokiaľ by delécia pri svojom nízkom skóre reálne existovala, by sa najskôr jednalo o populačný polymorfizmus. Program GeCCO síce toto CNV označil ako pravdepodobne podmieňujúce MR, avšak vzhľadom k absencii génov a tomu, že v súčasnej dobe nemáme prostriedky pre náročnú analýzu možných regulačných oblastí, bolo aj toto CNV klasifikované ako pravdepodobne bezvýznamný nález.

Duplikácia v oblasti 14q11.2 zachytená oboma programami zasahuje cluster génov pre čuchové receptory, ktoré sú veľmi polymorfné, a podľa očakávania sa tu vyskytuje veľké množstvo CNV, ako v DGV, tak aj medzi českými kontrolami. Rovnako ako všetky vyššie uvedené aberácie bola táto aberácia klasifikovaná ako pravdepodobne bezvýznamný nález a takisto bola vyradená z ďalšieho overovania a analýzy.

Naopak mikrodélécia 15q13.1 a mikroduplikácia 22q11.2, ktoré boli zachytené oboma programami, patria medzi známe patogénne aberácie podmieňujúce MR. Obe CNV preto boli overované nezávislou metódou (viď 4.4) a sú podrobne popísané spolu s ostatnými patogénnymi aberáciami (viď 4.6.2).

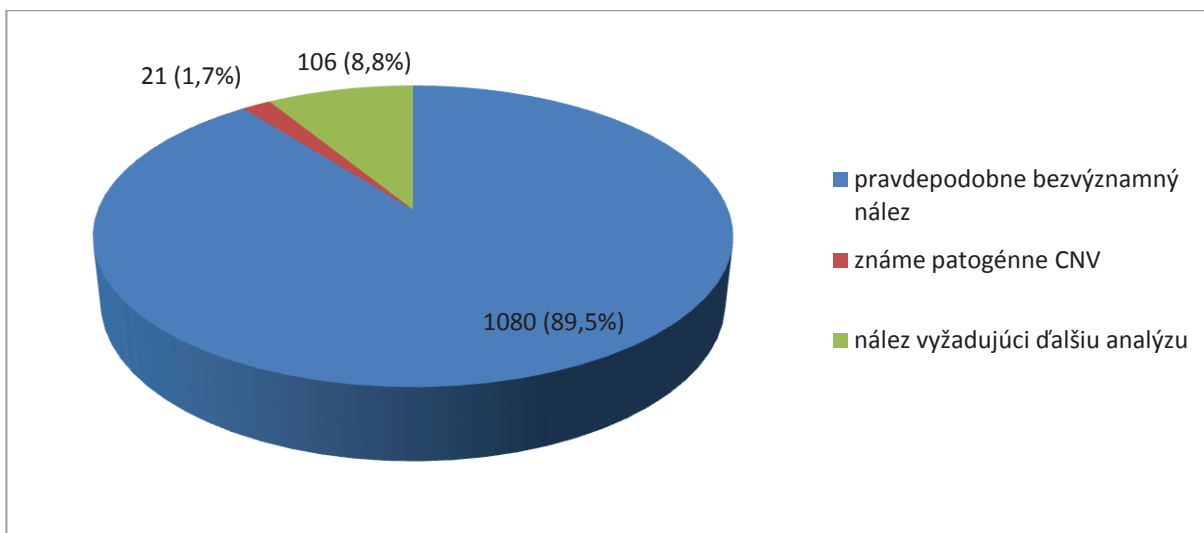
#### 4.3.3. Prehľad nálezov po predbežnom hodnotení kauzality

Výsledkom predbežného hodnotenia kauzality bola klasifikácia 1080 CNV ako pravdepodobne bezvýznamný nález, pričom každý z pacientov bol nositeľom minimálne jedného z nich. Tieto nálezy boli vylúčené z ďalšej analýzy. Celkovo 106 pacientov nieslo iba pravdepodobne bezvýznamné nálezy a ich vyšetrenie bolo v tejto fáze uzatvorené.

Známe kauzálne CNV podmieňujúce vznik MR boli naopak detegované u 20 pacientov. Jednalo sa o celkom 21 aberácií. U 12 pacientov sa jednalo o niektorý zo známych, už v literatúre popísaných syndrémov, u 5 pacientov CNV zahrňovalo známy gén asociovaný s MR a traja pacienti mali aberáciu veľmi veľkého rozsahu (väčšiu ako 8 Mb, viditeľnú bezprostredne (cze047p s inv dup del(3p)) alebo pri revízii na karyotype). Patogénne CNV boli ďalej nezávisle overované a bola testovaná ich prítomnosť u rodičov pacientov.

Po vylúčení pravdepodobne bezvýznamných a jasne patogénnych nálezov ostalo 106 CNV klasifikovaných ako vyžadujúce ďalšiu analýzu, ktoré sa vyskytovali u 60 pacientov (Graf 3). Aj všetky tieto nálezy boli ďalej overované nezávislou metódou a nanovo podrobne bioinformaticky analyzované, bola testovaná ich dedičnosť v rodine a bol opakovane skúmaný fenotyp pacientov a prípadných prenášajúcich rodičov. Traja pacienti boli nosičmi ako známeho patogénneho CNV, tak aj CNV vyžadujúceho ďalšiu analýzu. Prehľad fenotypu a počtu detegovaných CNV zaradených v jednotlivých kategóriách u všetkých pacientov nášho súboru ponúka Tabuľka 12.





Graf 3: Prehľad náleзов po predbežnom hodnotení kauzality. Väčšina náleзов bola vyhodnotená ako pravdepodobne bezvýznamná. Naopak spomedzi významných náleзов boli už na tejto úrovni identifikovateľné niektoré známe patogénne CNV.

Tabuľka 12: Prehľad fenotypu a detegovaných CNV zaradených v kategóriách u všetkých pacientov nášho súboru. L – ľahká MR, S – stredne ťažká MR, Ť – ťažká MR, H – hlboká MR, A – adopcia, farebne zvýraznení sú pacienti s vopred známym nálezom pred zaradením do súboru

pacient	pohlavie	stupen' MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					pravdepodobne bezvýznamný nález	známe patogénne CNV	nález vyžadujúci ďalšiu analýzu
cze001p	♂	S	+	+	8	1	
cze002p	♂	Ť	+	-	6		3
cze003p	♂	L	+	-	6		
cze004p	♀	S	+	-	7	1	
cze005p	♂	S	+	-	8		
cze006pA	♂	L	-	+	6		
cze006pB	♀	L	-	+	1		
cze007p	♂	S	+	-	6		
cze008p	♀	Ť	+	-	3		
cze009p	♂	L	-	-	5		
cze010pA	♂	S	-	+	10		
cze010pC	♀	L	-	+	10		1
cze011p	♀	S	+	-	6		
cze012p	♀	S	+	-	2		
cze013p	♂	S	+	-	7		1
cze014p	♀	S	-	+	5		1
cze015p	♀	S	-	-	8		
cze016p	vyšetovaný inou metódou než SNP array						

pacient	pohlavie	stupen' MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					pravdepodobne bezvýznamný nález	známe patogénne CNV	nález vyžadujúci ďalšiu analýzu
cze017p	♂	Ť	+	-	4		4
cze018p	♀	Ť	+	-	2		
cze019p	vyšetovaný inou metódou než SNP array						
cze020p	♂	S	+	-	4	1	
cze021p	vyšetovaný inou metódou než SNP array						
cze022p	♀	Ť	+	-	7	1	
cze023p	♀	S	-	-	6		
cze024pA	♂	S	+	+	6		
cze024pB	♂	L	+	+	3		
cze025p	♂	S	+	-	4	1	
cze026p	♂	Ť	+	-	5		
cze027p	♂	S	-	-	2		
cze028p	♂	S	+	-	5	1	
cze029p	♂	S	+	-	5		
cze030p	♂	L	-	-	5		1
cze031p	♀	L	+	-	8		
cze032p	♂	S	-	-	3		
cze033p	♀	S	+	-	4	1	

pacient	pohlavie	stupeň MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					pravdepodobne bezvýznamný nález	známe patogénne CNV	nález vyžadujúci ďalšiu analýzu
cze034p	♀	S	+	-	5		
cze035p	♀	S	+	-	6		
cze036p	♂	S	+	-	4		3
cze037p	♀	L	-	-	7		
cze038p	♂	L	-	-	7		
cze039p	♂	S	+	-	6		
cze040p	♂	L	+	-	6		
cze041p	♀	S	+	-	6		
cze042p	♀	L	+	-	6		
cze043p	♂	L	-	-	3		1
cze044p	♂	L	+	-	6		
cze045p	♀	Ď	-	-	2		
cze046p	♀	Ď	+	-	5		
cze047p	♀	Ď	+	-	5	1	
cze048p	♀	Ď	+	-	8		
cze049p	vyšetovaný inou metódou než SNP array						
cze050p	♂	S	+	-	7	1	
cze051p	♂	S	-	-	3		1
cze052p	♂	S	-	-	5		
cze053p	♀	S	+	-	6		1
cze054pA	♀	S	+	-	6	1	
cze054pB	♀	S	+	-	5	1	
cze055pA	♀	S	-	+	6		
cze055pB	♀	L	-	+	11		
cze056p	♂	Ď	+	-	9		1
cze057p	vyšetovaný inou metódou než SNP array						
cze058p	♂	S	-	-	4		
cze059p	♂	L	+	-	6		
cze060p	♂	S	-	-	5		2
cze061pA	♂	L	-	+	6		1
cze061pB	♂	L	-	+	7		2
cze062p	♀	L	-	-	5		
cze063p	♂	S	+	-	3		3
cze064p	♂	S	-	-	5		
cze065p	♂	S	-	-	6		1
cze066p	♂	S	-	-	9		1
cze067p	♂	S	+	-	5		
cze068p	vyradený zo súboru						
cze069p	♀	S	+	-	10		4
cze070p	♂	Ď	+	-	6		
cze071p	♀	L	+	-	5		
cze072p	♂	L	+	-	4		2
cze073p	♂	S	-	-	8		2

pacient	pohlavie	stupeň MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					pravdepodobne bezvýznamný nález	známe patogénne CNV	nález vyžadujúci ďalšiu analýzu
cze074p	♂	L	+	-	7		
cze075p	♂	S	+	-	5	2	
cze076p	♂	S	+	-	6		
cze077pA	♂	L	+	+	8		3
cze077pB	♀	L	+	+	4		1
cze078p	♂	L	-	-	2		1
cze079p	♂	S	+	-	3		2
cze080p	♂	S	-	-	2		
cze081pA	♂	S	+	+	3		
cze081pB	♂	S	+	+	7		
cze082p	♂	S	-	-	11		
cze083p	♂	S	-	-	2		1
cze084p	♂	S	-	-	3		
cze085p	♀	S	+	-	7		
cze086p	♀	S	+	+	6		1
cze087p	♂	L	-	-	6	1	
cze088p	♂	S	+	-	2		1
cze089p	♂	S	+	-	10	1	
cze090p	♂	S	+	-	6		1
cze091p	♂	S	+	-	14		1
cze092p	♂	S	+	-	5		
cze093p	♂	L	+	-	5		1
cze094p	♂	L	-	-	9		1
cze095p	♂	Ď	-	-	13		
cze096p	♂	S	-	-	5		1
cze097p	♀	L	+	-	6		
cze098p	♀	H	+	-	4		1
cze099p	♀	L	-	-	3	1	2
cze100p	♀	S	-	-	9		3
cze101p	♂	S	-	-	8		
cze102p	♂	S	-	-	4		
cze103p	♂	S	+	-	11		
cze104p	♂	S	+	-	9		5
cze105p	♀	L	+	-	3		
cze106p	♀	Ď	-	-	4		
cze107p	♂	S	-	-	6		
cze108p	♂	S	-	-	7		2
cze109p	♂	S	+	-	7		
cze110p	♀	S	+	-	7		2
cze111p	♂	Ď	-	-	5		
cze112p	♀	Ď	-	-	2		
cze113p	♂	S	-	-	10		
cze114p	♀	S	+	-	9		1

pacient	pohlavie	stupeň MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					pravdepodobne bezvýznamný nález	známe patogénne CNV	nález vyžadujúci ďalšiu analýzu
cze115p	♂	S	-	-	10		
cze116p	♂	S	-	-	8		2
cze117p	♂	Ť	-	-	6		
cze118p	♂	S	-	-	4		
cze119p	♀	H	-	-	9		1
cze120p	♂	S	+	-	5		
cze121p	♂	S	-	-	3		
cze122p	♀	S	+	-	4		
cze123p	♀	S	-	-	5		
cze124p	♀	S	-	A	8		2
cze125p	♀	S	-	-	8		
cze126p	♂	S	-	-	6		3
cze127p	♂	S	-	-	12		1
cze128p	vyraďený zo súboru						
cze129p	♂	S	-	-	11		2
cze130p	♀	Ť	-	-	7		
cze131p	♂	L	+	-	4		
cze132p	♂	L	-	-	9		
cze133p	♂	S	-	-	5		
cze134p	♀	L	+	-	4		
cze135p	♂	Ť	-	-	5		
cze136p	♂	S	-	-	5		
cze137p	♂	L	-	-	6		1
cze138p	♂	L	-	-	4		
cze139p	♂	L	+	-	7	1	
cze140pA	♂	L	-	+	6	1	1
cze140pB	♂	L	-	+	8	1	
cze141p	♀	S	-	-	5		
cze142p	♂	S	-	-	4		
cze143p	♂	S	-	-	2		
cze144p	♂	S	-	-	4		1
cze145p	♂	S	-	-	4		
cze146p	♂	S	+	-	2		
cze147p	♀	S	+	-	11		
cze148p	♂	S	-	-	6		1

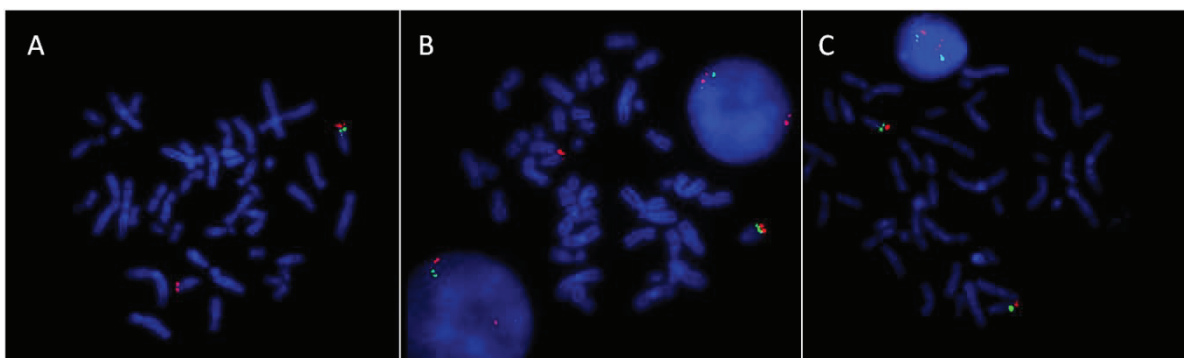
pacient	pohlavie	stupeň MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					pravdepodobne bezvýznamný nález	známe patogénne CNV	nález vyžadujúci ďalšiu analýzu
cze149pA	♂	L	-	+	3		
cze149pB	♂	L	-	+	5		
cze150p	♂	S	-	-	7		
cze151p	♀	L	-	+	3		
cze152p	♀	L	+	-	7		
cze153p	♂	L	-	-	9		4
cze154p	♂	L	-	-	6		
cze155p	♂	L	+	-	9		
cze156p	♂	S	+	-	5		
cze157p	♂	S	-	-	7		
cze158p	♂	L	+	-	3		3
cze159p	♂	L	+	-	5	1	3
cze160p	♂	L	+	+	4		
cze161p	♂	L	+	-	13		
cze162p	♂	L	+	+	3		
cze163p	♀	Ť	+	-	5		
cze164p	♀	L	+	-	1		1
cze165p	♀	S	+	-	4		2
cze166p	♂	S	-	-	4		4
cze167p	♂	L	-	-	13	1	1
cze168pA	♂	S	+	+	3		1
cze168pB	♂	S	+	+	10		
cze169p	♀	S	+	-	9		
cze170p	♂	S	+	+	6		2
cze171p	♂	S	+	A	4		
cze172p	♀	L	-	-	7		1
cze173p	♂	Ť	+	-	2		
cze174p	♂	H	-	-	5		1
cze175p	♂	S	+	-	5		
cze176p	♀	L	-	-	8		
cze177p	♀	S	-	-	5		
cze178p	♂	Ť	+	-	11		1
cze179p	♂	S	+	-	6		

#### 4.4. Potvrdenie vybraných CNV nezávislými metódami

Overenie nezávislou metódou slúžilo k vylúčeniu falošne pozitívnych nálezov vyprodukovaných algoritmami pre identifikáciu CNV a bolo prevedené u všetkých CNV okrem tých klasifikovaných ako pravdepodobne bezvýznamné nálezy. Analýzou rodičovských vzoriek bol tými istými metódami zisťovaný prípadný rodičovský pôvod aberácie či potvrdený jej vznik *de novo*. Za týmto účelom nám slúžili metódy FISH, MLPA s komerčne dostupnými kitmi či vlastnými syntetickými próbami, QF-PCR, sekvenovanie DNA, SNP array s vyšším rozlíšením (700 K) či vyšetrenie rodičov rovnakým typom SNP array ako u pacientov. Voľba metódy závisela na veľkosti a povahe CNV. Výnimkou bolo 5 rodín s aberáciami známymi už pred zaradením do súboru, u ktorých nebolo overovanie prevedené, pretože tieto CNV už boli nezávisle potvrdené dvoma metódami (metóda, ktorá ich pôvodne identifikovala, a SNP array).

##### 4.4.1. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

U CNV väčšieho rozsahu bola zvolená metóda potvrdenia FISH. Prehľad aberácií, vyšetrených rodín a výsledkov vyšetrenia touto metódou obsahuje Tabuľka 13. Ukážku vyšetrenia zobrazuje Obrázok 10. Limitom použitia tejto metódy bola veľkosť aberácie vzhľadom k nutnosti umiestnenia lokus špecifického BACového klonu. Delécie menšie ako rádovo 100 kb tak nebolo možné touto metódou overiť a ako veľmi problematické sa ukázalo overovanie duplikácií, ktoré nebolo spoľahlivé pri duplikáciách s veľkosťou menšou ako 0,5 Mb. Celkovo bolo touto metódou možné vyšetriť 28 aberácií v 25 rodinách, vrátane jednej aberácie u súrodencov (cze061pA a cze061pB).



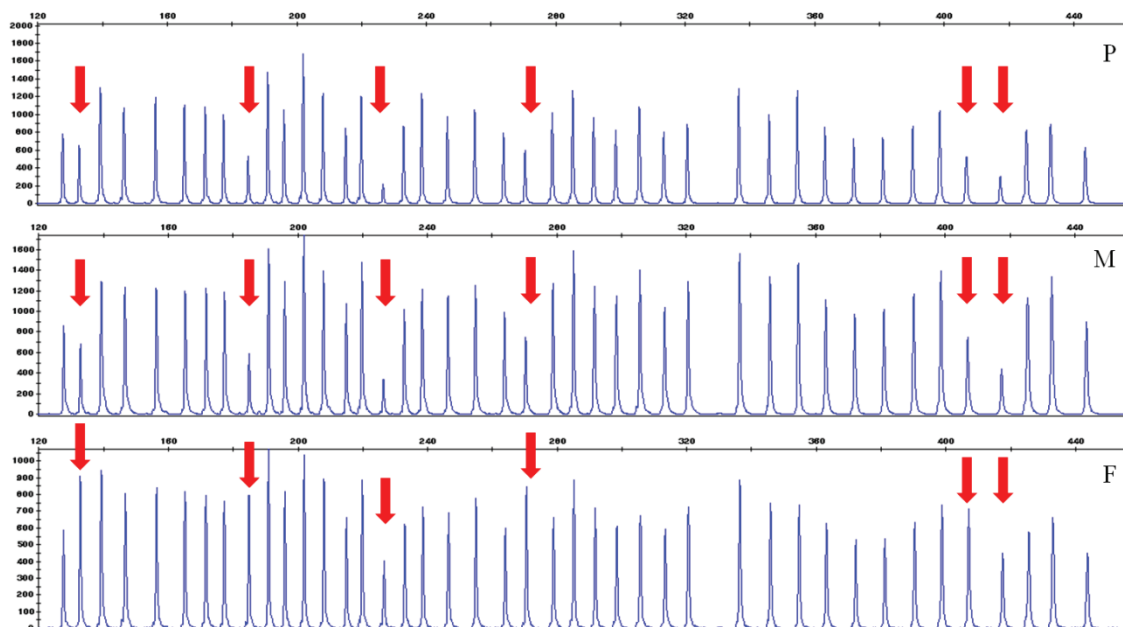
Obrázok 10: Ukážka overovania výsledkov analýzy SNP array pomocou metódy FISH. Overenie delécie u pacienta cze072p (A) pomocou 15q25.2-q25.3 lokus-špecifických sond (označených zelenou farbou, kontrolná sonda červenou), u jeho matky (B) a otca (C). Potvrdený bol maternálny pôvod delécie.

Tabuľka 13: Prehľad nálezov SNP array overovaných metódou FISH (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS).

vyšetrovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	použitá sonda FISH	záver vyšetrenia	pôvod aberácie	
cze004	del	16p12.1	479 755	147	196	RP11-101E7	potvrdené	pat	
cze013	del	12q13.13	936 593	84	144	RP11-65C21	potvrdené	dn	
cze017	del	13q12.12	1 364 752	396	430	RP11-760M1	potvrdené	rodičia nedostupní	
	del	14q32.2	2 901 491	574	859	RP11-102D7	potvrdené	rodičia nedostupní	
cze020	del	1q44	811 975	127	172	RP11-156E8	potvrdené	dn	
cze033	del	2p15-p16.1	438 002	42	142	RP11-416L21	potvrdené	dn	
cze053	del	9p21.33	1 762 425	529	460	RP11-59M22	potvrdené	dn	
cze056	del	13q32.2	186 736	64	102	RP11-279D17	potvrdené	dn	
cze060	del	2q24.1	445 899	10	-	RP11-39B6	falošne pozitívne	-	
	del	14q21.3	551 661	13	-	RP11-25H9	falošne pozitívne	-	
cze061	pA	del	15q25.3	771 496	172	270	RP11-102N9	potvrdené	mat
	pB	del	15q25.3	771 496	172	270	RP11-102N9	potvrdené	mat
cze063	del	3p14.2	168 095	31	-	RP11-185G10	potvrdené	pat	
cze072	del	15q25.3	731 804	175	248	RP11-102N9	potvrdené	mat	
cze073	del	2p14-p15	3 691 529	1136	1168	RP11-44A12	potvrdené	dn	
cze075	del	15q13.1	1 209 441	415	516	RP11-143J24	potvrdené	dn	
cze086	del	8p22	291 738	163	158	RP11-145O15	potvrdené	pat	
cze089	dup	7q11.22	1 214 386	362	942	RP4-736H5	potvrdené	rodičia nedostupní	
cze090	dup	Xp22.31	1 704 564	746	-	LPU016	potvrdené	mat	
cze096	del	7q11.22	491 514	141	82	RP11-3P22	potvrdené	rodičia nedostupní	
cze108	del	4p15.1	1 162 558	275	220	RP11-89I4	potvrdené	pat	
cze110	del	17q24.3	2 816 497	514	542	RP11-147L13	potvrdené	dn	
cze139	del	2p24.3	6 759 694	2186	2828	RP11-146J19	potvrdené	dn	
cze140	dup	8p22	495 043	142	281	RP11-145O15	potvrdené	mat	
cze164	dup	12q15	481 624	72	145	RP11-111H7	potvrdené	mat	
cze166	del	6p23	138 789	17	41	RP11-127P7	potvrdené	mat	
cze167	del	8p23.2	196 250	191	497	RP11-45M12	potvrdené	rodičia nedostupní	
cze170	del v mozaike	4qter	147 069	26	64	4qter	potvrdené	dn alebo pat (dostupná iba matka)	

#### 4.4.2. Metóda MLPA s komerčne dostupnými kitmi

U všetkých génov nachádzajúcich sa v overovaných CNV bola preskúmaná možná existencia próby v komerčne dostupných kitoch MLPA. Prehľad aberácií, vyšetrených rodín a výsledkov vyšetrenia touto metódou sumarizuje Tabuľka 14. Ukážku výsledku metódy MLPA, výsledného elektroforetogramu, ponúka Obrázok 11. Metóda MLPA s komerčne dostupnými kitmi sa ukázala ako veľmi rýchla a spoľahlivá, jej limitáciou bola veľmi obmedzená dostupnosť sond mimo už známych regiónov asociovaných s ochoreniami. Celkovo bolo touto metódou možné vyšetriť 29 aberácií v 25 rodinách, vrátane jednej aberácie u súrodencov (cze140pA a cze140pB).



Obrázok 11: Ukážka overovania výsledkov analýzy SNP array pomocou metódy MLPA. Overenie delécie génu *NRXN1* u pacienta cze050p (P), jeho matky (M) a otca (F). Potvrdený bol maternálny pôvod delécie. Próby MLPA, na základe ktorých je delécia jasne detekovateľná, sú zvýraznené červenou šípkou.

Tabuľka 14: Prehľad nálezov SNP array overovaných metódou MLPA (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS).

vyšetrovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	použitý kit MLPA	počet sond MLPA	záver vyšetrenia	pôvod aberácie	
cze002	dup	9q34.3	835 254	320	314	P286A1	2	potvrdené	<i>de novo</i> alebo pat (dostupná iba matka)	
cze025	del	15q13.3	577 350	121	114	P297B1	1	potvrdené	mat	
cze028	hmz del	Xq11.1	2 077 373	-	48	P182	1	falošne pozitívne	-	
cze030	dup	22q11	403 018	48	-	P324A1	4	potvrdené	pat	
cze036	dup	15q26.3	247 544	63	167	P070	1	potvrdené	pat	
cze050	del	2p16.3	244 769	73	-	P379A1	6	potvrdené	mat	
cze063	dup	5p12	2 077 912	-	35	P181, P182	2	falošne pozitívne	-	
cze066	amp	1q23	32 880	10	-	P236	2	falošne pozitívne	-	
cze075	dup	22q11.2	2 260 091	532	1765	P023B2	7	potvrdené	pat	
cze077	del	15q (BP1-BP2)	268 645	212	305	ME028B1	2	potvrdené	pat	
cze078	dup	12q24.33	66 022	12	-	P286A1	1	falošne pozitívne	-	
cze087	del	2p16.3	171 043	49	42	P379A1	9	potvrdené	mat	
cze094	dup	1q23	569 503	12	-	P236	10	falošne pozitívne	-	
cze098	dup	Xp21.1	422 775	101	168	P034	1	potvrdené	pat	
cze099	del	16p11.2	571 786	184	296	P297B1	5	potvrdené	mat	
cze119	del	15q (BP1-BP2)	397 345	357	-	ME028B1	2	potvrdené	rodičia nedostupní	
cze124	dup	4p16.3	109 244	17	-	P096	2	falošne pozitívne	-	
cze137	dup	1p36.33	106 108	17	-	P064B2	3	falošne pozitívne	-	
cze140	pA	del	16p11.2	571 785	154	310	P297B1	5	potvrdené	pat
	pB	del	16p11.2	571 785	154	310	P297B1	5	potvrdené	pat
cze158	dup	1p36.33	130 800	22	-	P064B2	3	falošne pozitívne	-	
	dup	4p16.3	78 973	12	-	P096	2	falošne pozitívne	-	
cze159	del	2p16.3	444 358	152	121	P379A1	15	potvrdené	<i>dn</i>	
	dup	15q (BP1-BP2)	385 870	254	310	ME028B1	2	potvrdené	mat	
cze166	dup	1p36.33	212 263	28	-	P064B2	3	falošne pozitívne	-	
	dup	4p16.3	125 999	27	-	P096	4	falošne pozitívne	-	
cze167	hmz del	Xq11.1	2 077 373	-	110	P182	1	falošne pozitívne	-	
cze168	dup	6p21.1	363 484	-	36	P080B1	8	falošne pozitívne	-	
cze174	dup	1p36.33	193 419	10	-	P064B2	3	falošne pozitívne	-	

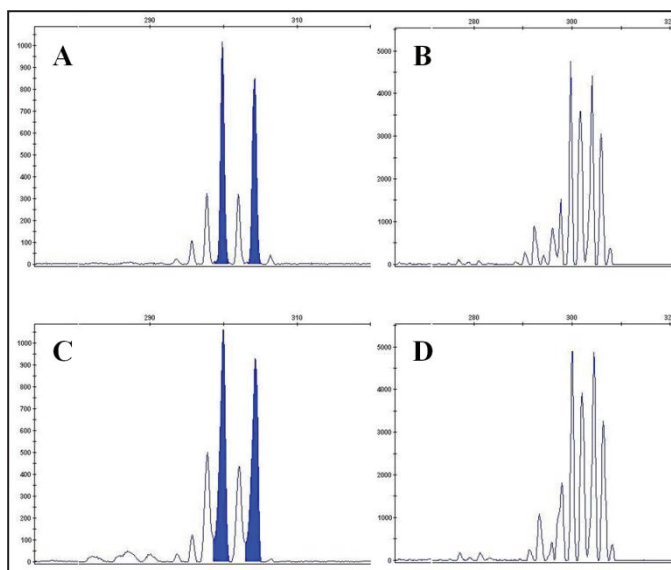
#### 4.4.3. Kvantitatívna fluorescenčná PCR

U menších aberácií, u ktorých nebolo možné použiť metódu FISH a ktoré neobsahovali ani gény zahrnuté v komerčných kitoch MLPA, bola ako metóda overovania zvolená QFPCR s fragmentačnou analýzou PCR produktov obsahujúcich STR markery. Každá zo 16 overovaných aberácií u 16 vybraných rodín vyžadovala navrhnutie primerov pre jedinečný súbor markerov, ktoré ležali v aberácii a u ktorých bola predpokladaná vyššia pravdepodobnosť heterozygoty. Prvotne boli využívané fluorescenčne značené primery. Vzhľadom k ich cene a súčasne častej neinformativite (homozygotite pacienta a jeho rodičov pre jednu alelu markeru) bolo testované aj využitie interného značenia fluorescenčne značenými nukleotidmi ako finančne menej náročného postupu. Táto metóda sa však stretávala s viacerými problémami. Okrem neinformativity to boli predovšetkým technické problémy. Interné značenie znemožňovalo hodnotenie analýz, v reakcii sa objavovalo veľké množstvo rôznych artefaktov (stutter peaky). Po prevedení kontrolného testu porovnávajúceho obe metódy značenia sa potvrdil pôvod technických problémov v internom značení (Obrázok 12), a preto sme od používania tejto metódy upustili. Celkovo bolo touto metódou možné úspešne vyšetriť iba 3 aberácie v 3 rodinách (Tabuľka 15). Príklad úspešnej analýzy metódou QFPCR zobrazuje Obrázok 13.

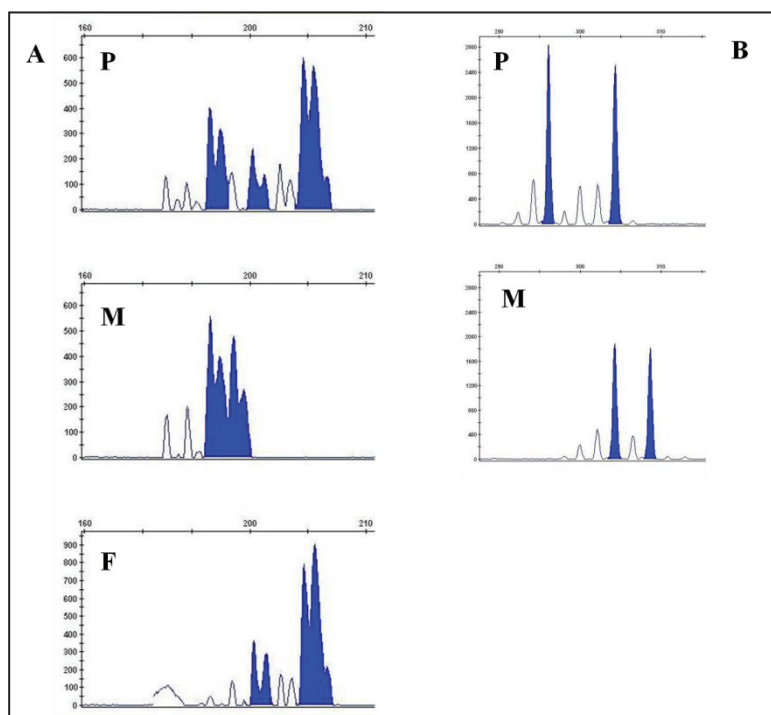
Tabuľka 15: Prehľad nálezov SNP array overovaných metódou QFPCR (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS).

vyšetovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	záver vyšetrenia	pôvod aberácie
cze061	amp	13q13.3	3 661	12	-	falošne pozitívne	-
cze116	del	5q35.2	62 703	10	-	falošne pozitívne	-
cze158	dup	11p14.3	425 965	140	471	potvrdené	pat





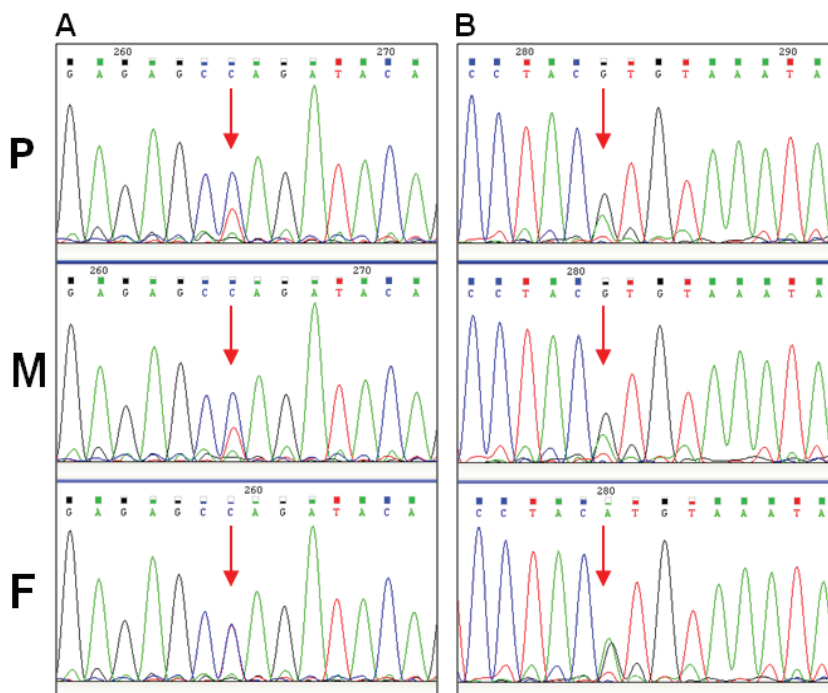
Obrázok 12: Kontrolný test kvôli technickým problémom interného značenia. Úsek zahrňujúci STR marker s repetitívnym motívom TTTC (chr5:174,061,114-174,061,250) u kontrolnej DNA K1 detegovaný (A) pomocou fluorescenčne značených primerov a (B) pomocou fluorescenčne značených nukleotidov. Sekvencie primerov sú zhodné v oboch prípadoch. Detekcia rovnakého úseku u kontrolnej DNA K2 (C) pomocou fluorescenčne značených primerov a (D) pomocou fluorescenčne značených nukleotidov. Výsledky ukazujú, že interné značenie je sprevádzané zvýšeným množstvom vedľajších peakov, ktoré môže znemožňovať vyhodnotenie.



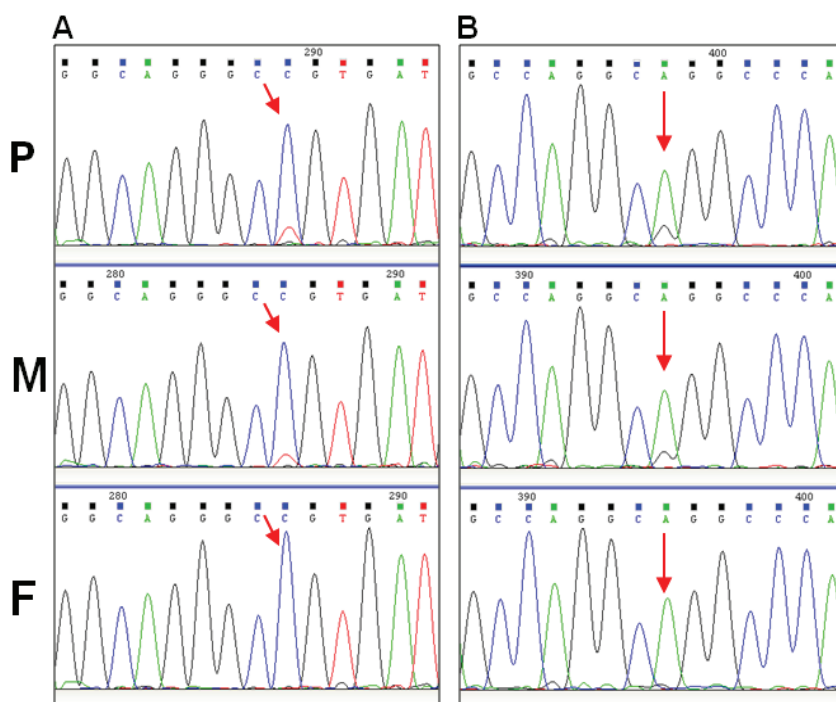
Obrázok 13: Ukážka úspešných analýz metódou QFPCR. (A) Použitie fluorescenčne značených nukleotidov v prípade rodiny cze158. Prítomnosť troch aliel STR markeru s repetitívnym motívom CA (chr11:23,101,095-23,101,135) u pacienta potvrdzuje existenciu a paternálny pôvod overovanej duplikácie. (B) Použitie fluorescenčne značených primerov v prípade rodiny cze16. Prítomnosť dvoch aliel STR markeru s repetitívnym motívom TTTC (chr5:174,061,114-174,061,250) u pacienta vyvracia existenciu overovanej delécie a potvrdzuje falošne pozitívny nález. Materiál otca nebol v rodine cze116 dostupný. (P) pacient, (M) matka, (F) otec.

#### 4.4.4. Sekvenovanie DNA

U piatich aberácií v piatich rodinách, vykazujúcich pri overovaní duplikácií či amplifikácií fragmentačnou analýzou neinformativitu v rámci STR lokusov, boli navrhnuté primery pre amplifikáciu fragmentov obsahujúcich polymorfne SNP, a tieto fragmenty boli následne sekvenované. Aj keď sekvenovanie nepatrí medzi kvantitatívne metódy, u duplikácií a amplifikácií bolo možné pri porovnaní výsledkov u pacientov a normálnych kontrol rozoznať neobvyklé pomery peakov u heterozygotných SNP. Pri duplikáciách bol u heterozygotných SNP jednoznačne rozoznávateľný pomer aliel 1:2 oproti klasickému 1:1 (Obrázok 14), pri amplifikácii jedna alela niekoľkonásobne prevyšovala druhú alelu, presný násobok však touto metódou nie je možné určiť (Obrázok 15). Výsledky boli vždy overené aj sekvenáciou komplementárneho vlákna DNA. U troch pacientov bol touto metódou potvrdený nález zo SNP array, u dvoch boli výsledky neinformatívne (Tabuľka 16).



Obrázok 14: Ukážka overovania výsledkov analýzy SNP array pomocou sekvenovania. Potvrdenie duplikácie maternálneho pôvodu u rodiny cze051 na ukážke dvoch nezávislých fragmentov. (A) zahrňujúci SNP rs1483801 a (B) SNP rs7842547. Šípka zobrazuje nevyvážený pomer aliel 1:2 svedčiaci pre duplikáciu u pacienta (P) a jeho matky (M), u otca (F) je pozorovateľný normálny pomer aliel 1:1. Prezentované sekvencie boli generované s použitím forward primeru, za použitia reverse primeru sme pozorovali vo vzorkách pacienta a matky rovnaký nepomer aliel.



Obrázok 15: Ukážka overovania výsledkov analýzy SNP array pomocou sekvenovania. Potvrdenie amplifikácie maternálneho pôvodu u rodiny cze063 na ukážke dvoch SNP (A) rs3735683 a (B) rs879745 v rámci jedného fragmentu. Šípka zobrazuje nevyvážený pomer aliel svedčiaci pre amplifikáciu u pacienta (P) a jeho matky (M), otec (F) je pre daný SNP homozygot. Prezentované sekvencie boli generované s použitím forward primeru, za použitia reverse primeru sme pozorovali vo vzorkách pacienta a matky rovnaký nepomer aliel.

Tabuľka 16: Prehľad nálezov SNP array overovaných metódou sekvenovania (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS).

vyšetovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	záver vyšetrenia	pôvod aberácie
cze051	dup	8q21.11	107 072	25	-	potvrdené	mat
cze063	amp	7p22.3	51 565	12	-	potvrdené	mat
cze072	dup	11p11.12	35 245	14	-	potvrdené	pat

#### 4.4.5. Analýza rodičov pomocou SNP array

V prípade pacientov, u ktorých bolo nutné overiť väčšie množstvo nálezov, najmä jedinečných aberácií, ktoré na základe vysokého skóre alebo manuálnej inšpekcie grafov LRR a BAF pravdepodobne neboli artefaktmi, bolo k overeniu použité vyšetrenie rodičov rovnakým typom SNP array ako u pacientov. Preukázanie CNV u rodiča následne podporilo jeho existenciu u pacienta. Výsledky analýz zhrňuje Tabuľka 17. V prípade 13 CNV, ktoré neboli zachytené ani u jedného z rodičov a javili sa teda ako *de novo*, ich bolo nutné overiť ešte inou nezávislou metódou. Duplicitne bolo touto metódou overených aj šesť aberácií, ktoré boli už predtým potvrdené metódou FISH alebo MLPA. Celkovo bolo touto metódou možné vyšetriť 35 aberácií v 15 rodinách.

Tabuľka 17: Prehľad nálezov SNP array overovaných použitím toho istého SNP array u rodičov (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS). \*aberácia u otca cze077f nebola zachytená pri používanom nastavení detekcie CNV ani jedným z algoritmov (skóre v programe QuantiSNP 2,3, čo je hlboko pod limitným skóre 10), po potvrdení u pacienta a otca metódou MLPA s vlastnými syntetickými próbami však bola spätne rozoznateľná pri manuálnej inšpekcii grafov LRR a BAF. \*\*metóda bola použitá iba v tomto jedinom prípade a nie je preto popísaná v kapitole 3.2.3.

vyšetrovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	pôvod aberácie	metóda ďalšieho overenia	záver vyšetrenia	
cze002	dup	2q12.3	509 399	67	300	mat	-	-	
	dup	9q34.3	835 254	321	314	dn alebo pat	MLPA	dn alebo pat (dostupná iba matka)	
	del	15q26.2	1 086 090	354	221	mat	-	-	
cze010	amp	6q14.1	251 753	85	329	dn alebo pat	synt. MLPA próby	dn alebo pat (dostupná iba matka)	
cze014	del	4q31.23	228 937	58	57	mat	-	-	
cze017	dup	5p13.2-p13.3	808 060	78	379	pat	-	-	
	del	13q12.12	1 364 752	396	430	pat	FISH	pat	
	del	14q32.2	2 901 491	575	859	mat	FISH	mat	
	dup	19p13.3	854 159	105	272	pat	-	-	
cze033	del	2p15-p16.1	438 002	42	142	dn na pat. chr.	FISH	dn	
cze036	del	1q24.3	602 991	116	53	dn na pat. chr.	Agilent Human CGH microarray 4x44K **	dn	
	del	6q24.1-q24.2	2 454 663	672	366	dn na pat. chr.		dn	
	dup	15q26.3	247 544	63	167	pat	MLPA	pat	
cze065	del	22q12.2	173 049	68	-	mat	-	-	
cze077	pA	del	9q31.2	69 727	12	-	mat	-	-
		dup	10q11.23	92 565	18	96	dn *	synt. MLPA próby	pat
		del	15q11.2	268 645	212	305	pat	MLPA	pat
	pB	del	12p12.3	17 910	10	-	dn	synt. MLPA próby	falošne pozitívne
cze079	dup	3q27.3	771 825	146	337	pat	-	-	
	del	Xq23	60 433	42	623	mat	-	-	
cze088	del	3q26.31	233 949	56	44	mat	-	-	
cze099	dup	3p14.1	710 909	60	148	pat	-	-	
	del	16p11.2	571 786	184	296	mat	MLPA	mat	
	dup	18q12.1	169 060	35	92	mat	-	-	
cze110	del	17q24.2	2 816 497	514	542	dn	FISH	dn	
	dup	Xq27.1	133 148	59	-	mat	-	-	
cze116	del	4q34.2-q34.3	79 313	15	-	dn na pat. chr.	synt. MLPA próby	falošne pozitívne	
	del	5q35.2	62 703	10	-	dn na pat. chr.	QFPCR	falošne pozitívne	
cze126	dup	1p31.1	89 063	15	-	dn	synt. MLPA próby	falošne pozitívne	
	del	7q22.1	28 114	14	-	dn	synt. MLPA próby	falošne pozitívne	
	del	16p13.3	115 118	74	68	mat	-	-	
cze159	del	2p25.3	118 511	62	66	mat	-	-	
	del	2p16.3	444 358	152	121	dn	MLPA	dn	
	dup	9q21.12	340 063	111	228	mat	-	-	
	dup	15q11.2	385 870	254	310	mat	MLPA	mat	

#### 4.4.6. Analýza pacienta pomocou SNP array s vyšším rozlíšením (700 K)

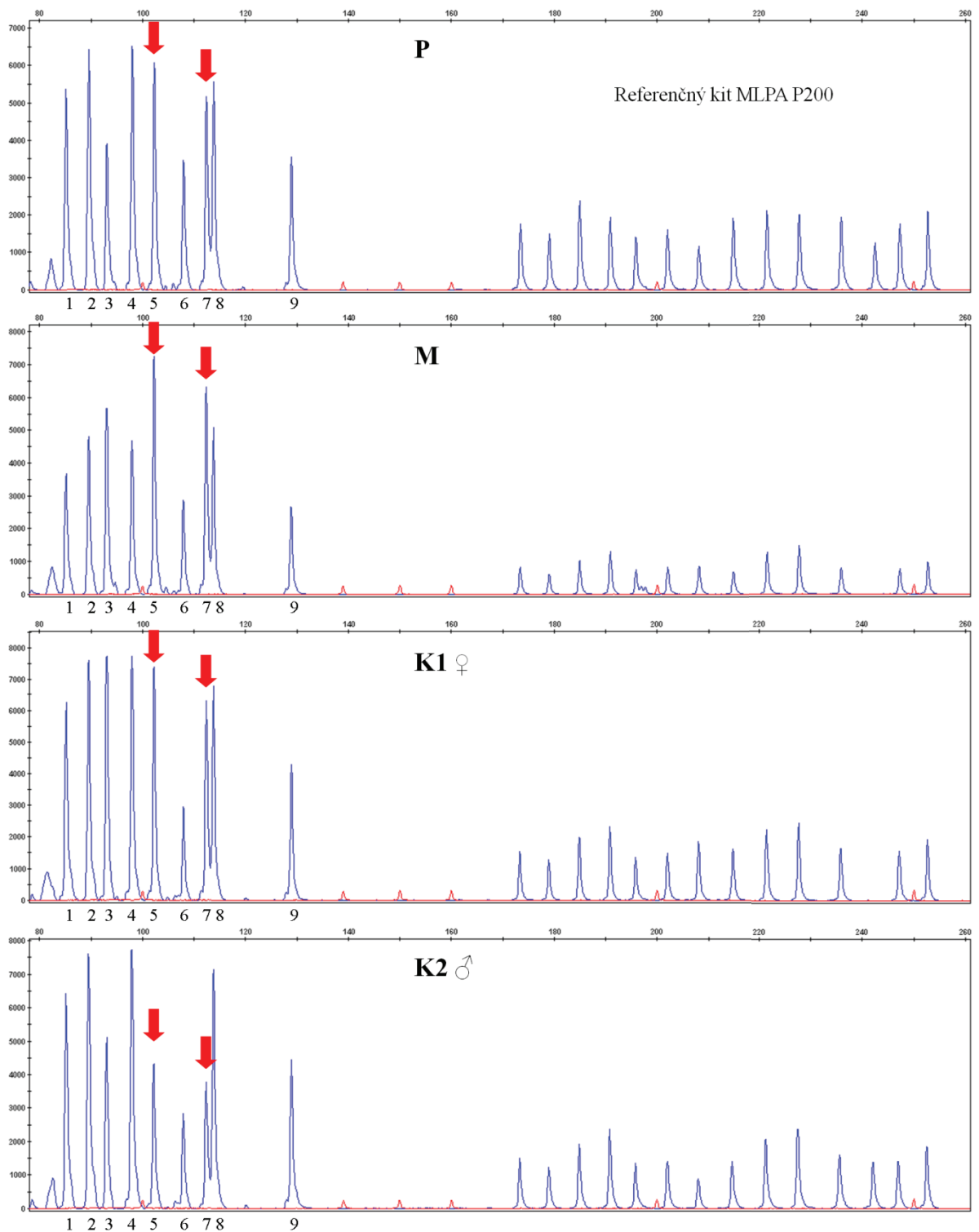
U piatich pacientov bolo naopak nutné overiť väčšie množstvo nálezov s nízkym skóre (Tabuľka 18). Za týmto účelom bolo zvolené použitie iného druhu SNP array s vyššou rozlišovacou schopnosťou (700 K). Táto analýza žiadny z overovaných nálezov nepotvrdila. Všetky nové nálezy zachytené citlivejšou metódou boli kategorizované ako pravdepodobne bezvýznamné nálezy a vyšetrenie u týchto pacientov bolo ukončené ako bez nálezu. Celkovo tak bolo možné ako falošne pozitívne označiť 18 aberácií v 5 rodinách.

Tabuľka 18: Prehľad nálezov SNP array overovaných na SNP array s vyšším rozlíšením (700K) (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS).

vyšetrovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	záver vyšetrenia	pôvod aberácie
cze069	dup	4p16.3	169 429	17	-	falošne pozitívne	-
	dup	13q34	50 738	11	-	falošne pozitívne	-
	dup	13q34	89 528	11	-	falošne pozitívne	-
	del	16p12.1	13 852	10	-	falošne pozitívne	-
cze100	del	1p34.2	6 166	12	-	falošne pozitívne	-
	del	11q14.3	25 822	13	-	falošne pozitívne	-
	del	17q22	11 824	14	-	falošne pozitívne	-
cze104	hmz del	1p31.1	38 663	-	37	falošne pozitívne	-
	del	5q15	70 218	11	-	falošne pozitívne	-
	del	7q11.21	19 229	15	-	falošne pozitívne	-
	del	8q22.1	14 092	10	-	falošne pozitívne	-
	dup	16p12.2	38 931	11	-	falošne pozitívne	-
cze153	del	7p15.3	71 304	10	-	falošne pozitívne	-
	del	7q22.1	9 478	13	-	falošne pozitívne	-
	del	7q32.3	156 436	22	-	falošne pozitívne	-
	hmz del	10p13	18 540	-	71	falošne pozitívne	-
cze165	del	1q21.1	162 007	40	-	falošne pozitívne	-
	del	4q12	7 313	13	-	falošne pozitívne	-

#### 4.4.7. Metóda MLPA s vlastnými syntetickými próbami

Pre neuspokojivé skúsenosti s QFPCR a sekvenovaním a trvajúcu potrebu overenia množstva jedinečných nálezov menších rozmerov sme sa rozhodli zaviesť metódu MLPA využívajúcu vlastné, nami navrhované syntetické próby. Príklad vyšetrenia touto metódou ukazuje Obrázok 16 a prehľad všetkých pacientov vyšetrených pomocou syntetických prób MLPA a výsledky analýz podáva Tabuľka 19. Celkovo bolo touto metódou možné vyšetriť 22 aberácií v 19 rodinách.



Obrázok 16: Ukážka overovania výsledkov analýzy SNP array pomocou metódy MLPA so syntetickými próbami. Overenie duplikácie génu *DACH2* na chromozóme X u pacienta cze093p (P), jeho matky (M) a dvoch nezávislých kontrolných vzoriek odlišného pohlavia (K1, K2). Materiál otca nebol dostupný. Potvrdený bol maternálny pôvod duplikácie. Syntetické próby MLPA, na základe ktorých je duplikácia jasne detekovateľná, sú zvýraznené červenou šípkou (5 a 7). Syntetické próby MLPA 1, 2, 4, 6, 8, 9 na autozómoch a próba 3 na chromozóme X spolu s komerčne dodávaným referenčným kitom P200 slúžili ako interná kontrola.

Tabuľka 19: Prehľad nálezov SNP array overovaných metódou MLPA so syntetickými próbami (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array). Uvedené sú aj skóre aberácií v programoch GenomeStudio (GS) a QuantiSNP (QS).

vyšetrovaná rodina	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	veľkosť aberácie (bp)	skóre QS	skóre GS	syntetická próba MLPA pre gén	počet sond MLPA	záver vyšetrenia	pôvod aberácie
cze010	amp	6q14.1	251 753	85	329	<i>FAM46C</i>	6	potvrdené	dn alebo pat (dostupná iba matka)
cze073	dup	1q31.1	56 346	12	-	<i>FAM5C</i>	4	falošne pozitívne	-
cze077	pA	dup	10q11.23	18	93	<i>SGMS1</i>	3	potvrdené	pat
	pB	del	12p12.3	17 910	10	-	<i>PLEKHA5</i>	3	falošne pozitívne
cze083	dup	9p13.2	571 416	111	419	<i>PAX5</i>	2	potvrdené	rodičia nedostupní
cze091	dup	21q21.3	20 980	14	-	<i>APP</i>	3	falošne pozitívne	-
cze093	dup	Xq21.2	695 537	138	-	<i>DACH2</i>	2	potvrdené	mat
cze108	del	9q22.32	34 431	11	-	<i>SLC35D2</i>	2	falošne pozitívne	-
cze114	dup	Xp22.2	332 728	70	208	<i>FRMPD4</i>	3	potvrdené	pat
cze116	del	4q34.2-q34.3	79 313	15	-	<i>VEGFC</i>	2	falošne pozitívne	-
cze124	dup	5q14.2	586 775	106	-	<i>RPS23</i>	6	potvrdené	rodičia nedostupní
cze126	dup	1p31.1	89 063	15	-	<i>LPHN2</i>	2	falošne pozitívne	-
	del	7q22.1	28 114	14	-	<i>COPS6</i>	2	falošne pozitívne	-
cze127	del	2q21.3	3 631	11	-	ncRNA	2	falošne pozitívne	-
cze129	del	1q21.3	31 792	10	-	<i>NUP210L</i>	2	falošne pozitívne	-
	del	22q12.2	11 891	11	-	<i>PATZ1</i>	2	falošne pozitívne	-
cze144	dup	1q31.1	118 831	19	-	<i>FAM5C</i>	4	falošne pozitívne	-
cze148	del	1p36.22	28 390	19	-	MTOR	2	falošne pozitívne	-
cze166	amp	1q31.1	264 047	-	37	<i>FAM5C</i>	4	falošne pozitívne	-
cze170	dup	1q31.1	151 159	18	-	<i>FAM5C</i>	4	falošne pozitívne	-
cze172	dup	13q34	346 622	91	107	<i>LAMPI1</i>	1	potvrdené	mat
cze178	dup	10p13	118 694	30	137	<i>OPTN</i>	4	potvrdené	mat

#### 4.4.8. Prehľad nezávislého overovania

Nezávislé overenie bolo nutné u všetkých 21 známych patogénnych aberácií a u 106 aberácií vyžadujúcich ďalšiu analýzu, celkovo teda u 127 aberácií. Výnimkou bolo šesť aberácií už vopred známych pred zaradením do súboru u 6 pacientov (z toho 5 známych patogénnych aberácií a jedna vyžadujúca ďalšiu analýzu), ktoré boli nezávislými metódami pôvodne nájdené a potvrdenie na SNP array už predstavovalo ich overenie. Celkovo teda bolo v tejto etape analýzy overovaných 121 aberácií u 71 pacientov.

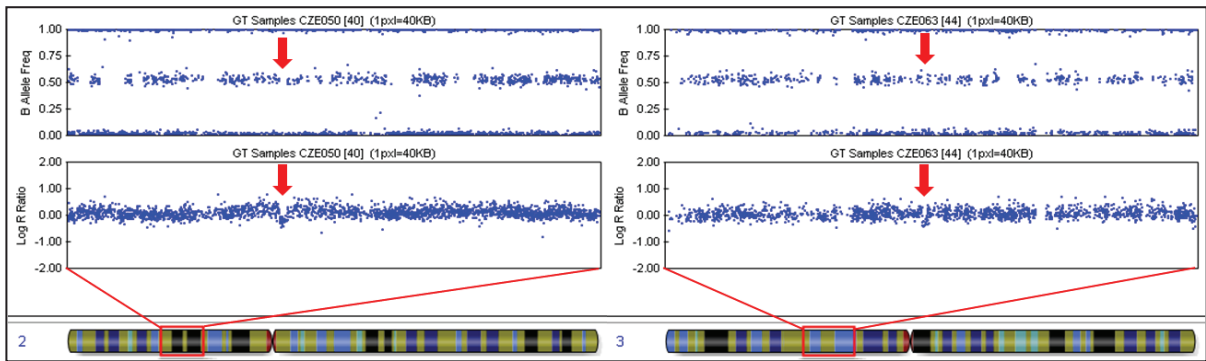
V kategórii patogénnych CNV boli vylúčené dve CNV zahrňujúce gén *ARHGEF9* u dvoch pacientov, u ostatných 18 pacientov bolo potvrdených všetkých 19 aberácií (vrátane

5 vopred známych). U ostatných nálezov klasifikovaných ako vyžadujúce ďalšiu analýzu odhalilo overovanie viac falošne pozitívnych výsledkov. Zo 106 aberácií u 60 pacientov sa nepotvrdilo 48 aberácií u 28 pacientov a ako skutočne existujúcich bolo preukázaných 58 CNV u 41 pacientov (vrátane 1 vopred známeho, zo 60 pacientov 9 nieslo ako potvrdenú, tak aj falošne pozitívnu aberáciu). Celkovo tak bolo vylúčených 50 rôznych CNV (2 patogénne a 48 vyžadujúcich ďalšiu analýzu) a potvrdených 77 CNV (19 patogénnych (vrátane 5 vopred známych) a 58 vyžadujúcich ďalšiu analýzu (vrátane 1 vopred známeho)).

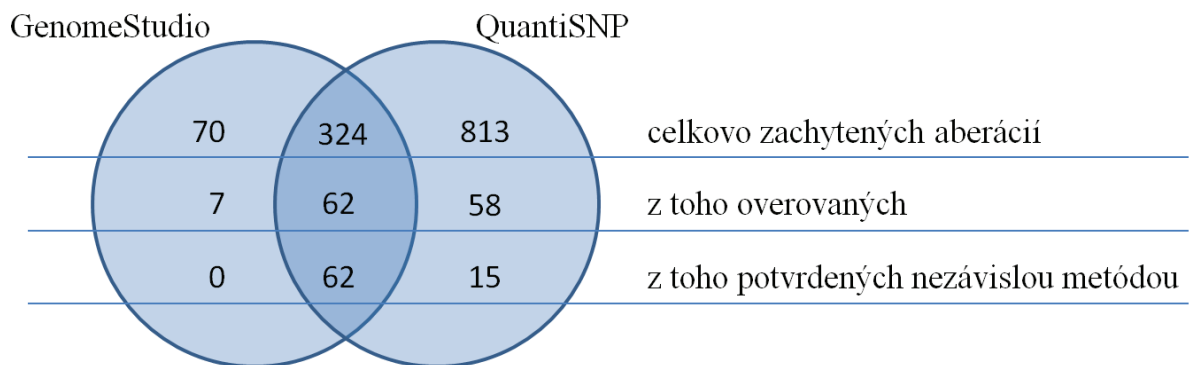
U nezávisle overovaných CNV bolo taktiež možné vyhodnotiť a vzájomne porovnať oba algoritmy detekcie CNV. Program GenomeStudio v porovnaní s programom QuantiSNP vo všeobecnosti detegoval menej aberácií (394 oproti 1137) a bol schopný rozpoznať zväčša iba aberácie väčšieho rozsahu. Všetkých sedem overovaných aberácií rozpoznaných iba programom GenomeStudio, zväčša s hraničnou hodnotou skóre 35, sa pri následnom overovaní nezávislou metódou ukázalo ako falošne pozitívne. CNV s malým rozsahom bol schopný zachytiť iba program QuantiSNP, avšak najmä pri kombinácii malého rozsahu aberácie a nízkeho skóre narastal výskyt falošne pozitívnych nálezov. Z 56 overovaných aberácií zachytených iba programom QuantiSNP bolo potvrdených 13, zvyšných 43 sa ukázalo ako falošne pozitívnych. Najvyššie skóre u falošne pozitívneho nálezu zachyteného iba programom QuantiSNP bolo 40. Šlo o možnú deléciu 1q21.1 u pacientky cze165p, ktorú ale nebolo možné rozoznať pri podrobnom manuálnom preskúmaní grafov LRR a BAF arraye 300 K ani u následne použitej arraye 700 K a reálne teda neexistovala. Pokiaľ bola aberácia detegovaná obidvoma algoritmi, čo v našom prípade bolo 58 aberácií, pri overovaní nezávislou metódou bola vždy potvrdená. Zo šiestich aberácií už známych pred zaradením do súboru a takisto považovaných za overené boli štyri rozpoznané oboma algoritmi, dve však taktiež len programom QuantiSNP.

Program QuantiSNP tak zachytil aj reálne existujúce aberácie, ktoré program GenomeStudio nedetegoval, avšak pri manuálnom preskúmaní grafov LRR a BAF bolo možné tieto aberácie rozoznať (Obrázok 17). Pri použití iba štandardného algoritmu analýzy primárnych dát programom GenomeStudio by nebolo možné zachytiť až 13 rôznych potvrdených CNV u 13 pacientov, vrátane napr. viac než 400 kb veľkej duplikácie 22q11 u pacienta cze030p. Spolu s dvoma aberáciami zachytenými iba programom QuantiSNP u pacientov s vopred známymi nálezmi to činí až 15 rôznych potvrdených CNV u 15 pacientov. Kombinácia týchto dvoch programov bola teda veľmi účinným nástrojom detekcie CNV (Obrázok 18).





Obrázok 17: Ukážka grafického výstupu z programu GenomeStudio u dvoch pacientov zobrazujúca nezávisle potvrdené aberácie, ktoré neboli zachytené algoritmom detekcie CNV programu GenomeStudio, ale algoritmus programu QuantiSNP ich zachytil.



Obrázok 18: Prehľad počtu zachytených, overovaných a potvrdených CNV u programov GenomeStudio a QuantiSNP.

#### 4.5. Konečná interpretácia CNV

##### 4.5.1. Vypracovanie postupu pre konečnú interpretáciu CNV

Po odstránení falošne pozitívnych nálezov a zistení pôvodu aberácií nasledovalo ďalšie kolo analýzy. V niektorých prípadoch boli postihnutí pacienti znovu a podrobnejšie klinicko-geneticky vyšetrení za účelom korelácie genotypu a fenotypu. V niektorých prípadoch došlo pri opätovnom vyšetrení rodiča, nosiča aberácie, k odhaleniu miernej manifestácie obdobného fenotypu ako u probanda, či iného psychiatrického ochorenia. Dôkladná charakterizácia fenotypu probanda bola základom pre následné porovnávanie fenotypov s publikovanými prípadmi. Toto porovnávanie však bolo komplikované do veľkej miery aj subjektivitou pri klinickom popisovaní fenotypov pacientov zjavnou najmä pri porovnávaní prác rôznych autorov. V neposlednom rade bola prevedená opakovaná a rozšírená bioinformatická analýza.

Tá zahrňovala najmä inventúru génov v aberáciách a podrobnú analýzu ich funkcie, interakcií, fenotypov zvieracích modelov s knock-out týchto génov, či príslušnosti ku génovej rodine obsahujúcej gén podmieňujúci MR, a zisťovala sa tak možná súvislosť génov s MR.

Celý tento postup viedol k rozdeleniu všetkých CNV, ktoré neboli klasifikované ako pravdepodobne bezvýznamné nálezy a boli nezávisle potvrdené, na známe patogénne CNV (identifikované už v prvom kole analýzy), pravdepodobne patogénne CNV a CNV nejasného klinického významu. Medzi jasne patogénne CNV boli zaradené CNV podmieňujúce známe, už dobre popísané syndrómy, CNV zahrňujúce gény už asociované s MR, či CNV veľkého rozsahu. Medzi pravdepodobne patogénne CNV boli zaradené zatiaľ nedetegované aberácie zahrňujúce gény, ktoré neboli asociované s MR, avšak u ktorých sa dá predpokladať, že by súvis s MR mohli mať na základe ich expresie v mozgu, ich role pri neurálnom vývoji alebo neurálnych funkciách, ich zaujímavých interakčných partnerov alebo na základe preukázanej úlohy podobných génov v MR. Do tejto kategórie boli zaradené aj aberácie popísané ako kazuistiky u iba veľmi obmedzeného počtu pacientov s MR. Ostatné CNV boli klasifikované ako CNV nejasnej signifikancie.

#### 4.5.2. Príklad postupu analýzy u vybraného pacienta

Mikrodelécia 15q13.1 a mikroduplicácia 22q11.2, ktoré boli u nášho vzorového pacienta cze075 identifikované a predbežne klasifikované ako patogénne, boli nezávisle overené. Mikrodelécia 15q13.1 bola u pacienta potvrdená metódou FISH a mikroduplicácia 22q11.2 komerčným kitom MLPA. Tieto metódy boli použité aj na vyšetrenie rodičov, ktoré ukázalo, že zatiaľ čo mikrodelécia 15q13.1 vznikla *de novo*, mikroduplicácia 22q11.2 je zdedená od otca. Otec bol charakterizovaný ako bradypsychický, ale v každom prípade bol postihnutý podstatne miernejšie ako jeho syn. Obidve aberácie sa opakovane nachádzajú v databázach aberácií u pacientov a v literatúre. Ohľadne kauzality prvej aberácie existovala v literatúre kontroverzia, ale teraz sa klasifikuje skôr ako patogénna. Druhá aberácia je považovaná za jasne patogénnu, hoci jej fenotypový prejav je takisto veľmi heterogénny a často býva zdedená od zdanlivo normálneho rodiča. Podrobnejšie sú obe aberácie popísané v kapitole 4.6.2. Pacient cze075p je zaujímavý tým, že obe aberácie sa možno navzájom potencujú vo vytváraní jeho fenotypu MR.

#### 4.5.3. Prehľad klasifikácie nálezov po druhom kole analýzy

Celkovo bolo do skupiny pravdepodobne patogénnych CNV zaradených 19 CNV u 11 pacientov. Šlo buď o samotné CNV považované za pravdepodobne patogénne, či

za pravdepodobne patogénnu bola považovaná vzájomná kombinácia viacerých CNV. Ako aberácia s nejasnou klinickou signifikanciou bolo klasifikovaných 39 CNV u 34 pacientov. CNV s nejasnou klinickou signifikanciou niesli v genóme aj traja pacienti s iným CNV klasifikovaným už ako patogénne a traja pacienti s iným CNV klasifikovaným ako pravdepodobne patogénne. Prehľad všetkých detegovaných CNV, ktoré boli potvrdené nezávislou metódou, a ich následné zaradenie do jednotlivých kategórií ponúka Tabuľka 20.

Tabuľka 20: Prehľad všetkých detegovaných CNV, u ktorých bolo prevedené overenie nezávislou metódou a zaradenie do kategórií. Ľ – ľahká MR, S – stredne ťažká MR, Ť – ťažká MR, H – hlboká MR, A – adopcia, farebne zvýraznení sú pacienti s vopred známym nálezom pred zaradením do súboru.

pacient	pohlavie	stupeň MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					patogénne	pravd. patogénne	nejasnej signifikancie
cze001p	♂	S	+	+	1		
cze002p	♂	Ť	+	-		3	
cze004p	♀	S	+	-	1		
cze010pC	♀	Ľ	-	+			1
cze013p	♂	S	+	-		1	
cze014p	♀	S	-	+			1
cze017p	♂	Ť	+	-		4	
cze020p	♂	S	+	-	1		
cze022p	♀	Ť	+	-		1	
cze025p	♂	S	+	-	1		
cze030p	♂	Ľ	-	-			1
cze033p	♀	S	+	-	1		
cze036p	♂	S	+	-		2	1
cze043p	♂	Ľ	-	-			1
cze047p	♀	Ť	+	-	1		
cze050p	♂	S	+	-	1		
cze051p	♂	S	-	-			1
cze053p	♀	S	+	-		1	
cze054pA	♀	S	+	-	1		
cze054pB	♀	S	+	-	1		
cze056p	♂	Ť	+	-			1
cze061pA	♂	Ľ	-	+		1	
cze061pB	♂	Ľ	-	+		1	
cze063p	♂	S	+	-			2
cze065p	♂	S	-	-			1
cze072p	♂	Ľ	+	-		1	1
cze073p	♂	S	-	-		1	
cze075p	♂	S	+	-	2		
cze077pA	♂	Ľ	+	+		3	

pacient	pohlavie	stupeň MR	syndrómová (+) / nesyndrómová (-) MR	familiárny (+) / sporadický (-) výskyt MR	CNV		
					patogénne	pravd. patogénne	nejasnej signifikancie
cze079p	♂	S	+	-			2
cze083p	♂	S	-	-			1
cze086p	♀	S	+	+			1
cze087p	♂	Ľ	-	-	1		
cze088p	♂	S	+	-			1
cze089p	♂	S	+	-	1		
cze090p	♂	S	+	-			1
cze093p	♂	Ľ	+	-			1
cze096p	♂	S	-	-			1
cze098p	♀	H	+	-			1
cze099p	♀	Ľ	-	-	1		2
cze108p	♂	S	-	-			1
cze110p	♀	S	+	-		1	1
cze114p	♀	S	+	-			1
cze119p	♀	H	-	-			1
cze124p	♀	S	-	A			1
cze126p	♂	S	-	-			1
cze139p	♂	Ľ	+	-	1		
cze140pA	♂	Ľ	-	+	1		1
cze140pB	♂	Ľ	-	+	1		
cze158p	♂	Ľ	+	-			1
cze159p	♂	Ľ	+	-	1		3
cze164p	♀	Ľ	+	-			1
cze166p	♂	S	-	-			1
cze167p	♂	Ľ	-	-			1
cze170p	♂	S	+	+			1
cze172p	♀	Ľ	-	-			1
cze178p	♂	Ť	+	-			1

Zaujímavú podskupinu nášho súboru tvorí 10 rodín (cze006, cze010, cze024, cze055, cze061, cze077, cze081, cze140, cze149 a cze168), u ktorých boli vyšetrení viac než dvaja pacienti. Vo väčšine prípadov, až v ôsmich, sa jednalo o súrodeneckú dvojicu. V jednom prípade (cze055) o sesternice prvého rádu a raz (cze149) o vzdialenejších paternálnych bratrancov. V dvoch prípadoch (cze061 a cze140) pravdepodobne podmieňoval rozvoj MR u oboch súrodencov rovnaký mikrodelečný syndróm (15q25 a 16p11.2). V ďalších dvoch prípadoch (cze010 a cze077) bolo identifikované pravdepodobne patogénne CNV, či CNV s nejasnou klinickou signifikanciou iba u jedného pacienta zo súrodeneckej dvojice. Absencia CNV u druhého postihnutého príbuzného by mohla svedčať proti kauzalite tohto CNV, ale vzhľadom na vysokú populačnú frekvenciu MR a heterogenitu jej príčin takáto situácia kauzalitu ani nevylučuje (druhý príbuzný môže mať iný genetický defekt alebo byť fenokópiou). V ostatných šiestich rodinách boli zachytené iba benígne populačné varianty, a pokiaľ má v týchto prípadoch familiárny výskyt genetický základ, musí ísť o defekt nedetegovateľný pomocou SNP array.

#### 4.6. Celkový prehľad jednotlivých nálezov podľa kategórií

##### 4.6.1. Benígne CNV

Kategória pravdepodobne bezvýznamných nálezov, ktorá zahŕňala aj bežné populačné polymorfizmy, bola podľa predpokladu a v zhode s publikovanými údajmi najpočetnejšia. Tieto CNV boli zachytené u každého z pacientov. K pôvodnému počtu 106 nositeľov iba takýchto CNV po prvom kole bioinformatickej analýzy pribudlo po nezávislom overovaní nálezov ďalších 20 pacientov, u ktorých sa nálezy predbežne zaradené do iných kategórií ukázali ako falošne pozitívne, čiže celkovo bolo takých pacientov 126.

Známe benígne CNV ležali mimo ťažisko záujmu práce, ale boli medzi nimi zaznamenané zaujímavé prípady vrátane delécií lokusu RhD, ktoré sa uplatňujú pri vytváraní Rh imunofenotypu (Obrázok 9), a variability na lokuse HLA či vo variabilných úsekoch génov *IGK/IGL/IGH* kódujúcich imunoglobulíny. Známa variabilita, vznikajúca vďaka rekombinácii, bola zachytená aj v oblastiach podmieňujúcich tvorbu čuchových receptorov či farbosleposť. Detegovaná bola taktiež variabilná oblasť zahrňujúca gén *CYP2E1* spájaný s náchylnosťou k vzniku závislosti na alkohole. Variabilita bola zachytená aj v oblasti génu *CCL3L1*, ktorého väčšie množstvo kópií v genóme je spájaných s ochranou pred vstupom vírusu HIV do bunky.

#### 4.6.2. Patogénne CNV

Patogénne CNV, kauzálne pre MR, boli zachytené u 18 pacientov zo 16 rodín. Týchto celkovo 19 aberácií už bolo opakovane popísaných v literatúre a sú jasne spojené s MR. Fenotypy pacientov s týmito aberáciami boli dobre zdokumentované v rámci viacerých štúdií. Tieto varianty sa vyskytujú v súboroch pacientov s MR relatívne častejšie, ale vzhľadom k nesmiernej genetickej heterogenite MR táto frekvencia aj tak zvyčajne neprekračuje 0,1 %. Medzi kauzálne CNV boli zaradené CNV podmieňujúce známe, dobre popísané syndrómy, CNV zahrňujúce gény jasne asociované s MR, či CNV veľkého rozsahu (väčšie ako 8 Mb).

##### Známy syndróm asociovaný s MR

U 10 pacientov z ôsmich rodín bolo zachytených osem rôznych mikrolečných či mikroduplikačných syndrómov spojených s MR (Tabuľka 21).

Tabuľka 21: Prehľad známych mikrolečných a mikroduplikačných syndrómov asociovaných s MR zachytených v súbore našich pacientov (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array).

pacient	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	cytogenetický pruh	veľkosť aberácie (bp)	pôvod aberácie
cze004p	del	21 858 916 - 22 338 671	16p12.1	479 755	pat
cze020p	del	242 951 908 - 243 763 883	1q44	811 975	dn
cze022p	del	125 708 - 338 041	10pter	212 333	dn
cze033p	del	60 543 481 - 60 981 483	2p15-p16.1	438 002	dn
cze054pA	del	41 063 083 - 41 571 673	17q21.31	508 590	dn
cze054pB	del	41 041 708 - 41 560 151	17q21.31	518 443	dn
cze075p	dup	17 257 787 - 19 792 353	22q11	2 260 091	pat
	del	27 234 439 - 28 443 879	15q13.1	1 209 441	dn
cze099p	del	29 535 521 - 30 107 306	16p11.2	571 786	mat
cze140pA	del	29 575 754 - 30 107 306	16p11.2	495 043	pat
cze140pB	del	29 575 754 - 30 107 306	16p11.2	495 043	pat

##### *Mikrolečný syndróm 16p12.1*

U pacientky cze004p bol zachytený mikrolečný syndróm 16p12.1. Táto mikrolečia je spájaná so schizofréniou a autizmom (Marshall 2008) či všeobecne s rozvojom neurovývojových ochorení (Itsara 2009). Popísaná bola u pacientov s MR, ale taktiež aj u zdravých kontrol. Mikrolečia je v 95 % prípadov zdedená, často od nepostihnutých rodičov (Girirajan 2010), a preto je skôr považovaná za rizikový faktor ako za plne penetrantnú kauzálnu mutáciu. Pri porovnaní fenotypov rodičov prenášajúcich mikroleciu a rodičov detí s mikroleciou *de novo* sa u rodičov s mikroleciou potvrdil častejší výskyt

neuropsychiatrických ochorení, porúch učenia či epilepsie. Zaujímavosťou tohto syndrómu je, že v porovnaní s kontrolami boli pacienti častejšie nositeľmi ďalšieho väčšieho CNV, ktoré pravdepodobne prispieva k ich fenotypu. Hypotetizuje sa, že u tohto syndrómu je zvlášť dôležitá ďalšia aberácia v genóme predstavujúca tzv. second hit, ktorý mikrodélciu 16p12.1 zmení z rizikového faktoru na skutočnú príčinu rozvoja neurovývojového ochorenia (Girirajan a Eichler 2010). Naša pacientka vykazuje stredne ťažkú MR, významné oneskorenie psychomotorického vývoja, enurézu a stigmatizáciu. Deléciu zdedila od nepostihnutého otca. Druhý zásah vedúci k penetrancii ochorenia u pacientky pravdepodobne nespôsobuje CNV, ale varianta nedetekovateľná pomocou SNP array (bodové mutácia) či environmentálne vplyvy. Mikrodelečný syndróm 16p12.1 patrí do kategórie CNV vznikajúcich mechanizmom NAHR. V populácii sú bežne prítomné dva haplotypy tohto regiónu, S1 a S2, pričom haplotyp S2 obsahuje navyše oproti haplotypu S1 priamo orientované LCR s vysokou homológiou sprostredkujúce NAHR. Haplotyp S2 je teda predisponujúci k prestavbám asociovaným s rozvojom ochorenia (Antonacci 2010).

#### *Mikrodelečný syndróm 1q44*

Mikrodelečný syndróm 1q44 asociovaný s MR, rastovou retardáciou, hypotóniou, oneskorením reči, mikrocefáliou, epilepsiou, abnormalitami corpus callosum či faciálnym dysmorfizmom bol zachytený u pacienta cze020p. Náš pacient so stredne ťažkou MR, oneskorením psychomotorického vývoja, hypotóniou, epilepsiou, oneskorením vývoja reči a stigmatizáciou plne zapadá do fenotypového popisu syndrómu. Od roku 2005 bola delécia v tomto regióne popísaná vo viacerých prípadoch (van Bever 2005; Boland 2007; Hill 2007; Poot 2007; Orellana 2009; Talseth-Palmer 2009; Caliebe 2010), avšak vždy bola väčších rozmerov (1,1 Mb až 9,43 Mb) a nebolo tak možné presnejšie charakterizovať gény zodpovedné za utváranie daného fenotypu. Náš pacient spolu s pacientom 2147 z databázy DECIPHER nesú najmenšie delécie zahrňujúce iba 4 gény, pričom len dva z nich, *HNRNPU* a *KIF26B*, sú potvrdenými proteín-kódujúcimi génmi. Mikrodelécie u nášho, ako aj u publikovaného pacienta, vznikli *de novo*. Kritický región dlhý 0,440 Mb, ktorý Caliebe (2010) navrhuje ako zodpovedný za syndróm, presne odpovedá týmto dvom, neskôr zachyteným, najmenším deléciám. Produkt kandidátneho génu *HNRNPU*, so zvýšenou expresiou v mozochku, patrí do rodiny heterogénnych jadrových ribonukleoproteínov a je zahrnutý v regulácii vývoja embryonálneho mozgu. Ballif (2012) na základe analýzy ďalších 22 pacientov s mikrodelečným syndrómom 1q43-q44 navrhol až tri rôzne kritické regióny: kritický región pre mikrocefáliu zahrňujúci gén *ATK3*, región pre abnormality corpus

callosum s génom *ZNF238* a taktiež región pre epilepsiu zahrňujúci gény *HNRNPU* a *FAM36A*. Takéto striktné rozdelenie je však diskutabilné. U nášho pacienta môžeme pozorovať všetky spomínané fenotypové znaky, avšak rozsah jeho delécie odpovedá iba kritickému regiónu pre epilepsiu. Ďalšia štúdia z roku 2012 (Thierry 2012) zachytila 11 nezávislých pacientov a Ballifov kritický región pre epilepsiu fenotypovo rozšírila o MR a faciálny dysmorfizmus. Ani tento navrhovaný kritický región však nevysvetľuje prítomnosť mikrocefálie a abnormality corpus callosum u nášho pacienta s tak malou deléciou.

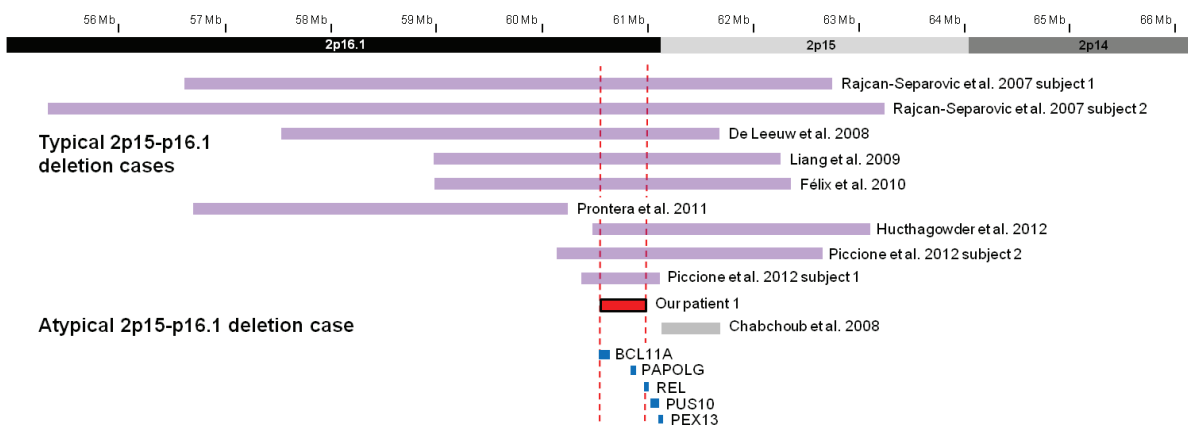
#### *Mikrodelečný syndróm 10pter*

Subtelomerická delécia 10p15.3 vzniknutá *de novo* bola zachytená u pacientky cze022p s ťažkou MR. Pacientka taktiež trpí epilepsiou, poruchou rastu, mikrocefáliou a obezitou trunkálneho typu so striami na prsiach a bruchu. Jej delécia zahrňuje iba gén *ZMYND11* a časť génu *DIP2C*. Oba gény sú exprimované v nervovom systéme, pričom *ZMYND11* kóduje zinc finger proteín s funkciou transkripčného represoru. Množstvo transkripčných faktorov už bolo asociovaných s MR (Raymond a Tarpey 2006) a *ZMYND11* by mohol obohatiť túto skupinu. Tento náš predpoklad potvrdila aj rozsiahla publikácia z júla 2012 (Descipio 2012), ktorá sumarizuje 19 pacientov so subtelomerickými deléciami v oblasti 10p15.3 a charakterizuje nový mikrodelečný syndróm. Pacienti najčastejšie vykazujú MR, oneskorenie motorického vývoja a reči, hypotóniu, abnormality mozgu, epilepsiu a faciálny dysmorfizmus. Jedná sa však o značne heterogénnu skupinu. Gén *ZMYND11*, ktorý navrhujeme ako kandidátny gén pre utváranie fenotypu našej pacientky, je deletovaný u 18 z 19 popisovaných pacientov. Rozsahu delécie našej pacientky odpovedajú dva z popisovaných prípadov zahrňujúce gény *ZMYND11* a *DIP2C* (Descipio 2012). U pacientov s dostupnými informáciami o ich fenotype tento odpovedá fenotypu našej pacientky, čo potvrdzuje predpokladanú úlohu týchto génov, minimálne vo vytváraní MR.

#### *Mikrodelečný syndróm 2p15-p16.1*

U pacientky cze033p bola zachytená mikrodelécia v regióne 2p15-p16.1. Mikrodelečný syndróm 2p15-p16.1 je nedávno popísané (Rajcan-Separovic 2007), zriedkavé ochorenie charakterizované oneskorením vývoja, MR, mikrocefáliou, rastovou retardáciou či faciálnym dysmorfizmom (de Leeuw 2008; Chabchoub 2008; Liang 2009; Felix 2010; Prontera 2010; Liu 2011b; Huchtagowder 2012; Piccione 2012). V literatúre bolo zatiaľ popísaných 10 pacientov, pričom delécia posledného z nich (Piccione 2012) zúžila kritický región zodpovedný za utváranie fenotypu tohto syndrómu na 5 proteín-kódujúcich génov. Naša

pacientka má fenotyp odpovedajúci klinickému popisu syndrómu a nesie zatiaľ najmenšiu zachytenú mikrodélciu (Obrázok 19), ktorá vznikla *de novo* na paternálnom chromozóme. Delécia zahrňuje iba 3 proteín-kódujúce gény, *BCL11A*, *PAPOLG* a *REL*, a 1 gén pre nekódujúcu RNA *FLJI6341*. Vzhľadom k fenotypovej podobnosti našej pacientky so zatiaľ zachytenými pacientmi predpokladáme, že kritický región zodpovedný za fenotyp mikrodeleného syndrómu 2p15-p16.1 sa dá zúžiť na región odpovedajúci delécii našej pacientky. Variabilnejší fenotyp pacientov s týmto syndrómom neumožňuje selekciu pacientov na základe klinického obrazu, a preto je pre potvrdenie kauzality niektorého z týchto 3 génov nutné ich sekvenovanie v rozsiahlej kohorte neselektovaných pacientov s MR. Pacientka bola opísaná v priloženej autorkinej publikácii 4.



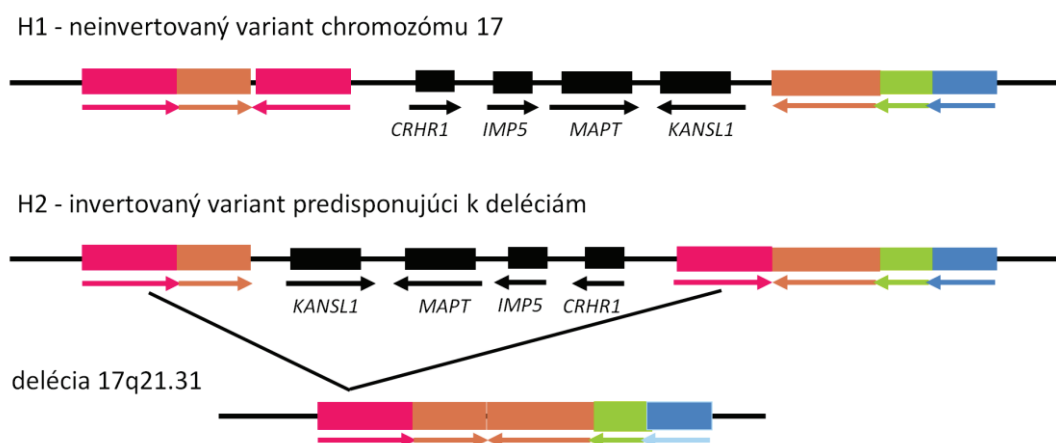
Obrázok 19: Kritický región mikrodeleného syndrómu 2p15-p16.1, vrátane delécie našej pacientky cze033p, ktorá je najkratšia medzi doteraz publikovanými deléciami.

### Mikrodelený syndróm 17q21.31

Ďalším zo známych syndrómov bol mikrodelený syndróm 17q21.31 identifikovaný u pacientok cze054pA a cze054pB, jednovaječných dvojičiek. Táto mikrodélcia bola nezávisle popísaná tromi skupinami (Koolen 2006; Sharp 2006; Shaw-Smith 2006) u pacientov so stredne ťažkou až ťažkou MR, hypotóniou, faciálnymi dysmorfickými rysmi, epilepsiou a prípadne abnormalitami srdca a vylučovacej sústavy. Ide o jeden z mála nových mikrodelených syndrómov s tak charakteristickým fenotypom, že môže byť často diagnostikovaný klinicky. Naše dve pacientky fenotypovo plne odpovedajú publikovaným prípadom, ako stredne ťažkou MR a hypotóniou, tak predovšetkým typickými faciálnymi rysmi, ako je väčší hruškovitý nos, úzka dlhá tvár, hrubé rysy či hirzutizmus. Zatiaľ všetky identifikované mikrodélcie 17q21.31 vznikli *de novo* a táto mikrodélcia nebola pozorovaná



u zdravých jedincov. Prevalencia tohto syndrómu je odhadovaná na 1/16 000 (Koolen 2008b). Rekurentná mikrodélcia oblasti 17q21.31 je podmienená špecifickou architektúrou genómu v tejto oblasti. V populácii bežne prítomný invertovaný variant chromozómu 17 má také usporiadanie LCR, ktoré predisponuje k delécii úseku medzi nimi mechanizmom NAHR (Obrázok 20).



Obrázok 20: Architektúra regiónu 17q21.31. Farebne znázornené sú bloky nízkofrekvenčných repeticí predisponujúce k vzniku delécie mechanizmom NAHR.

Delécia zasahuje 4 proteín-kódujúce gény *KANSL1* (*KIAA1267*), *MAPT*, *IMP5* a *CRHR1*, pričom gén *MAPT* bol dlho hlavným kandidátom pre pozorovaný fenotyp. Kóduje s mikrotubulami asociovaný proteín Tau exprimovaný v CNS a je spájaný s niektorými neurodegeneratívnymi ochoreniami (Ittner 2011). V apríli 2012 dve nezávislé publikácie (Koolen 2012; Zollino 2012) u 6 pacientov potvrdili, že haploinsuficiencia génu *KANSL1* je dostatočná pre vytvorenie plného fenotypového prejavu mikrodélcií 17q21.31. Nejedná sa teda o „contiguous gene syndrome“ ale o monogénne ochorenie. Proteín *KANSL1* je evolučne konzervovaný regulátor chromatinového modifikátoru KAT8, ktorý ovplyvňuje expresiu génov pomocou acetylácie lyzínu 16 histónu H4. Dôležitú úlohu génu *KANSL1* v nervových procesoch naznačujú aj poruchy učenia u mutantných octomieliek *Drosophila melanogaster*.

U rodiny cze054 bola prevedená molekulárno-genetická analýza haplotypov pomocou diagnostických SNP (Tabuľka 22). Nutnou podmienkou pre vznik aberácie u potomka je prítomnosť aspoň jednej predisponujúcej invertovanej alely H2 u aspoň jedného z rodičov. Naša analýza ukázala, že matka je homozygotná pre alelu H2 a probandky túto alelu nenesú. Delécia teda v zhode s očakávaním postihla maternálny chromozóm 17. Zaradenie tejto rodiny s vopred známou aberáciou do súboru bolo motivované aj tým, že fenotyp pacientky

cze054pB (dvojča B) bol mierne ťažší ako fenotyp jej sestry, čo vyvolávalo špekulácie o väčšom rozsahu delécie alebo inej aberácie prítomnej navyše k tejto delícii v genóme pacientky cze054pB. Tieto domnienky sa však pri použití rozlíšení nepotvrdili a prikláňame sa k tomu, že fenotypový rozdiel by mohol byť spôsobený ťažšou perinatálnou anamnézou dvojčat'a B.

Tabuľka 22: Analýza haplotypov pomocou diagnostických SNP v rodine cze054 s mikrodeleným syndrómom 17q21.31.

SNP	haplotyp H1	haplotyp H2 (invertovaný)	matka	otec	dvojča A	dvojča B
rs1800547	A	G	G/G	A/A	A/ -	A/ -
238bpdel	238+	238-	238-/238-	238+/238+	238+/-	238+/-
rs9468	T	C	C/C	T/T	T/ -	T/ -
výsledný haplotyp			H2/H2	H1/H1	H1/ -	H1/ -

#### *Mikroduplikačný syndróm 22q11.2 a mikrodelený syndróm 15q13.1*

Dve patogénne CNV boli zachytené u pacienta cze075p so stredne ťažkou MR, hyperaktivitou, dysláliou, vysokým vzrastom, makrocefáliou a miernou stigmatizáciou. Jednalo sa o mikroduplikáciu 22q11.2 zdedenú od otca a mikrodelenú 15q13.1, ktorá u pacienta vznikla *de novo*. Mikroduplikácia 22q11.2 zahrňuje rovnaký región ako ten, ktorý pri delícii podmieňuje DiGeorgov syndróm. V populácii pacientov s neurovývojovými ochoreniami je táto mikroduplikácia pomerne častá. Frekvencia výskytu mikroduplikácií je približne polovičná v porovnaní s mikrodeleniami (Portnoi 2009). Tieto prestavby tiež vznikajú mechanizmom NAHR indukovaným prítomnosťou LCR s vysokou homológiou. Delécie či duplikácie tohto regiónu sú buď „typické“, dlhé cca 3 Mb, asociované s vrodenými defektmi srdca, či „atypické“, menšie s rôznymi veľkosťami, ktoré vykazujú veľmi variabilný fenotyp, od normálneho či mierneho s poruchami učenia až po ťažkú MR s mnohými vrodenými malformáciami (Wentzel 2008). Fenotyp je tak pravdepodobne závislý na veľkosti a umiestnení aberácie a u duplikácií býva miernejší. Náš pacient je nositeľom „typickej“ duplikácie. Mikroduplikácia 22q11.2 býva zdedená od nepostihnutých rodičov a je detegovaná aj u normálnych kontrol. Prítomnosť ďalšieho CNV u pacientov s mikrodelenou či mikroduplikáciou 22q11.2 nie je zriedkavá a môže prispievať ako modifikátor k extrémnej fenotypovej variabilite tohto syndrómu (Li 2012). U nášho pacienta by takto mohla pôsobiť ďalšia detegovaná aberácia, delécia 15q13.1. Tá taktiež vzniká mechanizmom NAHR sprostredkovaným prítomnosťou LCR s vysokou homológiou medzi zlomovými bodmi BP3-BP4, v blízkosti kritického regiónu pre Prader-Willi/Angelmanov syndróm. Táto delécia bola

zatiaľ zachytená iba u siedmich pacientov (Rosenberg 2006; Sharp 2008; van Bon 2009; Rosenfeld 2011), pričom v piatich prípadoch bola zdedená, raz vznikla *de novo* a v jednom prípade nebolo možné určiť jej pôvod. Aj keď je často zdedená od nepostihnutých rodičov, pacienti s touto deléciou vykazujú spoločné znaky ako je oneskorenie vývoja, hypotónia, neprospievanie, mikrocefália, strata sluchu, poruchy zraku, nízka postava, predčasná puberta či abnormálne skorý vývin prs (Rosenfeld 2011). Mikrodelécia 15q13.1 zahŕňa 4 proteín-kódujúce gény, dva z nich zohrávajú úlohu vo funkcii nervového systému a počas vývoja. Prítomnosť spoločných fenotypových znakov a možných kandidátnych génov naznačuje, že delécia môže mať efekt na vytváranie patologického fenotypu u jej nosičov. Zaradenie delécie 15q13.1 medzi jasne patogénne sa u nášho pacienta opiera aj o jej vznik *de novo* a o výrazne ťažší fenotyp pacienta v porovnaní s jeho otcom, ktorý predáva duplikáciu 22q11. To môže podporovať rolu delécie 15q13.1 ako second hit. Je možné, že pokiaľ by bola u iného pacienta táto delécia zdedená od nepostihnutého rodiča a súčasne by tento pacient neniesol inú aberáciu, mohla by byť delécia 15q13.1 zaradená ako pravdepodobne patogénna alebo iba nejasná. Príklad kombinácie týchto dvoch aberácií ilustruje teda aj problémy s klinickou interpretáciou CNV, ktorá je závislá takisto od konkrétneho kontextu, genetického i klinického, daného CNV a je dosiaľ aj výrazne subjektívna.

#### *Mikrodelečný syndróm 16p11.2*

Ďalším nami detegovaným syndrómom bola mikrodelécia v oblasti 16p11.2. Tento syndróm je vysoko variabilný, asociovaný so širokým spektrom fenotypových prejavov s rôznou mierou závažnosti. Po prvýkrát bol zachytený u pacientov s autizmom (Kumar 2008; Weiss 2008), avšak v súčasnosti je potvrdený vplyv tejto delécie aj na rozvoj MR bez autistických znakov (Bijlsma 2009; Shinawi 2010). Delécie 16p11.2 sú taktiež asociované so skorým nástupom obezity (Bochukova 2010; Walters 2010). Naopak, u pacientov s mikroduplikáciou 16p11.2 sú pozorované poruchy príjmu potravy, výrazne znížený BMI a mikrocefália (Jacquemont 2011). Aj keď je mikrodelečný syndróm 16p11.2 asociovaný s dysmorfickými rysmi, sú natoľko variabilné, že ho nie je možné rozpoznať klinicky. Okrem MR a autizmu je veľmi často pozorovaná makrocefália, epilepsia či oneskorený vývoj reči a poruchy učenia. Vznik CNV v tomto regióne indukujú duplikované bloky LCR predisponujúce k NAHR. Mikrodelečný syndróm 16p11.2 bol zachytený u troch našich pacientov, vrátane dvoch bratov. Pacientka cze099p má ľahkú MR, oneskorenie psychomotorického vývoja, hypotóniu, epilepsiu, výrazné oneskorenie vývoja reči a faciálny dysmorfizmus. Starší z bratov cze140pA trpí oneskorením psychomotorického vývoja,

ľahkou MR, závažným oneskorením vývoja reči, hypotóniou, epilepsiou, makrocefáliou, obezitou a faciálnym dysmorfizmom. U mladšieho brata cze140pB bola zachytená ľahká MR, epilepsia, hypotónia, oneskorenie vývoja reči, dyslexia, makrocefália, obezita a faciálny dysmorfizmus. Mikrodelečný syndróm 16p11.2 vykazuje okrem veľkej fenotypovej variability (variabilnej expresivity) taktiež neúplnú penetranciu (Shinawi 2010). Niekedy vzniká *de novo*, ale často je zdedený od nepostihnutého rodiča či od rodiča manifestujúceho miernejší fenotyp. Všetci naši pacienti deléciu zdedili. Matka, ktorá deléciu predala pacientke cze099p, manifestovala miernejší fenotyp ochorenia. Taktiež ako dcéra trpela oneskorením vývoja reči a ťažkosťami s učením. Hodnota jej IQ sa nachádza na hranici subnormy a ľahkej MR, vykazuje obdobný faciálny dysmorfizmus a trpí obezitou. Otec prenášajúci aberáciu v rodine cze140 trpí poruchou učenia, dyslexiou, makrocefáliou, obezitou a jeho IQ je na hranici normy a subnormy. Typické jadro mikrodelecie 16p11.2 s dĺžkou približne 590 kb obsahuje 25 proteín-kódujúcich génov, ale gény, ktoré prispievajú k fenotypu syndrómu, nie sú zatiaľ známe. Konkrétne gény asociované s poruchami mozgu boli študované na dániách pruhovaných (zebrafish) (Blaker-Lee 2012). Ich genóm obsahuje oblasť s 22 homológmi odpovedajúcimi 25 ľudským genóm z tohto regiónu. Celá oblasť je transkripčne vysoko aktívna a dôležitá pre správny skorý vývoj organizmu dánií. Až 20 génov je nevyhnutných pre správne formovanie a veľkosť mozgu, vývoj oka, utváranie axónov, formovanie svalov a pohybových vzorcov. U každého génu bol testovaný vplyv na fenotyp pri vyradení jednej kópie. Citlivé na dávku boli dva gény, *ALDOA* a *KIF22*. Ďalšie štúdie molekulárnych dráh u človeka, v ktorých sú tieto gény zapojené by mohli odhaliť, či je tento syndróm spôsobený jedným genómom alebo či sa jedná o „contiguous gene syndrome“. Na dániách pruhovaných bola prevedená aj ďalšia štúdia zameraná na gény zodpovedné za neuroanatomické zmeny u CNV v oblasti 16p11.2 (Golzio 2012). Po injektovaní kokteilu ľudských mRNA z génov z tejto oblasti do dvojbunkových embryí dánií bolo možné pozorovať signifikantné zmeny vo veľkosti hlavy. Mikrocefalické embryá boli následne pozorované iba u nadbytku mRNA génu *KCTD13*. Aj myší model naznačuje, že gén *KCTD13* je kľúčový pre veľkosť hlavy vďaka svojej účasti v regulácii skorej neurogenézy (Golzio 2012). Mikrocefália je teda pravdepodobne spôsobená zníženou proliferáciou nervových progenitorov a zvýšenou apoptózou vo vyvíjajúcom sa mozgu, makrocefália naopak zvýšenou proliferáciou, ale bez zmien v apoptóze (Golzio 2012). Nedá sa však vylúčiť, že k anatomickému fenotypu delécií či duplikácií 16p11.2 prispievajú aj iné gény z oblasti alebo aj iný lokus.

### Známy gén asociovaný s MR

U 5 pacientov boli zachytené delécie, ktoré zahrňovali gén už asociovaný s MR (Tabuľka 23). U týchto génov už bolo preukázané, že ich haploinsuficiencia je zodpovedná za utváranie fenotypu MR.

Tabuľka 23: Prehľad známych génov asociovaných s MR, aberácie ktorých boli zachytené v súbore našich pacientov (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array).

pacient	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	cytogenetický pruh	gén	exón	veľkosť aberácie (bp)	pôvod aberácie
cze001p	del	166 818 - 6 601 195	8pter	<i>MCPHI</i>	všetky	5 188 603	mat
cze025p	del	29 806 023 - 30 383 373	15q13.3	<i>CHRNA7</i>	všetky	577 350	mat
cze050p	del	50 867 151 - 51 111 920	2p16.3	<i>NRXN1</i>	1-3	244 769	mat
cze087p	del	50 603 932 - 50 774 974	2p16.3	<i>NRXN1</i>	4-11	171 043	mat
cze159p	del	50 450 619 - 50 894 976	2p16.3	<i>NRXN1</i>	6-19	444 358	<i>dn</i>

#### *Gén MCPHI*

U pacienta cze001p bola detegovaná delécia zahrňujúca gén pre mikrocefalín (*MCPHI*), ktorého produkt je spájaný s kondenzáciou chromozómov a je zodpovedný za bunkovú odpoveď indukovanú poškodením DNA, a ktorý môže hrať úlohu pri kontrolnom bode G2/M bunkového cyklu. Mikrocefalín je exprimovaný vo vyvíjajúcej sa mozgovej kôre plodu, kde slúži ako špecifický regulátor veľkosti mozgu. Homozygotné delécie tohto génu vedú k primárnej autozomálne recesívnej mikrocefálii typu I a k syndrómu predčasnej kondenzácie chromozómov. Heterozygotné delécie a duplikácia tohto génu bez vplyvu na veľkosť mozgu boli popísané u MR a autizmu (Ozgen 2009), čo nasvedčuje, že ide o ďalší z génov citlivých na dávku (Poot 2011). V závislosti na génovej dávke či type mutácie v mikrocefalíne je možné pozorovať odlišné fenotypy. U nášho pacienta to je stredne ťažká MR, mikrocefália, hyperaktivita, oneskorenie vývoja reči bez nápadného faciálneho dysmorfizmu. Pacient deléciu zdedil od miernejšie postihnutej matky s ľahkou MR. Delécia je väčších rozmerov, a preto nie je vylúčená spoluúčasť aj ďalších génov.

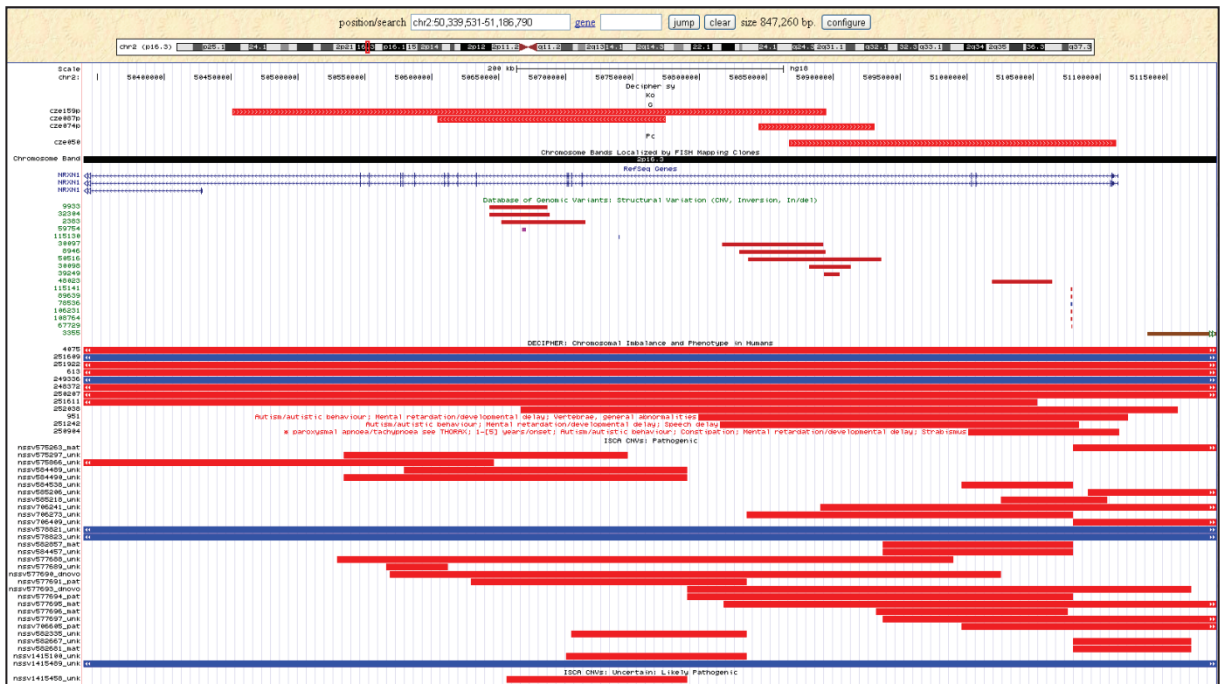
#### *Gén CHRNA7*

Ďalšou zachytenou deléciou známeho génu asociovaného s MR bola kompletná delécia génu *CHRNA7* u pacienta cze025p. Produkt génu, podjednotka alfa 7 neurónového nikotínového acetylcholinového receptora, je súčasťou rozsiahlej rodiny ligand-dependentných iónových kanálov, ktoré sprostredkujú rýchlu transmisiu signálu na synapsiách. Haploinsuficiencia génu *CHRNA7* je príčinou rozvoja neurovývojových

ochorení v rámci mikrolečného syndrómu 15q13.3. Syndróm má veľmi variabilnú expresivitu a neúplnú penetranciu. Približne v 75 % prípadov býva zdedený od mierne fenotypovo manifestujúcich či normálnych rodičov (Hoppman-Chaney 2012). Pôvodne bol popísaný u pacientov s MR (Sharp 2008). Rovnaké CNV bolo neskôr zachytené aj u pacientov s autizmom, schizofréniou a epilepsiou (Shinawi 2009; LePichon 2010). Atypické, menšie delécie u pacientov s obdobnými fenotypmi poukazovali na to, že gén *CHRNA7* je zodpovedný za fenotyp neurovývojových ochorení objavujúcich sa v rámci syndrómu. Je považovaný aj za kandidátny gén pre epilepsiu (Sharp 2008) a pre schizofréniu ako aj pre MR (Shinawi 2009; van Bon 2009). Definitívne potvrdenie kľúčovej úlohy génu *CHRNA7* vo vytváraní fenotypu mikrolečného syndrómu 15q13.3 nastalo identifikáciou 20 pacientov s deléciou zahrňujúcou iba tento gén (Hoppman-Chaney 2012). Nami zachytený pacient cze025p vykazuje stredne ťažkú MR, ako aj autistické rysy a epilepsiu, a plne tak odpovedá fenotypu pacientov s deléciou génu *CHRNA7* popísaných v literatúre.

#### *Gén NRXN1*

Jedným z našich častejšie detegovaných patogénnych nálezov bola delécia v géne pre neurexín 1 (*NRXN1*), ktorého produkty slúžia v nervovom systéme stavovcov ako molekuly bunkovej adhézie či receptory viažuce neuroligandy na synapsiách. Neurexín sa zaraďuje k najväčším ľudským génom, alternatívnym splicingom dáva vznik obrovskému množstvu izoforiem a delécie jeho rozsiahlych intrónov patria medzi bežné populačné polymorfizmy. O asociácii heterozygotnej delécie exónov génu *NRXN1* s MR po prvýkrát referoval Zahir (2007). Delécie *NRXN1* sú tiež spájané s predispozíciou k ďalším neurovývojovým ochoreniam, so schizofréniou (Rujescu 2009) a autizmom (Bradley 2010; Ching 2010), s oneskorením vývoja reči, epilepsiou, ADHD či hypotóniou (Schaaf 2012). Približne v štvrtine prípadov vznikajú *de novo*, taktiež bývajú zdedené od nepostihnutých rodičov, či od rodičov s poruchami učenia a/alebo s nejakým neuropsychiatrickým ochorením. U troch našich pacientov boli zachytené exónové delécie, benígna intrónová delécia bola zachytená v našom súbore pacientov iba raz (u pacienta cze074p) (Obrázok 21). Pacient cze087p má ľahkú MR, oneskorený vývoj reči, autistické rysy, ľahkú pravostrannú nedoslýchavosť a je hyperaktívny. Pacient cze159p je taktiež postihnutý ľahkou MR, je hyperaktívny a má autistické rysy, výkyvy nálad a miernu faciálnu stigmatizáciu. Najzávažnejšie postihnutým pacientom je cze050p, ktorý trpí stredne ťažkou až ťažkou MR, hypotóniou a makroglosiou a vykazuje závažný faciálny dysmorfizmus. V prípade pacientov cze050p a cze087p šlo o maternálne zdedené delécie, pacient cze159p nesie deléciu vzniknutú *de novo*.



Obrázok 21: Delécie v géne *NRXN1* zobrazené v rámci portálu UCSC. V smere zhora nadol viditeľné umiestnenie vybranej oblasti v rámci chromozómu, delécie u štyroch nami vyšetovaných pacientov (G, Pc), chromozómový pruh, exóny a intróny génu *NRXN1*, výstupy z databázy DGV a výstupy z rozsiahlych štúdií pacientov s MR a kontrol. Delécie zobrazované červenou farbou, duplikácie modrou. Delécie u kontrol sa nachádzajú prevažne v intrónoch, zatiaľ čo delécie u pacientov zasahujú exóny.

### Aberácie veľkého rozsahu

V súbore našich pacientov boli detegované tri aberácie veľkého rozsahu, ktoré sumarizuje Tabuľka 24.

Tabuľka 24: Prehľad aberácií veľkého rozsahu zachytených v súbore našich pacientov.

pacient	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	cytogenetický pruh	veľkosť aberácie	počet zasiahnutých génov	pôvod aberácie
cze047p	inv dup del	41 894 - 11 011 624 (del)	3p26.3-p25.3	11 Mb	90	dn
		11 011 480 - 14 852 539 (dup)	3p25.3-p24.3	4 Mb		
cze089p	del	36 587 - 13 647 571	9p	14 Mb	47	dn
cze139p	del	9 977 295 - 17 926 516	2p25.1-p24.2	8 Mb	37	dn

#### *Inv dup del(3p)*

Najrozsiahlejšiu aberáciu má pacientka cze047p. Jednalo sa o deléciu 3p26.3-p25.3 a duplikáciu 3p25.3-p24.3. Náš nález teda podporuje domnienku vyslovenú pri karyotypovaní, že sa jedná o prestavbu typu inv dup del. Aberácia vznikla *de novo*. Syndróm 3p- je asociovaný s psychomotorickou a rastovou retardáciou, MR, hypotóniou, mikrocefáliou a faciálnym dysmorfizmom. Fenotyp pacientov varíruje od normálneho až k veľmi

závažnému v závislosti na rozsahu delécie, avšak aj u veľkých delécií bol zaznamenaný mierny fenotyp, najmä u zriedkavých zdedených prípadov (Pohjola 2010). Naša pacientka trpí ťažkou MR, epilepsiou, mikrocefáliou, cerebelárnym syndrómom, osteoporózou, ľahkou bilaterálnou nedoslýchavosťou, gastroezofageálnym refluxom a faciálnym dysmorfizmom ako kongenitálnou ptózou, blefarofimózou či epikantmi. Za kandidátne gény zodpovedné za vytváranie MR u syndrómu 3p- sú považované gény *CHL1* a *SRGAP3* (Shuib 2009). Produkt génu *CHL1* patrí do rodiny molekúl sprostredkujúcich adhéziu neurálnych buniek, a podieľa sa na vývoji nervového systému. Na druhú stranu, pretože sú delécie génu *CHL1* často zdedené od normálnych rodičov, nie je ich klinická interpretácia v súčasnosti jednoznačná (Pohjola 2010; Cuoco 2011). Z tohto dôvodu je aj malá delécia *CHL1* nájdená u nášho ďalšieho pacienta cze043p zaradená ako nejasná (viď 4.6.4), lebo je v rodine cze043 predávaná cez dve generácie nepostihnutých mužov. *SRGAP3* kóduje GTP-ázu aktivujúci proteín, regulujúci bunkovú migráciu ovplyvňovaním dynamiky aktínového a mikrotubulového cytoskeletu. Fenotyp našej pacientky môže byť ovplyvnený aj zmenenou dávkou mnohých iných génov z deletovaného úseku ako aj génov z úseku duplikovaného. Pacientka môže slúžiť aj ako príklad neplánovaného generovania informácie (incidentalomu): nami spresnený rozsah delécie zahŕňa aj gén *VHL*, a pacientka tak má riziko nádorov podobné ako majú nosiči klasických zárodočných mutácií v tomto géne.

### *Delécia 9p*

U pacienta cze089p bola detegovaná 14 Mb dlhá delécia 9p24.3-p23 vzniknutá *de novo*. Syndróm 9p- je charakterizovaný vývojovým a mentálnym oneskorením, atypickým tvarom hlavy, najčastejšie trigonocefáliou, hypopláziou strednej tvárovej časti a ďalšími dysmorfickými rysmi. Prítomné bývajú orgánové vady ako defekty srdca, umbilikálne či inguinálne hernie a abnormity chrbtice a prstov. U mužských pacientov sa vyskytujú gonadálne dysgenézy v zmysle vývoja ženského externého genitálu (Barbaro 2009). U nášho pacienta bola pozorovaná stredne ťažká MR, atypický autizmus, trigonocefália a ďalší faciálny dysmorfizmus. Pacient sa javí o niečo starší, čo sa týka telesného aj pohlavného vývoja. Aj v rámci tohto syndrómu je viditeľná značná variabilita. U nášho pacienta je, netypicky, normálny vývoj mužských pohlavných orgánov, hoci aj takí pacienti už boli v literatúre popísaní (Onesimo 2012).



## *Delécia 2p*

Ďalšou zachytenou aberáciou veľkého rozsahu bola *de novo* delécia 2p24.2-p25.1 u pacienta cze139p. Delécie 2p sú veľmi zriedkavé, v literatúre bolo popísaných zatiaľ len 6 prípadov (Su 2010; Shoukier 2012), pričom obdobná delécia ako u nášho pacienta bola popísaná iba raz (Saal 1996). Publikovaný pacient mal MR, hypotóniu, mikrocefáliu, trigonocefáliu, nízku postavu, mierny faciálny dysmorfizmus a poruchu sluchu. Náš pacient trpí oneskorením vývoja, ľahkou MR, mikrocefáliou, malým vzrastom, oneskorením vývoja reči, faciálnym dysmorfizmom tvoreným širším nosom, miernymi epikantami a dlhým filtrom. Pacient cze139p má taktiež nápadne krátke prsty, ktoré sa kónicky zužujú. V deletovanej oblasti sa nachádza gén *MYCN*, kódujúci DNA viažuci proteín, pôsobiaci ako transkripčný faktor. Je preferenčne exprimovaný v centrálnom a periférnom nervovom systéme embrya, ako aj v pľúcach, obličkách a očiach. Jeho heterozygotné delécie podmieňujú rozvoj autozomálne dominantného Feingoldovho syndrómu s obdobnými príznakmi, ktoré má náš pacient a aké boli zachytené u väčších delécií 2p.

### 4.6.3. Pravdepodobne patogénne CNV

Pravdepodobne patogénne CNV boli zachytené u 11 pacientov z 10 rodín. Skupina 19 CNV zahŕňala 9 individuálnych aberácií u 8 pacientov zo 7 rodín a tri novo vzniknuté kombinácie viacerých CNV u troch pacientov z troch rodín (Tabuľka 25). Táto skupina zahŕňa veľmi široké spektrum aberácií od defektov už popísaných u malého množstva pacientov, u ktorých fenotyp vykazuje podobnosť s našim pacientom, až po zatiaľ nikdy nedetegované aberácie, či aberácie zahrňujúce gén, ktorý ešte nebol asociovaný s MR, avšak mohol by byť dobrým kandidátnym génom pre MR. Tieto pravdepodobne kauzálne nálezy majú zatiaľ len veľmi obmedzené klinické využitie, ale sú zaujímavé výskumne.

Tabuľka 25: Prehľad pravdepodobne patogénnych CNV zachytených v súbore našich pacientov (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array).

pacient	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	cytogenetický pruh	veľkosť aberácie (bp)	gén / syndróm / kombinácia	pôvod aberácie
cze002p	dup	106 765 625 - 107 275 024	2q12.3	509 399	kombinácia viacerých aberácií	mat
	dup	138 794 348 - 139 629 602	9q34.3	835 254		<i>dn</i> alebo pat (dostupná iba matka)
	del	93 288 056 - 94 374 146	15q26.2	1 086 090		mat
cze013p	del	51 801 299 - 52 737 892	12q13	936 593	vrátane <i>HOXC</i>	<i>dn</i>
cze017p	dup	33 977 113 - 34 785 173	5p13.2-p13.3	808 060	kombinácia viacerých aberácií	pat
	del	22 437 563 - 23 802 315	13q12.12	1 364 752		pat
	del	96 283 870 - 99185361	14q32.2	2 901 491		mat
	dup	3 737 824 - 4 591 983	19p13.3	854 159		pat
cze036p	del	170 194 319 - 170 797 310	1q24.3	602 991	del <i>DNM3</i> a <i>PLAGL1</i> na zlomoch zdanlivo balancovanej translokácie	<i>dn</i>
	del	142 211 174 - 144 665 837	6q24.1-q24.2	2 454 663		<i>dn</i>
cze053p	del	85 784 890 - 87 547 315	9q21.33	1 762 425	<i>TRKB</i>	<i>dn</i>
cze061pA	del	82 743 638 - 83 515 133	15q25	771 496	nový mikrolečný sy.	mat
cze061pB	del	82 743 638 - 83 515 133	15q25	771 496	nový mikrolečný sy.	mat
cze072p	del	82 743 638 - 83 515 133	15q25	771 496	nový mikrolečný sy.	mat
cze073p	del	62 013 232 - 65 731 466	2p14-p15	3 691 529	nový mikrolečný sy.	<i>dn</i>
cze077pA	del	107 449 221 - 107 518 947	9q31.2	69 727	kombinácia viacerých aberácií	mat
	dup	51 738 304 - 51 830 868	10q11.23	92 565		pat
	del	20 305 686 - 20 667 673	15q11.2	361 987		pat
cze110p	del	62 712 112 - 65 528 608	17q24.3	2 816 497	<i>MAP2K6</i>	<i>dn</i>

### *Mikrodelécia 12q13 vrátane clustru HOXC*

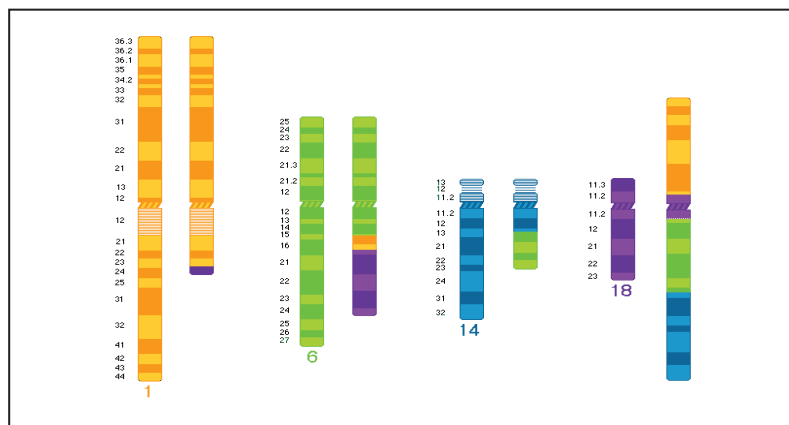
Delécia 12q13 dlhá asi 1 Mb a vzniknutá *de novo* bola detegovaná u pacienta cze013p. Pacient trpí stredne ťažkou MR, srdcovou vadou, hypotóniou, mikrocefáliou, faciálnou stigmatizáciou, insuficienciou spojivového tkaniva a má gracilný skelet, disproporcionálny habitus (dlhší, abnormálne úzky trup a kratšie končatiny) a atypický úchop ruky. Delécia zahŕňa okrem 20 ďalších génov taktiež kompletný cluster *HOXC* génov. *HOX* gény sú evolučne veľmi konzervované a zohrávajú kľúčovú úlohu vo vytváraní telesného plánu počas embryonálneho vývoja. V literatúre boli zatiaľ popísaní dvaja pacienti s heterozygotnou deléciou celého clusteru *HOXC* a príľahlých génov (Okamoto 2011; Jonsson 2012). V oboch prípadoch bola delécia clustra *HOXC* pokladaná za príčinu ich psychomotorickej retardácie a skeletálnych abnormalít. Homozygotná delécia clustra *HOXC*, zahrňujúca všetkých 9 génov, vedie u myší k smrti pri narodení v dôsledku defektu respiračného traktu (Suemori a Noguchi 2000). Prekvapivo však neboli pozorované drastické malformácie skeletu ani defekty vnútorných orgánov a navonok bola zjavná iba absencia fúzikov. Heterozygotná delécia nevedla u myší k žiadnemu pozorovateľnému fenotypu. Malformácie u myší

s homozygotnými deléciami celého clustra génov *HOXC* boli miernejšie ako u myši s knock-outami jednotlivých génov *HOXC*, u ktorých sa predpokladá strata kontroly nad susediacimi *HOX* génmi a ich deregulácia a/alebo hyperaktivácia. Pri delécii celého clustra *HOXC* je morfogenéza riadená iba *HOX* génmi z iných clustrov, čo vedie k takmer úplne normálnemu vývoju skeletu. Predpokladá sa, že hlavnú funkciu pri formovaní telesného plánu majú clustre *HOX A* a *D*, pričom clustre *HOX B* a *C* majú iba dolad'ovaciu funkciu (Suemori a Noguchi 2000). Situácia u človeka však nie je jasná. Pochybnosti vnáša aj prítomnosť génu *HOTAIR* v rámci clustra, ktorého produkt, dlhá nekódujúca RNA, reguluje expresiu génov *HOXD* u ľudí, ale nie u myši, čo pridáva ďalší stupeň komplexity. Teoreticky by však delécia clusteru *HOXC* u nášho pacienta mohla vysvetliť jeho disproporcionálny habitus. Ďalším z kandidátov pre skeletálne anomálie je gén *RARG*, transkripčný faktor, ktorého produkt je vyžadovaný pre skeletálny rast a funkciu rastovej platničky v dlhých kostiach. Avšak delécia pacienta popísaného Okamoto (2011) tento gén neobsahuje. Gén *SP7*, ktorý chýba u všetkých troch pacientov, takisto produkuje transkripčný faktor špecifický pre kosti. Prekryv delécií všetkých troch pacientov zahŕňa tiež kandidátne gény pre MR exprimované v mozgu, ako *ZNF740*, kódujúci zinc finger proteín, a *SPI*, kódujúci transkripčný faktor regulujúci prežitie neurónov. *SPI*<sup>+/-</sup> myši boli menšie, ale bez ďalších zjavných abnormalít, zatiaľ čo *SPI*<sup>-/-</sup> embryá trpeli závažnými defektmi vývoja (Marin 1997). Delécie u všetkých troch pacientov zahŕňujú aj gén *ESPL1*, ktorého produkt zohráva hlavnú úlohu pri segregácii chromozómov, gén *PFDN5* kódujúci podjednotku jedného zo chaperonov stabilizujúceho novo syntetizované polypeptidy, či gén *ATF7*, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri skoršej bunkovej signalizácii. Dôležitú úlohu môže zohrávať aj gén *ATP5G2*, ktorý kóduje podjednotku mitochondriálnej ATP syntázy. Delécie zasahujú aj gén *MAP3K12* (*MUK*), člena MAP kinázovej kaskády, ktorý taktiež spolupracuje s génom *MAPK14* ako v prípade génu *MAP2K6* u pacientky cze110p spomínanej nižšie. Aj keď ani u tejto MAP kinázy nebol v literatúre popísaný žiaden defekt, ich funkcia je tak závažná, že by sa delécia génu mohla podieľať na fenotype pacientov. Predpokladáme, že tieto tri prípady predstavujú nový mikrodelečný syndróm. Pacient bol opísaný v priloženej autorkinej publikácii 5.

#### *Delécia DNM3 a PLAGL1*

U pacienta cze036p boli v karyotype nájdené 4 derivované chromozómy – 1, 6, 14 a 18, vzniknuté *de novo*. Vzhľadom k vysokej komplexnosti prestavby nebolo možné stanoviť zlomové miesta iba z karyotypu, a tak bolo prevedené vyšetrenie mBAND a mFISH (obe

vyšetrenia Zuzana Zemanová, ÚLBLD 1. LF UK a VFN) a prestavba bola charakterizovaná ako balancovaná (Obrázok 22).



Obrázok 22: Schematické znázornenie komplexnej translokácie u pacienta cze036p.

Pacient vykazuje stredne ťažkú MR, epilepsiu, oneskorený vývoj reči a malý vzrast. Vyšetrenie pomocou SNP array odhalilo kryptické aberácie v okolí zlomov, ktoré by mohli vysvetľovať tento abnormálny fenotyp. Zachytili sme 0,6 Mb dlhú deléciu na paternálnom chromozóme 1q24.3, ktorá zahŕňa gén *DNM3*. Dynamín 3 kódovaný týmto génom viaže postsynaptický adaptorový proteín Homer. U pacientov s prekrývajúcimi sa deléciami, ktoré zahŕňujú gén *DNM3*, bola taktiež pozorovaná MR a oneskorenie reči (Kibe 2010; Nishimura 2010). V ďalšom mieste zlomu v 6q24.1-q24.2 sme zachytili 2,5 Mb dlhú deléciu, ktorá taktiež vznikla na paternálnom chromozóme. Táto delécia, mimo iné, zahŕňa napríklad gén *PLAGL1*, kódujúci inhibítor proliferácie a podliehajúci imprintingu. V literatúre popisovaní pacienti so stratou paternálnej kópie tohto génu vykazujú intrauterinnú rastovú retardáciu (IUGR), rastovú retardáciu či skorý nástup oneskorenia vo vývoji (Nowaczyk 2008).

#### *Delécia TRKB*

Ďalšou zachytenou aberáciou bola 1,7 Mb dlhá delécia 9q21.33 u pacientky cze053p, ktorá vznikla *de novo*. Delécia zahŕňa gén *TRKB* (*NTRK2*), ktorého produkt TrkB patrí k neurotrofinovým receptorom, konkrétne predstavuje receptor pre neurotrofinový faktor BDNF. Neurotrofiny regulujú vývoj a funkciu nervového systému u stavovcov, aktivujú množstvo signálnych dráh vrátane dráh G proteínov ras/rho či MAP kinázy. Regulujú prežitie, proliferáciu a diferenciáciu neurónov, rast axónov, neurotransmisiu a synaptické deje, v dospelom nervovom systéme kontrolujú synaptickú plasticitu (Huang a Reichardt 2001). Všetky tieto funkcie, ktoré gén *TRKB* zastáva v organizme, naznačujú, že je dobrým kandidátnym génom pre MR. Z literatúry je zatiaľ známy len jediný prípad defektu *TRKB*,

a to heterozygotná *de novo* mutácia typu missense u pacienta s oneskorením psychomotorického vývoja, hypotóniou, epilepsiou, oneskorením vývoja reči, hyperfágiou a výraznou obezitou so skorým nástupom (Yeo 2004). Naša pacientka má stredne ťažkú MR, hypotóniu a defekty srdca a kĺbov. Obezitou však netrpí.

### *Mikrodelécia 15q25*

U 3 pacientov, cze072p a súrodeneckej dvojice cze061pA a cze061pB, bola zachytená 770 kb dlhá mikrodelécia 15q25.2-q25.3 maternálneho pôvodu. Región 15q25 obsahuje 4 bloky priamo orientovaných LCR (LCR15q25A-D) s viac než 98% sekvenčnou identitou. Mikrodelécie u našich pacientov vznikli pravdepodobne mechanizmom NAHR medzi LCR15qC a LCR15qD a zahrňujú 8 proteín-kódujúcich génov. Prvým zachyteným pacientom s mikrodeléciou v tejto oblasti bol pacient s autizmom (Christian 2008), neskôr boli detegovaní dvaja pacienti so schizofréniou (Itsara 2009). V rámci rozsiahlej štúdie bolo v roku 2011 zachytených ďalších 5 pacientov s mikrodeléciou obdobnej veľkosti (Cooper 2011), pričom dvaja z nich boli súrodenci s autizmom, psychomotorickým oneskorením a s oneskorením vývoja reči. U ďalšieho bolo pozorované oneskorenie psychomotorického vývoja a epilepsia. Štvrtý pacient mal oneskorenie psychomotorického vývoja sprevádzané oneskorením vývoja reči a neprospievaním. Posledný zo zachytených prípadov v literatúre vykazoval iba mierne motorické oneskorenie, hypotóniu a strabizmus. Náš pacient cze061pA, mladší zo súrodencov, má oneskorenie psychomotorického vývoja, ľahkú MR, detský autizmus, oneskorenie vývoja reči, makrocefáliu a makrozómiu. Starší z bratov, cze061pB, má taktiež oneskorený psychomotorický vývoj, ľahkú MR, výrazné oneskorenie vývoja reči, autizmus a obezitu. Pacient cze072p má oneskorenie psychomotorického vývoja s oneskorením vývoja reči, ľahkú MR, mikrocefáliu a chorioretinitis. Predávajúca matka cze061m vykazuje normálny fenotyp, matka cze072m je bradypsychická. Aj napriek tomu, že sú fenotypové popisy pacientov v literatúre veľmi strohé, je možné vybadať spoločné rysy. Mikrodelécia 15q25.2-q25.3 zahrňuje gén *ZNF592* podieľajúci sa na regulácii génov ovplyvňujúcich vývoj mozgu. Produkt génu *PDE8A* je zahrnutý v procese učenia a pamäte. Gén *NMB* môže objasniť ďalší z fenotypových znakov, pretože je asociovaný s reguláciou váhy tela a obezitou. Domnievame sa, že dostupné dáta o deléciách 15q25.2-q25.3 s príspevom našich pacientov naznačujú, že by sa mohlo jednať o ďalší nový mikrodelečný syndróm predisponujúcich k neuropsychiatrickým ochoreniam. Fenotypová variabilita môže byť dôsledkom neúplnej penetrancie a variabilnej expresivity. Nie je vylúčená ani spoluúčasť iného defektu kdekoľvek v genóme pacienta pôsobiaceho ako second hit.

### *Mikrodelécia 2p14-p15*

U pacienta cze073p bola diagnostikovaná rozsiahla delécia 2p14-p15. V literatúre boli zatiaľ zachytené len 3 prípady prekrývajúcich sa delécií v tejto oblasti (Kaminsky 2011; Wohlleber 2011) spájané s ľahkou až stredne ťažkou MR, oneskorením psychomotorického vývoja, oneskorením vývoja reči či jej úplnou absenciou a minimálnym faciálnym dysmorfizmom. Mikrodelécia vzniká u pacientov *de novo* (údaje o jednom pacientovi Kaminsky 2011 nie sú dostupné). Záchyt nášho pacienta tak prispel k definovaniu možného nového mikrodelečného syndrómu 2p14-p15. Závažnosť oneskorenia vývoja a hlavne reči a celkový klinický obraz možno koreluje s veľkosťou delécie, najvýraznejšie postihnutie nesie náš pacient s najväčšou spomedzi publikovaných aberácií, zahrňujúcou 18 proteín-kódujúcich génov a 6 génov pre nekódujúcu RNA. Pacient bol opísaný v priloženej autorkinej publikácii 6.

### *Delécia MAP2K6*

U pacientky cze110p bola zachytená *de novo* delécia 17q24.3. Delécia zahrňuje gén *MAP2K6* (*MKK6*), ktorého produkt patrí medzi MAP kinázy. Tie sa zúčastňujú širokého spektra bunkových pochodov ako je regulácia expresie génov, mitóza, bunková diferenciácia a proliferácia, ale aj programovaná bunková smrť. Konečná MAP kináza je aktivovaná niekoľkostupňovou fosforylačnou kaskádou kináz. *MAP2K6* pôsobí v závere kaskády a aktivuje konečnú p38 MAP kinázu. Kaskáda MAP kináz je veľmi dôležitá pri vývoji normálnych kognitívnych funkcií, čo potvrdzujú defekty viacerých jej členov vedúce k rozvoju neurovývojových ochorení (Kaufman 2010). Produkt génu *MAP2K6* úzko spolupracuje s piatimi MAP kinázami, medzi nimi aj s produktom génu *MAPK14* (Obrázok 23), ktorý má zásadnú úlohu pri vytváraní niektorých cytokínov. Gén *MAPK14* je ďalej asociovaný s génom *RPS6KA3*, ktorého defekty podmieňujú rozvoj X-viazanej nesyndrómovej MR (Field 2006). Defekt génu *MAP2K6* zatiaľ v literatúre nebol nepísaný, ale ide pravdepodobne o ďalší kandidátny gén pre MR. U tejto pacientky bola diagnostikovaná stredne ťažká MR, malý vzrast, ktorý nadväzuje na IUGR, hraničná mikrocefália či klinodaktýlia malíčkov ruky spolu s miernym faciálnym dysmorfizmom. Pre kauzalitu delécie svedčí aj jej dĺžka. Je takmer 3 Mb dlhá a obsahuje aj viaceré ďalšie gény.



Obrázok 23: Mapa známych génových interakcií génu *MAP2K6* zahrnutého v delécii pacientky cze110p. Vytvorené pomocou webovej aplikácie String.

### *Kombinácia 3 aberácií u pacienta cze077pA*

Najnovšie pozorovania ukazujú, že prítomnosť iba dvoch väčších aberácií nejasnej klinickej signifikancie v genóme je osemkrát častejšia u detí s vývojovým oneskorením v porovnaní s nepostihnutými kontrolami (Girirajan 2012), a preto aj my považujeme kombinácie viacerých veľkých aberácií u troch pacientov za pravdepodobne patogénne. Rolu môže zohrávať aj presun zdedenej aberácie na jedinca iného pohlavia alebo s iným génovým pozadím. Obecne sa za rizikovejšie pohlavie pre MR považujú muži (Girirajan 2012) a všetci naši pacienti s kombináciami viacerých aberácií sú chlapci.

Prvá kombinácia 3 rôznych rozsiahlych aberácií, o ktorých predpokladáme, že sa môžu spolupodieľať na MR, bola zachytená u pacienta cze077pA. Ten trpí psychomotorickou retardáciou, epilepsiou, hypotóniou, poruchou imunity a oneskorením vývoja reči. Má ľahkú umbilikálnu herniu, dyskinetické pohyby, makrozómiu a väčšie, ľahko odstávajúce uši.

Pacient je nositeľom delécie 9q31.2, ktorú zdedil od nepostihnutej matky. Delécia zahŕňa iba gén *TAL2* a časť génu *TMEM38B*, pričom tieto gény navzájom úzko spolupracujú. Translokácie zasahujúce gén *TAL2* môžu spôsobovať akútnu lymfoblastickú leukémiu (Marculescu 2003). Spolupráca génu *TAL2* s génom *MAPK3* by sa mohla podieľať na pacientovej MR, keďže ide o ďalšiu z radu MAP kináz. Delécia pacienta cze077pA v nami použitom rozlíšení začína tesne za génom *FKTN*, nie je však vylúčené, že zasahuje aj tento gén, či jeho regulačné oblasti. Gén *FKTN* hrá dôležitú úlohu vo vývoji mozgu, je vysoko exprimovaný vo fetálnom aj dospelom mozgu, migrujúcich i kortikálnych neurónoch, v hippocampových aj mozočkových bunkách. Defekty *FKTN* spôsobujú autozomálne recesívne ochorenie MDDGA4 charakterizované svalovou dystrofiou, hypotóniou, MR

a epilepsiou (Vuillaumier-Barrot 2009). U nášho pacienta však svalová dystrofia nie je prítomná.

Ďalšou aberáciou je duplikácia 10q11.23 zdedená od nepostihnutého otca. Zahrňuje jediný gén *SGMS1* preferenčne exprimovaný v mozgu. Je nevyhnutný pre bunkový rast a potláča apoptózu. Testovanie efektu zvýšenej expresie tohto génu bolo prevedené na ovariálnych bunkách škrečka čínskeho (*Cricetulus griseus*) (Ding 2008). Zvýšená expresia viedla k signifikantnému zvýšeniu hladín sfingomyelínu a diacylglycerolu. Dochádzalo k častejšej lýze takto pozmenených buniek a signifikantnému zvýšeniu apoptózy.

Treťou aberáciou je mikrodéliecia 15q11.2 paternálneho pôvodu. Mikrodéliecie 15q11.2 majú zatiaľ nejasnú klinickú signifikanciu a sú podrobnejšie popísané v kapitole 4.6.4.

Predpokladáme, že kombinácia týchto aberácií by mohla prispievať k pacientovmu fenotypu. V prípade delécie 9q31.2 a génu *FKTN* je prítomnosť mutácie druhej alely nepravdepodobná vzhľadom k neprítomnosti svalovej dystrofie u pacienta, ale miernejší prejav ochorenia vďaka kombinácii s ďalšími prítomnými CNV nie je vylúčený. Duplikácia 10q11.23 a zvýšená expresia *SGMS1* by mohla spôsobovať zvýšené odumieranie buniek mozgu, kde je tento gén u človeka exprimovaný, a spôsobovať tak MR. Patogenita samotnej mikrodéliecie 15q11.2 je diskutovaná, často je však defekt považovaný za rizikový faktor pre rozvoj neurovývojových ochorení, ktorým môže byť aj u pacienta cze077pA. Je možné, že zatiaľ čo prenášačstvo jednotlivých aberácií je u rodičov tolerované, ich novo vzniknutá kombinácia u pacienta má za následok už netolerovateľnú dysbalanciu dôležitých bunkových dráh a patologický fenotyp.

#### *Kombinácia 4 aberácií u pacienta cze017p*

Obdobne pacient cze017p má 4 rôzne aberácie, ktoré by vzájomným pôsobením mohli spôsobovať MR. Všetky sú zdedené od nepostihnutých rodičov. Pacient je veľmi ťažko postihnutý, má ťažkú MR, mikrocefáliu, hypotóniu, epilepsiu, deformity dolných končatín, strabizmus a výrazný faciálny dysmorfizmus.

Rozsiahla deléciecia 13q12.12 zdedená od nepostihnutého otca zahŕňa 7 génov. Najzaujímavejším z nich je gén *TNFRSF19*, člen superrodiny TNF receptorov. Je vysoko exprimovaný počas embryonálneho vývoja, aktivuje jednu z možných MAP kinázových dráh, taktiež je schopný indukovať apoptózu, a predpokladá sa preto, že hrá nevyhnutnú úlohu v embryonálnom vývoji (Eby 2000).

Ďalšou z aberácií je takmer 3 Mb deléciecia 14q32.2 zdedená od nepostihnutej matky. V delécii sa nachádza gén *BCL11B* kódujúci zinc finger proteín, ktorý úzko spolupracuje



s génom *BCL11A*, jedným z troch nami identifikovaných možných kandidátov pre MR u mikrolečného syndrómu 2p15-p16.1 (viď 4.6.2).

Paternálne zdedená jedinečná duplikácia 19p13.3 obsahuje až 33 génov, medzi nimi aj gén *MAP2K2* (*MEK2*), ďalšieho člena MAP kinázovej rodiny. Táto kináza má kritickú úlohu pri signálnej transdukcii mitogénneho rastového faktoru. Mutácie *MAP2K2* spôsobujú autozomálne dominantné ochorenie syndróm CFC (cardiofaciocutaneous syndrome), charakterizované defektmi srdca, MR a typickým faciálnym dysmorfizmom. Zvýšená expresia génu *DAPK3*, taktiež zahrnutého v duplikácii, indukuje v cicavčích bunkách morfológické zmeny počas apoptózy (Kawai 1998).

Poslednou z aberácií je od otca zdedená duplikácia 5p13.2-p13.3 zahrňujúca 4 gény. Zaujímavým z nich je gén *AMACR* kódujúci racemázu, mutácie ktorej spôsobujú autozomálne recesívnu sensorimotorickú neuropatiu s nástupom v dospelosti (Ferdinandusse 2000).

Aj u pacienta cze017p si je možné predstaviť, že zdedenie kombinácie aberácií, ktoré sú samotné tolerovateľné a bez efektu, môže spôsobiť nežiaduci fenotypový prejav.

#### *Kombinácia 3 aberácií u pacienta cze002p*

Tri rôzne aberácie, ktoré by sa mohli podieľať na fenotype, boli detegované aj u pacienta cze002p. Pacient má ťažkú MR, epilepsiu, mikrocefáliu, hypotonický syndróm, regres vo vývoji, čiastočnú flexiu horných aj dolných končatín pre kĺbové kontraktúry, kyfózu, pedes planovalgi a významný predkus.

Maternálne zdedená duplikácia 2q12.3 obsahuje jediný gén *ST6GAL2*, ktorý je exprimovaný vo fetálnom a dospelom mozgu. Má až 95% sekvenčnú identitu s príbuzným génom *ST3GAL3*, ktorý bol nedávno postulovaný ako ďalší gén spôsobujúci jednu z foriem autozomálne recesívnej MR (Hu 2011). K podozreniu na možnú patogenitu tejto duplikácie prispieva aj prítomnosť dvoch pacientov s MR, 252371 a 249939, v databáze DECIPHER, ktorí sú nositeľmi obdobných duplikácií.

Ďalšou aberáciou je na gény veľmi bohatá duplikácia 9q34.3, u ktorej bol vylúčený maternálny pôvod. Z dôvodu nedostupnosti otca nie je možné potvrdiť ani vyvrátiť vznik aberácie *de novo*. Duplikácia obsahuje viacero génov silno exprimovaných v mozgu, ktorých defekty by mohli spôsobovať jeho nesprávne fungovanie. Ide napríklad o gén *NPDC1* zodpovedný za proliferáciu neurónov (Iwasaki a Toyonaga 2000), gén *ABCA2* kódujúci proteín z rodiny ATP transportérov zodpovedný mimo iného za vývoj neurónov, či gén *ZMYND19* kódujúci ďalší zo zinc finger proteínov (Bachner 2002), veľmi často asociovaných

s MR. Duplikácia obsahuje aj gén *TRAF2*, ktorého produkt patrí do rodiny asociovej s TNF receptormi zahrnutými v MAP kinázovej dráhe a podieľa sa na TNF-indukovanej apoptóze.

Rozsiahla delécia 15q26.2 zdedená od nepostihnutej matky zahŕňa iba gén pre nekódujúcu RNA, o ktorej efekte nie sú žiadne dostupné informácie.

Aj keď u tohto pacienta neuvažujeme možný vplyv samotnej veľkej duplikácie 9q34.4, ktorá navyše možno vznikla *de novo*, je u neho možné opäť špekulovať o možnom fenotypovom efekte novo vzniknutej kombinácie viacerých aberácií, ktoré obsahujú zaujímavé kandidátne gény.

#### 4.6.4. CNV s nejasnou klinickou signifikanciou

CNV s nejasnou klinickou signifikanciou boli zachytené u 34 pacientov. Celkovo sa jednalo o 39 aberácií, ktoré sumarizuje Tabuľka 26. Podrobnejší popis nižšie je ako príklad venovaný dvom z nich. V aberáciách týchto pacientov boli zahrnuté gény, u ktorých nie je možný súvis s MR už na prvý pohľad zjavný. V niektorých prípadoch sme sa pri zaradení do tejto kategórie opierali o publikované prípady, ktoré obdobné nálezy klasifikovali z rôznych dôvodov taktiež ako nejasné. Niektoré aberácie sú opísané vo viacerých publikáciách, ale medzi týmito prácami sú v klasifikácii kauzality aberácie často diametrálne rozpory.

##### *Mikroduplikácia Xp22.31*

Príkladom CNV s nejasnou klinickou signifikanciou je duplikácia Xp22.31 u pacienta cze090p zahrňujúca gén pre steroidnú sulfatázu *STS*. Deficiencia *STS* spôsobuje u mužov X-viazanú ichthyózu. Okrem kožných prejavov je ochorenie spojené s MR, ADHD a autizmom. Často pozorovaná je však aj duplikácia zahrňujúca gén *STS*. U pacientov s duplikáciou tejto oblasti bola pozorovaná MR, abnormality správania (najčastejšie autizmus), hypotónia, neprospievanie či epilepsia. Niektorí autori túto duplikáciu interpretujú ako benígnu variantu (Baldwin 2008; Furrow 2011), iní ju klasifikujú ako patogénnu (Scharer 2008; Faletta 2011) a v niektorých prípadoch je zaradená medzi aberácie s nejasnou klinickou signifikanciou (Mencarelli 2008; Mannik 2011). Zaradenie tejto duplikácie taktiež komplikuje to, že je vo väčšine prípadov zdedená od nepostihnutého rodiča. Zachytené boli aj pacientky, ktoré duplikáciu zdedili od fenotypovo normálnych otcov (Furrow 2011), čo je u X-viazaného defektu pozoruhodné.

Tabuľka 26: Prehľad CNV s nejasnou klinickou signifikanciou zachytených v súbore našich pacientov (veľkosť aberácie je udávaná ako rozmedzie prvej a poslednej aberovanej sondy na SNP array).

pacient	povaha aberácie	umiestnenie aberácie	cytogenetický pruh	veľkosť aberácie (bp)	gén	pôvod aberácie
cze010pC	amp	82 456 630 - 82 708 382	6q14.1	251 753	<i>FAM46C</i>	<i>dn</i> alebo <i>pat</i> (dostupná iba matka)
cze014p	del	149 645 091 - 149 874 027	4q31.23	228 937	del tesne pred <i>NR3C2</i>	mat
cze030p	dup	17 118 296 - 17 521 314	22q11	403 018	<i>PRODH, DGCR2</i>	pat
cze036p	dup	99 858 450 - 100 105 994	15q26.3	247 544	<i>TM2D3</i>	pat
cze043p	del	234 011 - 356 302	3p subtel	122 291	<i>CHL1</i>	pat
cze051p	dup	77 954 415 - 78 061 487	8q21.11	107 072	<i>PEX2</i>	mat
cze056p	del	99 078 793 - 99 265 528	13q32.2	186 736	<i>CLYBL</i>	<i>dn</i>
cze063p	del	61 800 481 - 61 968 576	3p14.2	168 095	<i>PTPRG</i>	pat
	amp	959 899 - 1 011 464	7p22.3	51 565	<i>ADAP1</i>	mat
cze065p	del	28 051 161 - 28 224 210	22q12.2	173 049	<i>NEFH</i>	mat
cze072p	dup	49 164 578 - 49 199 822	11p11.12	35 245	<i>FOLH1</i>	pat
cze079p	dup	187 721 660 - 188555410	3q27.3	771 825	<i>ST6GAL1, TBCCD1</i>	pat
	del	111 418 230 - 111 478 662	Xq23	60 433	<i>ZCCHC16</i>	mat
cze083p	dup	36 281 214 - 36 896 843	9p13.2	615 629	<i>PAX5</i>	potvrdené, rodičia nedostupní
cze086p	del	13 362 011 - 13 653 748	8p22	291 738	<i>DLC1</i>	pat
cze088p	del	176 150 140 - 176 384 088	3q26.31	233 949	<i>NAALADL2</i>	mat
cze090p	dup	6 386 879 - 8 091 442	Xp22.31	1 704 564	<i>STS</i>	mat
cze093p	dup	85 187 633 - 85 883 170	Xq21.2	695 537	<i>DACH2</i>	mat
cze096p	del	68 141 986 - 68 633 500	7q11.22	491 514	del tesne pred <i>AUTS2</i>	potvrdené, rodičia nedostupní
cze098p	dup	33 025 497 - 33 448 272	Xp21.1	422 775	<i>DMD</i>	pat
cze099p	dup	65 683 555 - 66 394 463	3p14.1	710 909	<i>MAG11, SLC25A26</i>	pat
	dup	27 521 795 - 27 690 854	18q12.1	169 060	<i>SLC25A52</i>	mat
cze108p	del	34 742 999 - 35 905 556	4p15.1	1 162 558	<i>ARAP2</i>	pat
cze110p	dup	138 876 454 - 139 009 601	Xq27.1	133 148	dup tesne pred <i>CXorf66</i>	mat
cze114p	dup	12 379 070 - 12 711 798	Xp22.2	332 728	<i>FRMPD4</i>	pat
cze119p	del	20 305 686 - 20 851 613	15q11.2	545 927	<i>NIPAI, NIPA2</i>	potvrdené, rodičia nedostupní
cze124p	dup	81 516 127 - 82 102 901	5q14.2	586 775	<i>RPS23</i>	potvrdené, rodičia nedostupní
cze126p	del	5 745 395 - 5 860 512	16p13.3	115 118	del tesne pred <i>A2BP1</i>	mat
cze140pA	dup	13 110 017 - 13 605 059	8p22	495 043	<i>DLC1</i>	mat
cze158p	dup	22 799 796 - 23 225 760	11p14.3	425 965	<i>SVIP</i>	pat
cze159p	del	96 409 - 214 919	2p25.3	118 511	<i>SH3YL1</i>	mat
	dup	72 764 014 - 73 104 076	9q21.12	340 063	<i>TRPM3</i>	mat
	dup	20 305 686 - 20 691 555	15q11.2	385 870	<i>NIPAI, NIPA2</i>	mat
cze164p	dup	69 260 903 - 69 742 526	12q15	481 624	<i>PTPRR</i>	mat
cze166p	del	14 005 965 - 14 144 753	6p23	138 789	<i>RNF182</i>	mat
cze167p	del	3 867 208 - 4 063 457	8p23.2	196 250	<i>CSMD1</i>	potvrdené, rodičia nedostupní
cze170p	del v mozaike	190 065 186 - 190 527 454	4qter	462 268	4qter	<i>dn</i> alebo <i>pat</i> (dostupná iba matka)
cze172p	dup	112 945 649 - 113 292 270	13q34	346 622	<i>LAMP1</i>	mat
cze178p	dup	13 079 575 - 13 198 268	10p13	118 694	<i>OPTN</i>	mat

V prípade nášho pacienta cze090p so stredne ťažkou MR, detským autizmom, kryptorchizmom, pylorostenózou, vezikoureterálnym refluxom, neurogénym močovým mechúrom a abnormalitami utvárania prstov je duplikácia zdedená od nepostihnutej matky. U niektorých pacientov s mikroduplikáciou Xp22.31 a oneskorením psychomotorického vývoja v detstve bolo pozorované v dospelosti zlepšenie fenotypu (Li 2010; Faletta 2011). Variabilný fenotyp môže u tejto duplikácie u žien vytvárať okrem neúplnej penetrancie a variabilnej expresivity aj vychýlená X inaktivácia. Okrem génu *STS* sa v duplikácii nachádza ďalších 5 génov, ktorých príspevek k fenotypu nemožno vylúčiť. Patologický efekt haploinsuficiencie génov na X chromozóme postihujúci viac mužské ako ženské pohlavie je dobre známy, avšak či môže zohrávať u X-viazaných génov rovnakú úlohu aj duplikácia zatiaľ nie je jasné. Štúdium pacientov s MR naznačuje, že zvýšená génová dávka X-viazaných génov môže mať vplyv na dereguláciu normálneho kognitívneho vývoja (Froyen 2007). Toto tvrdenie podporuje aj záchyt malého množstva penetrantnejších triplikácií Xp22.31, ktoré sú taktiež zdedené, ale, v porovnaní s duplikáciami, vždy od postihnutých rodičov s poruchami učenia a mikrocefáliou (Liu 2011a). V zatiaľ najrozsiahlejšej štúdií 72 mužských pacientov, Furrow (2011) toto CNV považuje, vďaka tak častej prítomnosti u fenotypovo normálnych príbuzných, za benígne. V protiklade Li (2010) predpokladá pravdepodobne kauzálny vzťah duplikácie a abnormálneho fenotypu u pacientov vo forme aditívneho efektu, avšak nevyklučuje ani možnosť, že sa jedná o zriedkavú populačnú variantu. Predpokladáme preto, že duplikácia Xp22.31 zrejme nie je dostatočujúcou príčinou vzniku neurovývojových ochorení a je otázne, či hoci len predisponuje k rozvoju fenotypu. To v literatúre potvrdzuje aj záchyt tejto duplikácie len u jedného pacienta zo súrodeneckej dvojice, pričom obaja zo súrodencov manifestovali rovnaké symptómy (Furrow 2011) a skutočnosť, že vysoké percento pacientov s duplikáciou Xp22.31 nesie v genóme ďalšie CNV väčších rozmerov (Furrow 2011; Liu 2011a). Táto aberácia je teda typickým príkladom defektu, u ktorého pravdepodobne až oveľa rozsiahlejšie populačné štúdie alebo funkčné štúdie zamerané na efekt zvýšenej gébovej dávky postihnutých génov snád pomôžu pri definitívnej klasifikácii CNV.

#### *Mikrodelécia/mikroduplikácia 15q11.2*

U troch pacientov bola zachytená odchýlka v počte kópií v regióne 15q11.2 medzi zlomovými miestami BP1-BP2. Pacient cze159p je nositeľom maternálne zdedenej duplikácie. Okrem tejto duplikácie nesie aj *de novo* deléciu génu *NRXN1*, podrobnejšie popísanú v kapitole 4.6.2, ktorú považujeme za hlavný dôvod pacientova fenotypu, hoci ani príspevek mikroduplikácie 15q11.2 nemusí byť zanedbateľný. Pacientka cze119p nesie deléciu

tej istej oblasti neznámeho pôvodu (z dôvodu nedostupnosti materiálu rodičov). Pacientka trpí hlbokou MR, hypomimiou, kĺbovými problémami a občasnými automatizmami rúk. Pacient cze077pA nesie paternálne zdedenú deléciu 15q11.2 spolu s kombináciou ďalších aberácií a bol podrobnejšie popísaný v kapitole 4.6.3. Celá oblasť 15q11-q13 je náchylná k rôznym prestavbám, ktoré vedú k spektru fenotypov vrátane MR, autizmu a k veľmi dobre rozpoznateľným mikrolečným syndrómom Prader-Willi a Angelman. Región je charakteristický prítomnosťou komplexných LCR (BP1-BP5), ktoré podmieňujú vznik rôznych delécií a duplikácií mechanizmom NAHR a ktoré predstavujú typické miesta zlomu u vyššie zmieňovaných ochorení. Pre pacientov s deléciami či duplikáciami medzi BP1 a BP2 je charakteristické psychomotorické oneskorenie, oneskorenie vývoja reči, dysmorfizmus, epilepsia, poruchy správania ako ADHD, autizmus a obsedantno-kompulzívna porucha. Oblasť 15q11.2 medzi BP1 a BP2 je približne 500 kb dlhá a obsahuje 4 evolučne veľmi konzervované gény, *TUBGCP5*, *NIPAI*, *NIPA2* a *CYFIP1*. Tri z nich sú exprimované v CNS a podieľajú sa na jeho vývoji a/alebo funkcii. U génu *NIPA2* sa predpokladá jeho úloha pri vývoji správania, konkrétne autizmu (van der Zwaag 2010). Až v 80 % prípadov je mikrodelécia/duplikácia 15q11.2 zdedená od nepostihnutých či menej postihnutých rodičov, čo komplikuje hodnotenie kauzality. Pokiaľ sú rodičia postihnutí, vo väčšine prípadov vykazujú nejakú z porúch správania a/alebo poruchy učenia. Prvým zachyteným pacientom s deléciou 15q11.2 bol v roku 2007 pacient s MR, oneskorením motorického vývoja a reči, ADHD, hyperaktivitou a s výrazom „happy puppet“ typickým pre Angelmanov syndróm (Murthy 2007). Deléciu zdedil od miernejšie postihnutého otca. Ďalších 9 zachytených pacientov s mikrodeléciou 15q11.2 fenotypovo odpovedalo prvému zachytenému pacientovi (Doornbos 2009). Vzhľadom k neprítomnosti tejto aberácie v kontrolnom súbore sa autori priklonili k jej patogénnemu efektu a postulovali existenciu nového mikrolečného syndrómu 15q11.2. Najrozsiahlejšia štúdia 146 pacientov s mikrodeléciami/duplikáciami 15q11.2 však priamy patogénny efekt týchto aberácií vyvracia (Burnside 2011). DGV udáva až 1-3 % frekvenciu tohto CNV u zdravých jedincov. Tak častá prítomnosť aberácie u nepostihnutých jedincov naznačuje, že nie je dostatočná pre vytvorenie fenotypu a ak sa zúčastní, je skôr rizikovým faktorom pre rozvoj neurovývojových či neuropsychiatrických ochorení. Nie je však vylúčená ani neúplná penetrancia, či variabilná expresivita a efekt génového pozadia. Taktiež približne 20 % zachytených pacientov nesie v genóme ďalšie CNV a vykazujú závažnejší fenotyp (Burnside 2011). Najnovšia publikácia zachycujúca súrodeneckú dvojicu (Madrigal 2012) popisuje mikrodeléciu 15q11.2 takisto iba ako možný rizikový faktor pre rozvoj neuropsychologických fenotypov so značnou klinickou variabilitou.

#### 4.7. Záchyt, spektrum a interpretácia aberácií

Vyšetrením 172 rodín pomocou SNP array boli zachytené patogénne CNV v 16 rodinách. Z nich však u piatich pacientov zo 4 rodín šlo o už vopred známu aberáciu, ktorej rozsah sme chceli spresniť. Tieto rodiny by umelo zvyšovali záchyt a neboli preto do výpočtu efektivity záchytu zahrnuté. Známe patogénne CNV v súbore našich pacientov bez vopred známej aberácie boli teda zachytené v 12 rodinách a úspešnosť záchytu tak činila 7,1 % (12/168). Pravdepodobne patogénne CNV boli zachytené v 10 rodinách, čo tvorilo 6,0 % (10/168). Spolu teda tvorí záchyt známych patogénnych a pravdepodobne patogénnych CNV 13,1 % (22/168). V literatúre kolíše záchyt aberácií podmieňujúcich rozvoj MR s využitím rôznych typov arrayí od 10 do 15 % (Koolen 2008a; Jaillard 2009), čomu náš záchyt plne odpovedá.

Celkovo 19 patogénnych CNV bolo zachytených u 18 pacientov zo 16 rodín. Väčšina z týchto pacientov trpela stredne ťažkou MR (10/18, 55,6 %), nasledovala ľahká MR (6/18, 33,3 %) a ťažká MR (2/18, 11,1 %). Toto rozloženie stupňov MR odpovedalo rozloženiu v celom súbore (Graf 1). Výraznejšie zastúpenie u pacientov s patogénnymi CNV mala syndrémová MR (14/18, 77,8 %) oproti nesyndrémovej MR (4/18, 22,2 %). Syndrémová MR bola teda v tejto skupine zastúpená častejšie ako v celom súbore (52,5 %). Familiárny výskyt patogénnych CNV sme zachytili v dvoch zo 16 rodín (12,5 %), čo približne odpovedalo necelým 10 % výskytu familiárnej MR v celom súbore. Patogénne CNV u pacientov najčastejšie vznikali *de novo* (10/19, 52,6 %), nasledovali maternálne zdedené (5/19, 26,3 %) a paternálne zdedené (4/19, 21,1 %).

Pravdepodobne patogénne CNV zahŕňali 9 individuálnych aberácií u 8 pacientov zo 7 rodín a tri novo vzniknuté kombinácie viacerých CNV u troch pacientov z troch rodín (viď 4.6.3). Najčastejšia bola medzi týmito pacientmi stredne ťažká MR (5/11, 45,5 %), nasledovaná ľahkou MR (4/11, 36,3 %) a ťažkou MR (2/11, 18,2 %). Ťažká MR bola teda v tejto skupine zastúpená častejšie ako v celom súbore (Graf 1). Zastúpenie syndrémovej MR u týchto pacientov (8/11, 72,7 %) bolo obdobné ako v prípade patogénnych CNV a bolo opäť vyššie ako výskyt tejto formy MR v celom súbore. Familiárny výskyt MR medzi rodinami pacientov s pravdepodobne patogénnymi CNV (2/10, 20,0 %) bol vyšší ako necelých 10 % v celom súbore, hoci je treba mať na pamäti, že jedna kombinácia CNV klasifikovaná do tejto kategórie bola prítomná iba u jedného postihnutého súrodenca v rodine (cze077pA). Z pomedzi 9 individuálnych aberácií vznikla väčšina *de novo* (6/9, 66,7 %, vrátane dvoch delécií u pacienta cze036p so zdanlivo balancovanou komplexnou chromozómovou

prestavbou, kde tieto aberácie pravdepodobne neboli nezávislé) a zvyšok bol zdedený maternálne (3/9, 33,3%, vrátane jednej aberácie u súrodencov cze061pA a cze061pB). Medzi 10 CNV pôsobiacimi v nových kombináciách bolo päť zdedených paternálne, štyri maternálne a jedno CNV bolo *de novo* alebo paternálne (pôvod nebolo možné určiť kvôli nedostupnosti rodičovského materiálu).

Najrozsiahlejšia doteraz prevedená štúdia s 15 767 pacientmi s MR a 8 329 kontrolami zachytila 59 rôznych typov častejších rekurentných patogénnych CNV, vrátane 14 ešte nepopísaných alebo len veľmi zriedka zachytených (Cooper 2011). Najčastejšie zachytenými CNV v tejto publikovanej štúdii boli prestavby medzi BP1-BP2 v oblasti 15q11.2. Delécie boli zachytené u 94 pacientov a u 19 kontrol, duplikácie u 64 pacientov a u 36 kontrol. V našom súbore boli delécie 15q11.2 zachytené u dvoch pacientov (cze077pA a cze119p) a duplikácia u jedného (cze159p), čo predstavuje u nás takisto jeden z najčastejších záchytov. Z dôvodu rozporov v literatúre a problematickosti využitia tohto CNV v genetickom poradenstve klasifikujeme nález ako s nejasnou klinickou signifikanciou. Aj kvôli svojej vysokej frekvencii je to jedna z aberácií, informácie o ktorých je treba v literatúre bedlivo sledovať. Duplikáciu 22q11.2 identifikovali Cooper a spolupracovníci u 50 pacientov a 5 kontrol, medzi našimi pacientmi bola identifikovaná raz (cze075p). Ďalší z častých záchytov predstavoval mikrolečný syndróm 16p11.2 u 64 pacientov a 3 kontrol, čomu odpovedá častý záchyt aj v našom súbore, u troch pacientov, pričom dvaja tvoria súrodeneckú dvojicu (cze099p, cze140pA a cze140pB). Delécia génu *CHRNA7* bola zaznamenaná u 42 pacientov, pričom v našom súbore bola zachytená raz (cze025p). Ďalším syndrómom s mnohonásobným záchyтом bola mikrodelécia 16p12.1 u 37 pacientov a 3 kontrol. Rovnakú deléciu nesie v našom súbore jediná pacientka cze004p. I mikrolečný syndróm 17q21.31 detegovaný u 23 pacientov a žiadnej kontroly mal zastúpenie v našom súbore v podobe súrodeneckej dvojice – dvojičiek (cze054pA a cze054pB). Cooper (2011) medzi 14 pravdepodobne novými syndrómami uvádza aj mikrodeléciu 15q25 u 5 pacientov, z toho jednej súrodeneckej dvojice. Naš súbor pacientov zahrňoval hneď troch pacientov s touto mikrodeléciou (cze061pA, cze061pB a cze072p), z toho jednu súrodeneckú dvojicu, a prispieva tak pravdepodobne k potvrdeniu tohto nového mikrolečného syndrómu 15q25. Prekvapivo, nami zachytené exónové delécie v géne *NRXNI* až u troch pacientov (cze050p, cze087p a cze159p) v tejto publikácii síce detegovali, ale nediskutujú ich podrobnejšie. Zatiaľ druhá najpočetnejšia štúdia pacientov s MR publikovaná ISCA konzorciom zaraďuje delécie génu *NRXNI* medzi jasne patogénne CNV (Kaminsky 2011). Jasná nezhoda v interpretácii medzi týmito dvoma štúdiami nastala v prípade vyššie zmieňovanej mikrodelécie 16p12.1. Cooper (2011) ju

považuje za jasne patogénnu, ISCA konzorcium za nejasnú alebo benígnu variantu. Podobné rozpory odrážajú súčasné problémy s nesmiernou komplikovanosťou klinickej interpretácie jednotlivých CNV. My zotrávame na hodnotení delécie 16p12.1 ako patogénnej, pretože väčšina ostatných prác túto klasifikáciu dobre podporuje a naopak nie je jasné, na čom ISCA konzorcium svoje rozhodnutie stavia. Celkovo detegovala štúdia ISCA konzorcia (Kaminsky 2011) obdobné spektrum aberácií. K najčastejšie zachyteným patrili prestavby 22q11.2, mikrodelečný syndróm 16p11.2 či mikrodelečný syndróm 17q21.31. Spektrum aberácií zachytených v našom súbore tak odpovedá nepomerne rozsiahlejším zahraničným štúdiám.

Vyššie uvedené porovnanie nám umožňuje domnievať sa, že nami zvolený postup detekcie CNV s použitím dvoch nezávislých algoritmov bol úspešný. Rozdielnosť algoritmov oboch softvérov umožnila dôkladnejšiu analýzu s väčším množstvom detegovaných aberácií. V priebehu štúdie optimalizovaný postup vyšetrenia a najmä naša praktická skúsenosť poukázali aj na zásadnú nutnosť kontinuálneho opakovania bioinformatických analýz a sledovania literatúry, pretože v súčasnosti dochádza k neustálej kumulácii nových informácií, ktoré pomáhajú zaraďovať či preradovať CNV medzi jednotlivými kategóriami. Identifikácia nových pacientov napomáha aj detekcii stále menších CNV spôsobujúcich podobný fenotyp, čo prispieva k postupnému zužovaniu kritických regiónov na niekoľko génov. Obmedzený okruh kandidátnych génov môže byť preferenčne sekvenovaný technikami NGS v rozsiahlych kohortách pacientov s MR a v týchto štúdiách odhalené bodové mutácie môžu viesť k odhaleniu konkrétneho génu zodpovedného za daný syndróm.

Naše výsledky taktiež potvrdzujú eróziu dlho zaužívaného pravidla o automaticky benígnej povahe zdedenej aberácie. U veľkého množstva novo popísaných mikrodelečných a mikroduplikačných syndrémov je aberácia zdedená od fenotypovo normálnych či oveľa miernejšie postihnutých rodičov, čo so sebou prináša značné problémy v klinickej interpretácii. Rekurentné syndrómy asociované so syndrómovou MR častejšie vznikajú *de novo*, naopak syndrómy s variabilným fenotypovým spektrom sú najčastejšie zdedené od matiek (Girirajan 2012), čo sa potvrdilo aj u našich nálezov. Problematika je náročná na interpretáciu pre samotných laboratórnych a klinických genetikov, nieto ešte pre rodičov. Z toho istého dôvodu nie je výskyt CNV v nízkej frekvencii aj v databázach CNV nájdených v súboroch nepostihnutých kontrol absolútnym kritériom pre jeho zaradenie ako benígne.

Na druhú stranu je treba pri evaluácii najmä kratších CNV vznikajúcich *de novo* mať na pamäti, že by nemali byť automaticky klasifikované ako pravdepodobne patogénne bez podrobného klinického popisu pacienta a podpory ich patogénneho efektu z iného zdroja. Molekulárna diagnostika môže byť len tak dobrá, aká dobrá je diagnostika klinická a aj naša



skúsenosť napovedá, že posúdenie kauzality CNV môže v konkrétnom prípade závisieť nielen od genomického kontextu daného CNV, ale aj od kontextu klinického. Bez dôkladného klinického popisu pacienta môže byť za pôvodcu pacientovho fenotypu mylne stanovené CNV, aj keď v skutočnosti je ochorenie podmienené *de novo* bodovou mutáciou v inom géne (Vermeesch 2011). Veľké množstvo variant nájdených celogenómovými metódami by nemalo zväzdať k snahe označiť nutne aspoň niektoré z nich ako patogénne a kauzálne pre fenotyp pacienta.

Okrem samotnej prítomnosti patogénneho CNV v genóme pacienta môže jeho klinický obraz dotvárať, vo väčšine prípadov zhoršovať, aj ďalšie CNV kdekoľvek v genóme pôsobiace ako tzv. second hit. Je pravdepodobné, že taký mechanizmus sa uplatní u pacienta cze075p, u ktorého sa môžu kumulovať účinky dvoch patogénnych aberácií, z ktorých je jedna zdedená od oveľa menej postihnutého otca a druhá je *de novo*, a takisto u troch ďalších pacientov (cze002p, cze017p a cze077pA), ktorí nesú novo vzniknuté kombinácie veľkých aberácií zdedených od rodičov alebo vzniknutých *de novo*. V literatúre bolo CNV považované za second hit zachytené u viac než 10 % pacientov s fenotypovo variabilným ochorením, vo väčšine prípadov s nesyndrómovou MR (Girirajan 2012). Ich nízky výskyt u syndrómovej MR je pravdepodobne daný negatívnou selekciou, lebo postihnutie pacientov je už tak závažné, že ďalšie zhoršenie už nemusí byť zlučiteľné so životom. Podobne iste môžu ako second hit pôsobiť aj bodové mutácie, ktoré sú na celogenómovej úrovni doteraz ťažšie detekovateľné, ale ktoré začnú do problematiky v skorej dobe vnášať ďalšiu komplexitu. Veľa syndrómov je charakterizovaných variabilnou expresivitou a neúplnou penetranciou a ich prejav môžu ovplyvňovať okrem génového pozadia aj environmentálne vplyvy.

## 5. Záver

Táto práca je zameraná na problematiku MR, ktorá postihuje 2,5-3 % populácie. MR má výrazný genetický komponent, ale v značnom počte prípadov doteraz neobjasnenú etiológiu. Genetické podmienenie MR vykazuje nesmiernu heterogenitu, a preto v súčasnosti prebieha veľa štúdií snažiacich sa odhaliť ďalšie genetické odchýlky spôsobujúce toto ochorenie. Účinným nástrojom sú rôzne typy arrayí detegujúce množstvo CNV. Tieto vysoko variabilné aberácie boli asociované s vyšším počtom ochorení vrátane MR.

V našej štúdií bola prevedená celogenómová analýza ziskov a strát genetického materiálu u českých pacientov s rôznymi formami MR. Dizertačná práca sa sústreďuje na analýzu pomocou SNP array v súbore 183 pacientov. Bol vypracovaný optimálny algoritmus laboratórnych a bioinformatických analýz pre efektívnu identifikáciu CNV a posúdenie ich kauzality pre postihnutie jedincov. V zhode s publikovanými štúdiami boli identifikované CNV už predtým asociované s MR a pravdepodobne patogénne CNV v 13,1 % prípadov. Viacerí naši pacienti prispeli k definovaniu nových mikrolečných syndrómov podmieňujúcich rozvoj MR, alebo k definovaniu fenotypového spektra týchto zvyčajne veľmi vzácnych syndrómov, napríklad mikrodélií 1q44, 2p14-p15, 2p15-p16.1 či 12q13. Korelácia genotypu a fenotypu je u rekurentných CNV relatívne úspešná, ale u väčšiny zriedkavých CNV je ešte nutné ju stanoviť a analýza každého nového pacienta je prínosná.

Významné bolo aj naše príspevanie k zúženiu kritickej oblasti syndrómu delécie 2p15-p16.1 (pacientka cze033p) a čiastočne aj syndrómu delécie clusteru *HOXC* a susediacich génov (pacient cze013p). U prvej pacientky by mohlo zúženie kritického regiónu na 3 gény viesť cez preferenčné sekvenovanie technikami NGS v rozsiahlych kohortách pacientov s MR a detekciu bodových mutácií k odhaleniu konkrétneho génu zodpovedného za syndróm. Viacero našich pacientov ilustruje a podporuje pravdepodobnú rolu kombinácie viacerých CNV na vytváraní fenotypu MR či iných neurovývojových ochorení (najmä pacient cze075p a takisto cze002p, cze017p a cze077pA).

Skúsenosti s nami vypracovaným a optimalizovaným postupom vyšetrenia poukázali na nutnosť kontinuálneho opakovania bioinformatických analýz vzhľadom na búrlivo sa rozširujúce znalosti o výskyte jednotlivých CNV u pacientov a nepostihnutých kontrol ako aj o fenotypových spektrách jednotlivých syndrómov. Nutným dôsledkom tohto procesu je aj preradenie nálezov medzi kategóriami kauzality, čo spolu s ich variabilnou expresivitou, neúplnou penetranciou a výskytom u nepostihnutých jedincov vrátane niektorých rodičov pacientov kladie nové nároky aj na klinických genetikov a na rodiny postihnutých.

## Použitá literatura

- Almal, S. H. and Padh, H.: Implications of gene copy-number variation in health and diseases. (2012) *J Hum Genet* 57: 6-13.
- Antonacci, F., Kidd, J. M., Marques-Bonet, T., Teague, B., Ventura, M., et al.: A large and complex structural polymorphism at 16p12.1 underlies microdeletion disease risk. (2010) *Nat Genet* 42: 745-50.
- Bachner, D., Kreienkamp, H. J. and Richter, D.: MIZIP, a highly conserved, vertebrate specific melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein. (2002) *FEBS Lett* 526: 124-8.
- Baldwin, E. L., Lee, J. Y., Blake, D. M., Bunke, B. P., Alexander, C. R., et al.: Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. (2008) *Genet Med* 10: 415-29.
- Ballif, B. C., Rosenfeld, J. A., Traylor, R., Theisen, A., Bader, P. I., et al.: High-resolution array CGH defines critical regions and candidate genes for microcephaly, abnormalities of the corpus callosum, and seizure phenotypes in patients with microdeletions of 1q43q44. (2012) *Hum Genet* 131: 145-56.
- Barbaro, M., Balsamo, A., Anderlid, B. M., Myhre, A. G., Gennari, M., et al.: Characterization of deletions at 9p affecting the candidate regions for sex reversal and deletion 9p syndrome by MLPA. (2009) *Eur J Hum Genet* 17: 1439-47.
- Bazzano, A. T., Zeldin, A. S., Diab, I. R., Garro, N. M., Allevato, N. A., et al.: The Healthy Lifestyle Change Program: a pilot of a community-based health promotion intervention for adults with developmental disabilities. (2009) *Am J Prev Med* 37: S201-8.
- Bejjani, B. A. and Shaffer, L. G.: Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. (2006) *J Mol Diagn* 8: 528-33.
- Bijlsma, E. K., Gijsbers, A. C., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., van Haeringen, A., Fransen van de Putte, D. E., et al.: Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. (2009) *Eur J Med Genet* 52: 77-87.
- Blaker-Lee, A., Gupta, S., McCammon, J. M., De Rienzo, G. and Sive, H.: Zebrafish homologs of genes within 16p11.2, a genomic region associated with brain disorders, are active during brain development, and include two deletion dosage sensor genes. (2012) *Dis Model Mech*: Epub.
- Bochukova, E. G., Huang, N., Keogh, J., Henning, E., Purmann, C., et al.: Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. (2010) *Nature* 463: 666-70.
- Boland, E., Clayton-Smith, J., Woo, V. G., McKee, S., Manson, F. D., et al.: Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. (2007) *Am J Hum Genet* 81: 292-303.
- Bradley, W. E., Raelson, J. V., Dubois, D. Y., Godin, E., Fournier, H., et al.: Hotspots of large rare deletions in the human genome. (2010) *PLoS One* 5: e9401.
- Brewer, C., Holloway, S., Zawalynski, P., Schinzel, A. and FitzPatrick, D.: A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality--and tolerance of segmental aneuploidy--in humans. (1999) *Am J Hum Genet* 64: 1702-8.
- Burnside, R. D., Pasion, R., Mikhail, F. M., Carroll, A. J., Robin, N. H., et al.: Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. (2011) *Hum Genet* 130: 517-28.

- Caliebe, A., Kroes, H. Y., van der Smagt, J. J., Martin-Subero, J. I., Tonnie, H., et al.: Four patients with speech delay, seizures and variable corpus callosum thickness sharing a 0.440 Mb deletion in region 1q44 containing the HNRPU gene. (2010) *Eur J Med Genet* 53: 179-85.
- Carter, N. P.: Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. (2007) *Nat Genet* 39: S16-21.
- Coe, B. P., Girirajan, S. and Eichler, E. E.: The genetic variability and commonality of neurodevelopmental disease. (2012) *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160C: 118-29.
- Colella, S., Yau, C., Taylor, J. M., Mirza, G., Butler, H., et al.: QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. (2007) *Nucleic Acids Res* 35: 2013-25.
- Conlin, L. K., Thiel, B. D., Bonnemant, C. G., Medne, L., Ernst, L. M., et al.: Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. (2010) *Hum Mol Genet* 19: 1263-75.
- Conrad, D. F., Andrews, T. D., Carter, N. P., Hurles, M. E. and Pritchard, J. K.: A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. (2006) *Nat Genet* 38: 75-81.
- Cooper, G. M., Coe, B. P., Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Vu, T. H., et al.: A copy number variation morbidity map of developmental delay. (2011) *Nat Genet* 43: 838-46.
- Cuoco, C., Ronchetto, P., Gimelli, S., Bena, F., Divizia, M. T., et al.: Microarray based analysis of an inherited terminal 3p26.3 deletion, containing only the CHL1 gene, from a normal father to his two affected children. (2011) *Orphanet J Rare Dis* 6: 12.
- de Leeuw, N., Pfundt, R., Koolen, D. A., Neefs, I., Scheltinga, I., et al.: A newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15p16.1: narrowing down the critical region by adding another patient detected by genome wide tiling path array comparative genomic hybridisation analysis. (2008) *J Med Genet* 45: 122-4.
- de Vries, B. B., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D. A., Vissers, L. E., et al.: Diagnostic genome profiling in mental retardation. (2005) *Am J Hum Genet* 77: 606-16.
- Descipio, C., Conlin, L., Rosenfeld, J., Tepperberg, J., Pasion, R., et al.: Subtelomeric deletion of chromosome 10p15.3: Clinical findings and molecular cytogenetic characterization. (2012) *Am J Med Genet A* 158A: 2152-61.
- Ding, T., Li, Z., Hailemariam, T., Mukherjee, S., Maxfield, F. R., et al.: SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. (2008) *J Lipid Res* 49: 376-85.
- Doornbos, M., Sikkema-Raddatz, B., Ruijvenkamp, C. A., Dijkhuizen, T., Bijlsma, E. K., et al.: Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. (2009) *Eur J Med Genet* 52: 108-15.
- Durbin, R. M., Altshuler, D., Brooks, L. D., Felsenfeld, A., McEwan, J., et al.: A map of human genome variation from population-scale sequencing. (2010) *Nature* 467: 1061-73.
- Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Sharma, K. and Chaudhary, P. M.: TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. (2000) *J Biol Chem* 275: 15336-42.
- Edelmann, L. and Hirschhorn, K.: Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. (2009) *Ann N Y Acad Sci* 1151: 157-66.

- Faletta, F., D'Adamo, A. P., Santa Rocca, M., Carrozzi, M., Perrone, M. D., et al.: Does the 1.5 Mb microduplication in chromosome band Xp22.31 have a pathogenetic role? New contribution and a review of the literature. (2011) *Am J Med Genet A* 158A: 461-4.
- Felix, T. M., Petrin, A. L., Sanseverino, M. T. and Murray, J. C.: Further characterization of microdeletion syndrome involving 2p15-p16.1. (2010) *Am J Med Genet A* 152A: 2604-8.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Clayton, P. T., Graham, A., Rees, J. E., et al.: Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. (2000) *Nat Genet* 24: 188-91.
- Feuk, L., Carson, A. R. and Scherer, S. W.: Structural variation in the human genome. (2006a) *Nat Rev Genet* 7: 85-97.
- Feuk, L., Marshall, C. R., Wintle, R. F. and Scherer, S. W.: Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. (2006b) *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1: R57-66.
- Field, M., Tarpey, P., Boyle, J., Edkins, S., Goodship, J., et al.: Mutations in the RSK2(RPS6KA3) gene cause Coffin-Lowry syndrome and nonsyndromic X-linked mental retardation. (2006) *Clin Genet* 70: 509-15.
- Froyen, G., Van Esch, H., Bauters, M., Hollanders, K., Frints, S. G., et al.: Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. (2007) *Hum Mutat* 28: 1034-42.
- Furrow, A., Theisen, A., Velsher, L., Bawle, E. V., Sastry, S., et al.: Duplication of the STS region in males is a benign copy-number variant. (2011) *Am J Med Genet A* 155A: 1972-5.
- Gijsbers, A. C., Lew, J. Y., Bosch, C. A., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., van Haeringen, A., et al.: A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. (2009) *Eur J Hum Genet* 17: 1394-402.
- Girirajan, S. and Eichler, E. E.: Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. (2010) *Hum Mol Genet* 19: R176-87.
- Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Coe, B. P., Parikh, S., Friedman, N., et al.: Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. (2012) *N Engl J Med* 367: 1321-31.
- Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Cooper, G. M., Antonacci, F., Siswara, P., et al.: A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. (2010) *Nat Genet* 42: 203-9.
- Golzio, C., Willer, J., Talkowski, M. E., Oh, E. C., Taniguchi, Y., et al.: KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. (2012) *Nature* 485: 363-7.
- Hehir-Kwa, J. Y., Wieskamp, N., Webber, C., Pfundt, R., Brunner, H. G., et al.: Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. (2010) *PLoS Comput Biol* 6: e1000752.
- Helbig, I., Mefford, H. C., Sharp, A. J., Guipponi, M., Fichera, M., et al.: 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. (2009) *Nat Genet* 41: 160-2.
- Henrichsen, C. N., Chaignat, E. and Reymond, A.: Copy number variants, diseases and gene expression. (2009) *Hum Mol Genet* 18: R1-8.
- Hill, A. D., Chang, B. S., Hill, R. S., Garraway, L. A., Bodell, A., et al.: A 2-Mb critical region implicated in the microcephaly associated with terminal 1q deletion syndrome. (2007) *Am J Med Genet A* 143A: 1692-8.

- Hoppman-Chaney, N., Wain, K., Seger, P., Superneau, D. and Hodge, J.: Identification of single gene deletions at 15q13.3: further evidence that CHRNA7 causes the 15q13.3 microdeletion syndrome phenotype. (2012) *Clin Genet*: Epub.
- Hu, H., Eggers, K., Chen, W., Garshasbi, M., Motazacker, M. M., et al.: ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. (2011) *Am J Hum Genet* 89: 407-14.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F.: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. (2001) *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- Huchtagowder, V., Liu, T. C., Paciorkowski, A. R., Thio, L. L., Keller, M. S., et al.: Chromosome 2p15p16.1 microdeletion syndrome: 2.5 Mb deletion in a patient with renal anomalies, intractable seizures and a choledochal cyst. (2012) *Eur J Med Genet* 55: 485-9.
- Chabchoub, E., Vermeesch, J. R., de Ravel, T., de Cock, P. and Fryns, J. P.: The facial dysmorphism in the newly recognised microdeletion 2p15-p16.1 refined to a 570 kb region in 2p15. (2008) *J Med Genet* 45: 189-92.
- Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Cherif, B. and Bienvenu, T.: Genetics and pathophysiology of mental retardation. (2006) *Eur J Hum Genet* 14: 701-13.
- Ching, M. S., Shen, Y., Tan, W. H., Jeste, S. S., Morrow, E. M., et al.: Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. (2010) *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B: 937-47.
- Cho, S. C., Yim, S. H., Yoo, H. K., Kim, M. Y., Jung, G. Y., et al.: Copy number variations associated with idiopathic autism identified by whole-genome microarray-based comparative genomic hybridization. (2009) *Psychiatr Genet* 19: 177-85.
- Christian, S. L., Brune, C. W., Sudi, J., Kumar, R. A., Liu, S., et al.: Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. (2008) *Biol Psychiatry* 63: 1111-7.
- Iafraite, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., et al.: Detection of large-scale variation in the human genome. (2004) *Nat Genet* 36: 949-51.
- Itsara, A., Cooper, G. M., Baker, C., Girirajan, S., Li, J., et al.: Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. (2009) *Am J Hum Genet* 84: 148-61.
- Ittner, A., Ke, Y. D., van Eersel, J., Gladbach, A., Gotz, J., et al.: Brief update on different roles of tau in neurodegeneration. (2011) *IUBMB Life* 63: 495-502.
- Iwasaki, K. and Toyonaga, R.: The Rab3 GDP/GTP exchange factor homolog AEX-3 has a dual function in synaptic transmission. (2000) *Embo J* 19: 4806-16.
- Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., Walters, R. G., et al.: Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. (2011) *Nature* 478: 97-102.
- Jaillard, S., Drunat, S., Bendavid, C., Aboura, A., Etcheverry, A., et al.: Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: Novel syndromes in a large French series. (2009) *Eur J Med Genet* 53: 66-75.
- Jonsson, D. I., Ludvigsson, P., Aradhya, S., Sigurdardottir, S., Steinarsdottir, M., et al.: A de novo 1.13 Mb microdeletion in 12q13.13 associated with congenital distal arthrogryposis, intellectual disability and mild dysmorphism. (2012) *Eur J Med Genet* 55: 437-40.
- Kaminsky, E. B., Kaul, V., Paschall, J., Church, D. M., Bunke, B., et al.: An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. (2011) *Genet Med* 13: 777-84.
- Kaufman, L., Ayub, M. and Vincent, J. B.: The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. (2010) *J Neurodev Disord* 2: 182-209.

- Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H. and Akira, S.: ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. (1998) *Mol Cell Biol* 18: 1642-51.
- Kibe, T., Mori, Y., Okanishi, T., Shimojima, K., Yokochi, K., et al.: Two concurrent chromosomal aberrations involving interstitial deletion in 1q24.2q25.2 and inverted duplication and deletion in 10q26 in a patient with stroke associated with antithrombin deficiency and a patent foramen ovale. (2010) *Am J Med Genet A* 155A: 215-20.
- Koolen, D. A., Kramer, J. M., Neveling, K., Nillesen, W. M., Moore-Barton, H. L., et al.: Mutations in the chromatin modifier gene *KANSL1* cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. (2012) *Nat Genet* 44: 639-41.
- Koolen, D. A., Pfundt, R., de Leeuw, N., Hehir-Kwa, J. Y., Nillesen, W. M., et al.: Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. (2008a) *Hum Mutat* 30: 283-92.
- Koolen, D. A., Sharp, A. J., Hurst, J. A., Firth, H. V., Knight, S. J., et al.: Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. (2008b) *J Med Genet* 45: 710-20.
- Koolen, D. A., Vissers, L. E., Pfundt, R., de Leeuw, N., Knight, S. J., et al.: A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. (2006) *Nat Genet* 38: 999-1001.
- Ku, C. S., Polychronakos, C., Tan, E. K., Naidoo, N., Pawitan, Y., et al.: A new paradigm emerges from the study of de novo mutations in the context of neurodevelopmental disease. (2012) *Mol Psychiatry*: Epub.
- Kumar, R. A., KaraMohamed, S., Sudi, J., Conrad, D. F., Brune, C., et al.: Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. (2008) *Hum Mol Genet* 17: 628-38.
- Kwok, H. and Cheung, P. W.: Co-morbidity of psychiatric disorder and medical illness in people with intellectual disabilities. (2007) *Curr Opin Psychiatry* 20: 443-9.
- Lachman, H. M., Pedrosa, E., Petruolo, O. A., Cockerham, M., Papolos, A., et al.: Increase in *GSK3beta* gene copy number variation in bipolar disorder. (2007) *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 259-65.
- Le Marechal, C., Masson, E., Chen, J. M., Morel, F., Ruzniewski, P., et al.: Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus. (2006) *Nat Genet* 38: 1372-4.
- Ledbetter, D. H. and Martin, C. L.: Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. (2007) *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C: 327-34.
- Lee, C., Iafrate, A. J. and Brothman, A. R.: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. (2007) *Nat Genet* 39: S48-54.
- Lee, C. and Scherer, S. W.: The clinical context of copy number variation in the human genome. (2010) *Expert Rev Mol Med* 12: e8.
- Leonard, H. and Wen, X.: The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. (2002) *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8: 117-34.
- LePichon, J. B., Bittel, D. C., Graf, W. D. and Yu, S.: A 15q13.3 homozygous microdeletion associated with a severe neurodevelopmental disorder suggests putative functions of the *TRPM1*, *CHRNA7*, and other homozygously deleted genes. (2010) *Am J Med Genet A* 152A: 1300-4.
- Li, D., Tekin, M., Buch, M. and Fan, Y. S.: Co-existence of other copy number variations with 22q11.2 deletion or duplication: a modifier for variable phenotypes of the syndrome? (2012) *Mol Cytogenet* 5: 18.
- Li, F., Shen, Y., Kohler, U., Sharkey, F. H., Menon, D., et al.: Interstitial microduplication of Xp22.31: Causative of intellectual disability or benign copy number variant? (2010) *Eur J Med Genet* 53: 93-9.

- Liang, J. S., Shimojima, K., Ohno, K., Sugiura, C., Une, Y., et al.: A newly recognised microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behaviour, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2 Mb deletion. (2009) *J Med Genet* 46: 645-7.
- Liu, P., Erez, A., Nagamani, S. C., Bi, W., Carvalho, C. M., et al.: Copy number gain at Xp22.31 includes complex duplication rearrangements and recurrent triplications. (2011a) *Hum Mol Genet* 20: 1975-88.
- Liu, X., Malenfant, P., Reesor, C., Lee, A., Hudson, M. L., et al.: 2p15-p16.1 microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. (2011b) *Eur J Hum Genet* 19: 1264-70.
- Lupski, J. R.: Genomic rearrangements and sporadic disease. (2007) *Nat Genet* 39: S43-7.
- Madrigal, I., Rodriguez-Revena, L., Xuncla, M. and Mila, M.: 15q11.2 microdeletion and FMR1 premutation in a family with intellectual disabilities and autism. (2012) *Gene* 508: 92-5.
- Mannik, K., Parkel, S., Palta, P., Zilina, O., Puusepp, H., et al.: A parallel SNP array study of genomic aberrations associated with mental retardation in patients and general population in Estonia. (2011) *Eur J Med Genet* 54: 136-43.
- Marculescu, R., Vanura, K., Le, T., Simon, P., Jager, U., et al.: Distinct t(7;9)(q34;q32) breakpoints in healthy individuals and individuals with T-ALL. (2003) *Nat Genet* 33: 342-4.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Philipsen, S.: Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. (1997) *Cell* 89: 619-28.
- Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., et al.: Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. (2008) *Am J Hum Genet* 82: 477-88.
- May, P. A. and Gossage, J. P.: Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. (2001) *Alcohol Res Health* 25: 159-67.
- McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S. D., Landry, A., et al.: Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. (2008) *Nat Genet* 40: 1107-12.
- McGrother, C. W., Bhaumik, S., Thorp, C. F., Hauck, A., Branford, D., et al.: Epilepsy in adults with intellectual disabilities: prevalence, associations and service implications. (2006) *Seizure* 15: 376-86.
- Mencarelli, M. A., Katzaki, E., Papa, F. T., Sampieri, K., Caselli, R., et al.: Private inherited microdeletion/microduplications: implications in clinical practice. (2008) *Eur J Med Genet* 51: 409-16.
- Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., et al.: Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. (2010) *Am J Hum Genet* 86: 749-64.
- Moeschler, J. B. and Shevell, M.: Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. (2006) *Pediatrics* 117: 2304-16.
- Murthy, S. K., Nygren, A. O., El Shakankiry, H. M., Schouten, J. P., Al Khayat, A. I., et al.: Detection of a novel familial deletion of four genes between BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndrome critical region by oligo-array CGH in a child with neurological disorder and speech impairment. (2007) *Cytogenet Genome Res* 116: 135-40.
- Nelis, M., Esko, T., Magi, R., Zimprich, F., Zimprich, A., et al.: Genetic structure of Europeans: a view from the North-East. (2010) *PLoS One* 4: e5472.



- Nishimura, A., Hiraki, Y., Shimoda, H., Nishimura, G., Tadaki, H., et al.: De novo deletion of 1q24.3-q31.2 in a patient with severe growth retardation. (2010) *Am J Med Genet A* 152A: 1322-5.
- Noma, A. and Suzuki, T.: Ribonucleome analysis identified enzyme genes responsible for wybutosine synthesis. (2006) *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 65-6.
- Nowaczyk, M. J., Carter, M. T., Xu, J., Huggins, M., Raca, G., et al.: Paternal deletion 6q24.3: a new congenital anomaly syndrome associated with intrauterine growth failure, early developmental delay and characteristic facial appearance. (2008) *Am J Med Genet A* 146: 354-60.
- Okamoto, N., Tamura, D., Nishimura, G., Shimojima, K. and Yamamoto, T.: Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. (2011) *Am J Med Genet A* 155A: 2997-3001.
- Onesimo, R., Orteschi, D., Scalzone, M., Rossodivita, A., Nanni, L., et al.: Chromosome 9p deletion syndrome and sex reversal: Novel findings and redefinition of the critically deleted regions. (2012) *Am J Med Genet A* 158A: 2266-71.
- Orellana, C., Rosello, M., Monfort, S., Oltra, S., Quiroga, R., et al.: Corpus callosum abnormalities and the controversy about the candidate genes located in 1q44. (2009) *Cytogenet Genome Res* 127: 5-8.
- Ozgen, H. M., van Daalen, E., Bolton, P. F., Maloney, V. K., Huang, S., et al.: Copy number changes of the microcephalin 1 gene (MCPH1) in patients with autism spectrum disorders. (2009) *Clin Genet* 76: 348-56.
- Patja, K., Molsa, P. and Iivanainen, M.: Cause-specific mortality of people with intellectual disability in a population-based, 35-year follow-up study. (2001) *J Intellect Disabil Res* 45: 30-40.
- Piccione, M., Piro, E., Serraino, F., Cavani, S., Ciccone, R., et al.: Interstitial deletion of chromosome 2p15-16.1: report of two patients and critical review of current genotype-phenotype correlation. (2012) *Eur J Med Genet* 55: 238-44.
- Pohjola, P., de Leeuw, N., Penttinen, M. and Kaariainen, H.: Terminal 3p deletions in two families--correlation between molecular karyotype and phenotype. (2010) *Am J Med Genet A* 152A: 441-6.
- Pollex, R. L. and Hegele, R. A.: Copy number variation in the human genome and its implications for cardiovascular disease. (2007) *Circulation* 115: 3130-8.
- Poot, M., Kroes, H. Y., SE, V. D. W., Eleveld, M. J., Rooms, L., et al.: Dandy-Walker complex in a boy with a 5 Mb deletion of region 1q44 due to a paternal t(1;20)(q44;q13.33). (2007) *Am J Med Genet A* 143A: 1038-44.
- Poot, M., van der Smagt, J. J., Brilstra, E. H. and Bourgeron, T.: Disentangling the myriad genomics of complex disorders, specifically focusing on autism, epilepsy, and schizophrenia. (2011) *Cytogenet Genome Res* 135: 228-40.
- Portnoi, M. F.: Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. (2009) *Eur J Med Genet* 52: 88-93.
- Prontera, P., Bernardini, L., Stangoni, G., Capalbo, A., Rogaia, D., et al.: Deletion 2p15-16.1 syndrome: case report and review. (2010) *Am J Med Genet A* 155A: 2473-8.
- Rajcan-Separovic, E., Harvard, C., Liu, X., McGillivray, B., Hall, J. G., et al.: Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. (2007) *J Med Genet* 44: 269-76.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., et al.: Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. (2006) *Am J Med Genet A* 140: 2063-74.
- Raymond, F. L. and Tarpey, P.: The genetics of mental retardation. (2006) *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2: R110-6.

- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., et al.: Global variation in copy number in the human genome. (2006) *Nature* 444: 444-54.
- Riggs, E. R., Church, D. M., Hanson, K., Horner, V. L., Kaminsky, E. B., et al.: Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. (2011) *Clin Genet* 81: 403-12.
- Ropers, H. H.: Genetics of early onset cognitive impairment. (2010) *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11: 161-87.
- Rosenberg, C., Knijnenburg, J., Bakker, E., Vianna-Morgante, A. M., Sloos, W., et al.: Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. (2006) *J Med Genet* 43: 180-6.
- Rosenfeld, J. A., Stephens, L. E., Coppinger, J., Ballif, B. C., Hoo, J. J., et al.: Deletions flanked by breakpoints 3 and 4 on 15q13 may contribute to abnormal phenotypes. (2011) *Eur J Hum Genet* 19: 547-54.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., et al.: APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. (2006) *Nat Genet* 38: 24-6.
- Rueda, A. D. and Schmitter-Edgecombe, M.: Time estimation abilities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. (2009) *Neuropsychology* 23: 178-88.
- Rujescu, D., Ingason, A., Cichon, S., Pietilainen, O. P., Barnes, M. R., et al.: Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. (2009) *Hum Mol Genet* 18: 988-96.
- Saal, H. M., King, L. J., Zimmerman, D., Johnson, R. C., Carr, A. G., et al.: Loss of the N-myc oncogene in a patient with a small interstitial deletion of the short arm of chromosome 2. (1996) *Am J Med Genet* 66: 373-7.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., et al.: Strong association of de novo copy number mutations with autism. (2007) *Science* 316: 445-9.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., et al.: Large-scale copy number polymorphism in the human genome. (2004) *Science* 305: 525-8.
- Sharp, A. J., Hansen, S., Selzer, R. R., Cheng, Z., Regan, R., et al.: Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. (2006) *Nat Genet* 38: 1038-42.
- Sharp, A. J., Mefford, H. C., Li, K., Baker, C., Skinner, C., et al.: A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. (2008) *Nat Genet* 40: 322-8.
- Shaw-Smith, C., Pittman, A. M., Willatt, L., Martin, H., Rickman, L., et al.: Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. (2006) *Nat Genet* 38: 1032-7.
- Shinawi, M., Liu, P., Kang, S. H., Shen, J., Belmont, J. W., et al.: Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. (2010) *J Med Genet* 47: 332-41.
- Shinawi, M., Schaaf, C. P., Bhatt, S. S., Xia, Z., Patel, A., et al.: A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. (2009) *Nat Genet* 41: 1269-71.
- Shlien, A. and Malkin, D.: Copy number variations and cancer. (2009) *Genome Med* 1: 62.
- Shoukier, M., Schroder, J., Zoll, B., Burfeind, P., Freiberg, C., et al.: A de novo interstitial deletion of 2p23.3-24.3 in a boy presenting with intellectual disability, overgrowth, dysmorphic features, skeletal myopathy, dilated cardiomyopathy. (2012) *Am J Med Genet A* 158A: 429-33.

- Shuib, S., McMullan, D., Rattenberry, E., Barber, R. M., Rahman, F., et al.: Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome). (2009) *Am J Med Genet A* 149A: 2099-105.
- Schaaf, C. P., Boone, P. M., Sampath, S., Williams, C., Bader, P. I., et al.: Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions. (2012) *Eur J Hum Genet*: Epub.
- Scharer, O. D.: XPG: its products and biological roles. (2008) *Adv Exp Med Biol* 637: 83-92.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., et al.: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. (2002) *Nucleic Acids Res* 30: e57.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., et al.: alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. (2003) *Science* 302: 841.
- Stankiewicz, P. and Lupski, J. R.: Structural variation in the human genome and its role in disease. (2010) *Annu Rev Med* 61: 437-55.
- Stranger, B. E., Forrest, M. S., Dunning, M., Ingle, C. E., Beazley, C., et al.: Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. (2007) *Science* 315: 848-53.
- Su, P. H., Chen, J. Y., Tsao, T. F. and Chen, S. J.: De novo interstitial deletion of chromosome 2 (p23p24). (2010) *Pediatr Neonatol* 52: 46-50.
- Suemori, H. and Noguchi, S.: Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. (2000) *Dev Biol* 220: 333-42.
- Talseth-Palmer, B. A., Bowden, N. A., Meldrum, C., Nicholl, J., Thompson, E., et al.: A 1q44 deletion, paternal UPD of chromosome 2 and a deletion due to a complex translocation detected in children with abnormal phenotypes using new SNP array technology. (2009) *Cytogenet Genome Res* 124: 94-101.
- Tamer, L., Calikoglu, M., Ates, N. A., Yildirim, H., Ercan, B., et al.: Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. (2004) *Respirology* 9: 493-8.
- Thierry, G., Beneteau, C., Pichon, O., Flori, E., Isidor, B., et al.: Molecular characterization of 1q44 microdeletion in 11 patients reveals three candidate genes for intellectual disability and seizures. (2012) *Am J Med Genet A* 158A: 1633-40.
- Tyrer, F. and McGrother, C.: Cause-specific mortality and death certificate reporting in adults with moderate to profound intellectual disability. (2009) *J Intellect Disabil Res* 53: 898-904.
- Vagnerova, M. Psychopatologie pro pomáhající profese. (2004) Praha, Portál.
- van Bever, Y., Rooms, L., Laridon, A., Reyniers, E., van Luijk, R., et al.: Clinical report of a pure subtelomeric 1qter deletion in a boy with mental retardation and multiple anomalies adds further evidence for a specific phenotype. (2005) *Am J Med Genet A* 135: 91-5.
- van Bon, B. W., Mefford, H. C., Menten, B., Koolen, D. A., Sharp, A. J., et al.: Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. (2009) *J Med Genet* 46: 511-23.
- van den Broek, E. G., Janssen, C. G., van Ramshorst, T. and Deen, L.: Visual impairments in people with severe and profound multiple disabilities: an inventory of visual functioning. (2006) *J Intellect Disabil Res* 50: 470-5.
- van der Zwaag, B., Staal, W. G., Hochstenbach, R., Poot, M., Spierenburg, H. A., et al.: A cosegregating microduplication of chromosome 15q11.2 pinpoints two risk genes for autism spectrum disorder. (2010) *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B: 960-6.

- Vermeesch, J. R., Balikova, I., Schrandt-Stumpel, C., Fryns, J. P. and Devriendt, K.: The causality of de novo copy number variants is overestimated. (2011) *Eur J Hum Genet* 19: 1112-3.
- Vissers, L. E., Bhatt, S. S., Janssen, I. M., Xia, Z., Lalani, S. R., et al.: Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. (2009) *Hum Mol Genet* 18: 3579-93.
- Vuillaumier-Barrot, S., Quijano-Roy, S., Bouchet-Seraphin, C., Maugenre, S., Peudener, S., et al.: Four Caucasian patients with mutations in the fukutin gene and variable clinical phenotype. (2009) *Neuromuscul Disord* 19: 182-8.
- Walsh, T., McClellan, J. M., McCarthy, S. E., Addington, A. M., Pierce, S. B., et al.: Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. (2008) *Science* 320: 539-43.
- Walters, R. G., Jacquemont, S., Valsesia, A., de Smith, A. J., Martinet, D., et al.: A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. (2010) *Nature* 463: 671-5.
- Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., Arking, D. E., Miller, D. T., et al.: Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. (2008) *N Engl J Med* 358: 667-75.
- Wentzel, C., Fernstrom, M., Ohrner, Y., Anneren, G. and Thuresson, A. C.: Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. (2008) *Eur J Med Genet* 51: 501-10.
- WHO. The tenth revision of the international classification of diseases and related health problems (ICD-10). (1992) Geneva, World Health Organisation.
- Wohlleber, E., Kirchhoff, M., Zink, A. M., Kreiss-Nachtsheim, M., Kuchler, A., et al.: Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. (2011) *Eur J Med Genet* 54: 67-72.
- Xu, B., Roos, J. L., Levy, S., van Rensburg, E. J., Gogos, J. A., et al.: Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. (2008) *Nat Genet* 40: 880-5.
- Yeo, G. S., Connie Hung, C. C., Rochford, J., Keogh, J., Gray, J., et al.: A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. (2004) *Nat Neurosci* 7: 1187-9.
- Zahir, F. R., Baross, A., Delaney, A. D., Eydoux, P., Fernandes, N. D., et al.: A patient with vertebral, cognitive and behavioural abnormalities and a de novo deletion of NRXN1alpha. (2007) *J Med Genet* 45: 239-43.
- Zollino, M., Orteschi, D., Murdolo, M., Lattante, S., Battaglia, D., et al.: Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. (2012) *Nat Genet* 44: 636-8.
- Zuker, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. (2003) *Nucleic Acids Res* 31: 3406-15.

## Prílohy

### Publikácia 1 (IF 1,843)

M. Hancarova, J. Drabova, Z. Zmitkova, M. Vlckova, P. Hedvicakova, D. Novotna, Z. Vlckova, S. Vejvalkova, T. Marikova, Z. Sedlacek: Array comparative genome hybridization in patients with developmental delay: two example cases. *N Biotechnol.* 2012 Feb 15;29(3):321-4.

### Publikácia 2 (IF 1,783)

M. Vlckova, M. Trkova, Z. Zemanova, M. Hancarova, D. Novotna, D. Raskova, A. Puchmajerova, J. Drabova, Z. Zmitkova, Y. Tan, Z. Sedlacek: Mechanism and Genotype-Phenotype Correlation of Two Proximal 6q Deletions Characterised Using mBAND, FISH, Array CGH and DNA Sequencing. *Cytogenet Genome Res.* 2012;136(1):15-20.

### Publikácia 3 (IF 5,391)

E. Mejstříková, A. Janda, O. Hrušák, H. Bučková, M. Vlčková, M. Hančárová; T. Freiburger, B. Ravčuková; K. Veselý, L. Fajkusová, L. Kopečková, D. Sumerauer, E. Kabičková, A. Šedivá, J. Starý and Z. Sedláček: Skin lesions in a boy with X-linked lymphoproliferative disorder. Comparison of 5 SH2D1A deletion cases. *Pediatrics*, 2012 Feb;129(2):e523-8.

### Publikácia 4 (IF 2,391)

M. Hancarova, M. Simandlova, J. Drabova, K. Mannik, A. Kurg, Z. Sedlacek: A Patient with de novo 0.45 Mb Deletion of 2p16.1: The Role of BCL11A, PAPOLG, REL and FLJ16341 in 2p15-16.1 Microdeletion Syndrome. *Am J Med Genet A.*, v tlači

### Publikácia 5 (IF 2,178)

M. Hancarova, M. Simandlova, J. Drabova, M. Koudova, M. Havlovicova, Z. Sedlacek: Chromosome 12q13.13 deletions involving the HOXC cluster: the phenotype and candidate genes. *Eur J Med Genet.*, v recenznom riadení

### Publikácia 6 (IF 2,341)

M. Hancarova, S. Vejvalkova, M. Trkova, J. Drabova, A. Dleskova, Z. Sedlacek: Identification and analysis of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15. *Gene*, v recenznom riadení

## Elektronická príloha

Zoznam použitých primerov, vlastných syntetických prób a podmienok PCR



# Array comparative genome hybridization in patients with developmental delay: two example cases

Research Paper

Miroslava Hancarova, Jana Drabova, Zuzana Zmitkova, Marketa Vlckova, Petra Hedvicakova, Drahuse Novotna, Zdenka Vlckova, Sarka Vejvalkova, Tatana Marikova and Zdenek Sedlacek

Department of Biology and Medical Genetics, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

Developmental delay is often a predictor of mental retardation (MR) or autism, two relatively frequent developmental disorders severely affecting intellectual and social functioning. The causes of these conditions remain unknown in most patients. They have a strong genetic component, but the specific genetic defects can only be identified in a fraction of patients. Recent developments in genomics supported the establishment of the causal link between copy number variants in the genomes of some patients and their affection. One of the techniques suitable for this analysis is array comparative genome hybridization, which can be used both for detailed mapping of chromosome rearrangements identified by classical cytogenetics and for the identification of novel submicroscopic gains or losses of genetic material. We illustrate the power of this approach in two patients. Patient 1 had a cytogenetically visible deletion of chromosome X and the molecular analysis was used to specify the gene content of the deletion and the prognosis of the child. Patient 2 had a seemingly normal karyotype and the analysis revealed a small recurrent deletion of chromosome 1 likely to be responsible for his phenotype. However, the genetic dissection of MR and autism is complicated by high heterogeneity of the genetic aberrations among patients and by broad variability of phenotypic effects of individual genetic defects.

## Introduction

Child development is a process of acquiring skills in several domains (cognitive, social, emotional, speech/language, and motor) during specific time periods. Developmental delay is defined as significant delay in two or more domains, and is thought to predict a future diagnosis of mental retardation (MR) and/or autism [1]. MR is a disability with limitations in intellectual functioning and adaptive behavior diagnosed before the age of 18 years [2]. It can be classified into four categories: mild (IQ 50–70), moderate (IQ 35–50), severe (IQ 20–35), and profound (IQ < 20). Autism is a disorder characterized by impairments of social interaction and communication, and unusual, often stereotyped behavior and interests [2]. Around 0.5–1% and 2–3% of

population suffer from autism and MR, respectively [3–5]. Both conditions can be syndromic (if associated with other symptoms like facial dysmorphism) or non-syndromic (if no other consistent clinical or metabolic features are present).

Autism and MR affect the brain, the most complex human organ, and their causes are therefore also complex. Environmental factors include maternal infections or drug use in pregnancy and perinatal complications [4,5]. However, the genetic component is much more important in both conditions, as shown in twin and family studies [6,7]. Defined genetic syndromes, mutations in several specific genes, and cytogenetically visible or submicroscopic chromosome aberrations currently account for about 20% of the cases, but these causes are very heterogeneous with no one specific genetic defect being responsible for more than 1–2% of the cases [3,8,9].

Corresponding author: Sedlacek, Z. (zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz)

If autism and MR were polygenic or multifactorial, the causal alleles could be detectable by whole-genome association studies. However, the results of these studies were rather disappointing because of low odds ratio and low level of replication [3]. Nevertheless, these analyses pointed to a more frequent occurrence of copy number variants (CNVs) in patients with autism and MR. CNVs are variably deleted or amplified regions of the genome, often involving genes. This variability is likely to contribute to phenotypic variability including the predisposition to diseases or the occurrence of cognitive and behavioral disorders or congenital defects [10,11].

The association of autism and MR with rare CNVs led to a shift in the understanding these two conditions from the multifactorial model (based on an interplay of common genetic variants with low effect) to the multiple rare variant model. Most affected individuals may carry unique genetic defects with strong effect, often arising *de novo* [8,9]. This model also explains the difficulties of whole-genome association studies to identify the predisposing loci, possibly just with regions containing clustering of different rare variants giving positive scores [12].

CNVs are detected using genomic approaches including array comparative genome hybridization (aCGH), which has undergone a remarkable shift in genome coverage and resolution since its first description [13,14]. In patients with defects identified using karyotyping (which has a resolution limit of several Mb), aCGH can specify the extent of the rearrangement and more precisely map the breakpoints. In cytogenetically normal patients, aCGH can reveal submicroscopic gains or losses of chromosome material. In both cases aCGH can point to genes potentially causing the phenotypes, and help to identify the mechanisms of the rearrangements.

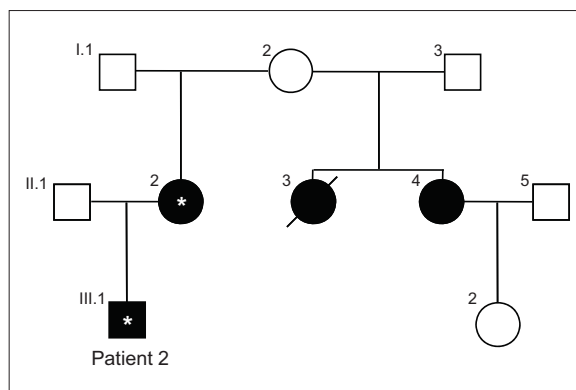
In this report we illustrate the power of aCGH in two patients with developmental delay. In the first patient a large deletion was identified using karyotyping and aCGH allowed the determination of its exact size and gene content which had immediate consequences for the prognosis in this patient. In the second patient with a seemingly normal karyotype, the aCGH analysis revealed a small cytogenetically invisible deletion likely to be responsible for his phenotype.

## Materials and methods

### Patients

Patient 1 was admitted to the hospital at the age of six weeks with an electrolyte imbalance, renal failure and elevated levels of creatine kinase, adrenocorticotrophic hormone and liver markers. He also suffered from hyponatremia, dehydration, proteinuria, high level of glycerol in the urine and weak spontaneous mobility. At a follow-up check at the age of two years he showed mild psychomotor retardation. His parents were healthy and the family history was not remarkable.

Patient 2 had a remarkable family history of MR and congenital defects (Fig. 1). At the age of 12 years, the boy (III.1) suffered from mild MR, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) with autistic features and microcephaly. After birth he presented with hypotonia, and his psychomotor development was disharmonic. His mother (II.2) also suffered from delayed development in childhood and showed behavioral problems and mental deficit. Both she and her maternal half-sister (II.4) suffered from congenital defects



**FIGURE 1**

Pedigree of the family of Patient 2. Individuals with MR and/or congenital defects (see text for details) are represented by black symbols, and those in whom the deletion was identified are marked with asterisks. DNA from other family members was not available for study.

(syndactyly and cleft palate, respectively). Another maternal half-sister (II.3) with multiple malformations (caudal regression, gastro-schisis, anal atresia and colon agenesis, persistent cloaca, and meningocoele) died soon after birth. Their mother, the grandmother of the patient (I.2), had no remarkable phenotype. Only the DNA of Patient 2 and his mother were available for testing.

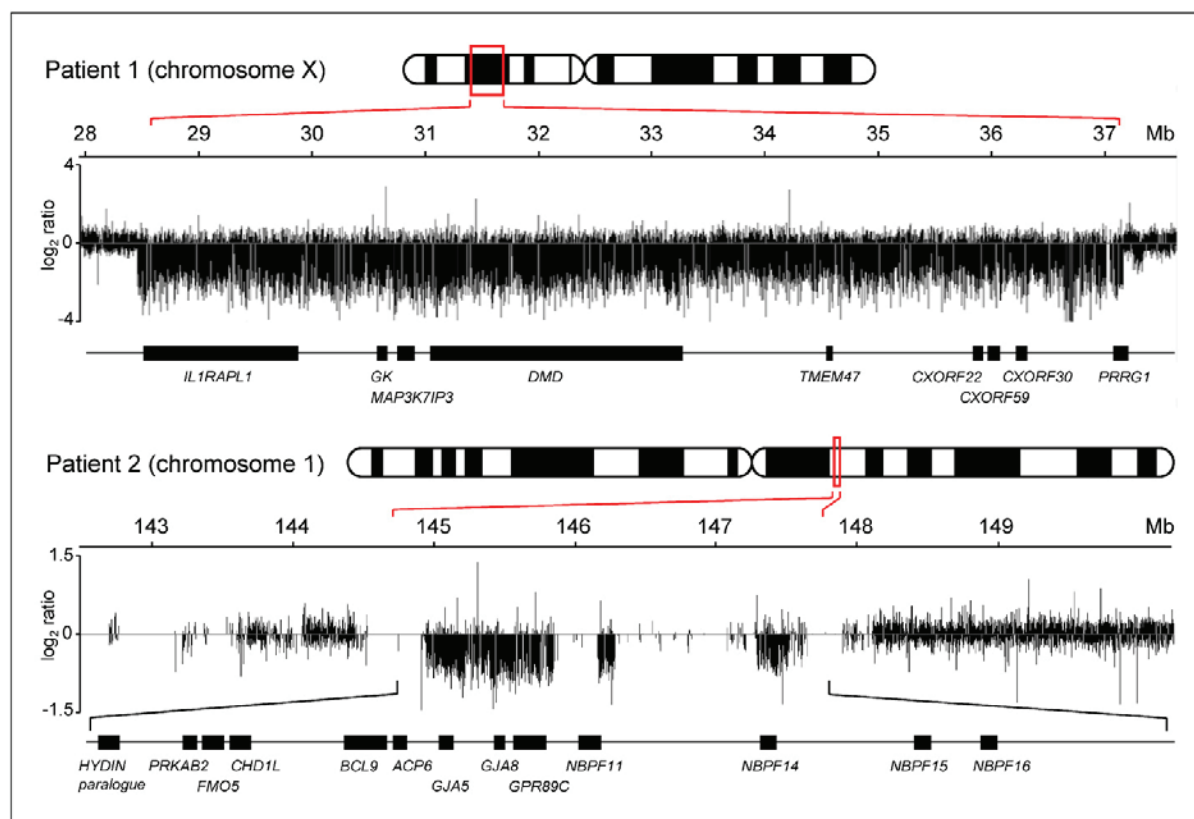
### Laboratory methods

Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of the patients and their parents were analyzed using standard cytogenetic techniques. Further delineation of the aberrations was performed using fluorescence in situ hybridization (FISH) with a chromosome X painting probe (WCP X, Cytocell) in Patient 1, and a locus-specific probe (RP11-533N14, BlueGnome) in Patient 2, according to the recommendations of the manufacturer.

Genomic DNA was isolated from blood lymphocytes of the patients and their parents using the Genra Puregene Blood Kit (Qiagen). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed using the SALSA MLPA KIT P034/P035 DMD/Becker (MRC-Holland) according to the instructions of the manufacturer. Whole-genome aCGH analysis of Patient 2 was performed using a bacterial artificial chromosome (BAC) array with median backbone probe spacing of 565 kb (CytoChip V3, BlueGnome) according to the instructions of the manufacturer. Custom high resolution aCGH analysis of Patient 1 and Patient 2 was performed by Nimblegen on catalogue oligonucleotide CGH arrays specific for chromosome X (HG18\_CHRX\_FT, median probe spacing of 340 bp) and chromosome 1 (HG18\_CHR1\_FT, median probe spacing of 541 bp), respectively. The results were analyzed using the SignalMap software (Nimblegen). Long-range PCR used the Expand Long Template PCR System (Roche). The gene content of the deletions was analyzed using the UCSC and Ensembl genome browsers (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, <http://www.ensembl.org/index.html>) and the hg18 assembly.

### Results

The phenotype of Patient 1 and his biochemical findings were suggestive of glycerol kinase deficiency (GKD) and Duchenne



**FIGURE 2**

The results of aCGH analysis of the deletions in Patient 1 and Patient 2 using chromosome-specific high resolution arrays. The regions of decreased signal ratios correspond to the deletions. This analysis allowed precise mapping of the breakpoints (which was not possible using karyotyping and low resolution arrays used initially to identify the deletions in Patient 1 and Patient 2, respectively), and the assessment of gene content of the deletions. Regions devoid of signals correspond to segmental duplications and low-copy repeats not represented on the chromosome 1 specific array.

muscular dystrophy (DMD). This prompted us to perform cytogenetic analysis aimed primarily at deletions of the X chromosome. Indeed, his karyotype was 46,XY,del(X)(p21.2p21.3), and the deletion was likely to encompass the above-mentioned two loci. The same deletion was also identified in his asymptomatic mother. FISH analysis showed that the deleted segment was not translocated to any other chromosome. MLPA analysis of the *DMD* gene of Patient 1 revealed a deletion of all exons, and classical PCR analysis indicated the deletion of several additional genes (*GK*, *NROB1* and *IL1RAPL1*). aCGH analysis confirmed an 8.7 Mb long deletion between Mb 28.5 and 37.2 of the X chromosome containing a total of nine protein coding genes (Fig. 2). The distal breakpoint of the deletion was located between the *DCAF8L1* and *IL1RAPL1* genes, and the proximal breakpoint was located in the *PRRG1* gene. Both breakpoints mapped to regions of unique DNA or dispersed repeats and there was no obvious homology between the breakpoint regions. Repeated attempts to clone the deletion junction using long-range PCR were not successful.

The karyotype of Patient 2 was normal, but the low resolution aCGH analysis showed a deletion of chromosome region 1q21.1. While the signals from BACs RP11-373C9 and RP11-763B22 were

normal, BAC RP11-94I2 yielded a borderline signal, and low signals from BACs RP11-47D6, RP11-563P13, RP11-441L11, RP11-533N14, RP11-314N2 and RP11-301M17 clearly indicated a deletion. The remaining chromosomes did not show any copy number aberrations. The deletion was fine mapped using high resolution aCGH to Mb 144.8–147.8 of chromosome 1 (Fig. 2). The size of the deletion was about 3 Mb and it contained 13 protein coding genes. Both breakpoints were located in extended complex regions of segmental duplication and low-copy repeats. The deletion was confirmed in Patient 2 using FISH with BAC probe RP11-533N14, and the same technique was used to identify the same deletion in his mother.

### Discussion

The results obtained in our patients clearly illustrate the power of aCGH for the detailed analysis of cytogenetically visible defects and for the detection of rare submicroscopic CNVs associated with developmental delay, autism and MR.

The molecular analyses in Patient 1 confirmed the suspected diagnosis of a rare X-linked recessive disorder, complex GKD. In contrast to isolated GKD, which is caused by point mutations in the glycerol kinase gene (*GK*), complex GKD is a contiguous gene



syndrome caused by a deletion of the *GK* locus together with other Xp21 sequences including the adrenal hypoplasia congenita locus (*NROB1* gene) and/or *DMD* [15]. About 100 patients with complex GKD have been reported, and their phenotypes usually reflected the variable size of their deletions. The analysis of gene content of the deletions is therefore an important prognostic factor. Patient 1 carried a rather large deletion including the *IL1RAPL1* gene, which has been associated with MR and autism [16,17], and his prognosis with respect to these two conditions was therefore rather unfavorable. In accord with this prognosis, Patient 1 showed at the age of 2 years mild psychomotor retardation. The breakpoints of the deletion were unique and contained no segmental duplications or low-copy repeats.

A genetic basis of the phenotype and the remarkable family history of Patient 2 was suspected but completely unknown. The molecular analysis using whole-genome aCGH identified a sub-microscopic deletion of chromosome 1 in the distal 1q21.1 region, which was subsequently fine mapped using high resolution aCGH. This recently described microdeletion is recurrent, and its formation is mediated by recombination between segmental duplications flanking the deleted region [18,19]. In large collections of affected individuals this deletion has been associated with a complex and variable phenotype which often included MR and autism or ADHD, microcephaly and a wide range of other congenital anomalies. This deletion removes several protein coding genes including a paralog of the *HYDIN* gene which is suspected to cause microcephaly and other neuropsychiatric features in the deletion carriers [18]. The deletion of 1q21.1 is often inherited from a less affected or even seemingly normal parent [18,19]. The mildly affected mother of Patient 2 was shown to carry the deletion, and the family history suggested that also her two half-sisters could be carriers. Their unaffected mother, the grandmother of Patient 2, could also carry the deletion, or at least a germline mosaic of this defect.

Patient 2 illustrates very clearly several key problems of the recent concept of genetics of autism and MR. First, there is a very substantial heterogeneity at the phenotype level, and the clinical picture of carriers of a particular genetic defect can be very variable, even within one family. The phenotypic spectrum in 1q21.1 deletion carriers ranges from completely normal individuals through various mild to fully expressed psychiatric phenotypes to very severe congenital defects [18,19], and this is similar for other CNVs. The reason for this variability is generally unknown but it is speculated that the genetic background (the genotype of the individual at other genome loci), epigenetic status and interaction with environmental triggers are playing the key role [20]. It has been proposed recently that full phenotypic expression of one CNV can be dependent on the co-occurrence of other CNVs in the same individual [21]. Second, the spectrum of genetic defects underlying autism and MR in individual patients can be extremely broad, and individual genetic defects can be extremely rare. Although the microdeletion of 1q21.1 has clearly been associated with autism and MR, its frequency among affected individuals reaches only 0.2–0.5% [18,19], and thus the diagnostic yield of this rearrangement is very low. The same applies to most other genetic defects currently known to be responsible for these conditions [3,8,9]. This precludes the possibility to design a simple targeted diagnostic genetic test. It is probable that the continuing improvements and increasing affordability of high resolution genome analysis methods including whole-genome sequencing will soon lead to the identification of the ‘missing heritability’ in an increasing fraction of sufferers from complex diseases, and will at the same time offer efficient tools for their routine diagnostics.

### Acknowledgements

Supported by grants MZOFNM2005 from the Ministry of Health of the Czech Republic, and INCORE (FP6 043318) and CHERISH (FP7 223692) from the European Commission.

### References

- Accardo, P. and Capute, A. (1995) Intellectual disability. In *Principles and Practice of Pediatrics* (Osaki, F. and Diangelis, C.D., eds), pp. 673–679. Lippincott, Philadelphia
- American Psychiatric Association, (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)* (4th ed.), American Psychiatric Association, Washington DC
- Abrahams, B.S. and Geschwind, D.H. (2008) Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* 9, 341–355
- Levy, S.E. et al. (2009) Autism. *Lancet* 374, 1627–1638
- Roeleveld, N. et al. (1997) The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev. Med. Child Neurol.* 39, 125–132
- Jorde, L.B. et al. (1991) Complex segregation analysis of autism. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 932–938
- Bailey, A. et al. (1995) Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* 25, 63–77
- Buxbaum, J.D. (2009) Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dialog. Clin. Neurosci.* 11, 35–43
- Vissers, L.E. et al. (2010) Genomic microarrays in mental retardation: from CNV to gene, from research to diagnosis. *J. Med. Genet.* 47, 285–297
- Iafate, A.J. et al. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* 36, 949–951
- Conrad, D.F. et al. (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704–712
- Dickson, S.P. et al. (2010) Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol.* 8, e1000294
- Chen, X. et al. (2009) New tools for functional genomic analysis. *Drug Discov. Today* 14, 754–760
- Solinas-Toldo, S. et al. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromos. Cancer* 20, 399–407
- Sjarif, D.R. et al. (2000) Isolated and contiguous glycerol kinase gene disorders: a review. *J. Inher. Metab. Dis.* 23, 529–547
- Piton, A. et al. (2008) Mutations in the calcium-related gene *IL1RAPL1* are associated with autism. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3965–3974
- Carrie, A. et al. (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 23, 25–31
- Brunetti-Pierri, N. et al. (2008) Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat. Genet.* 40, 1466–1471
- Mefford, H.C. et al. (2008) Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N. Engl. J. Med.* 359, 1685–1699
- Manolio, T.A. et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753
- Girirajan, S. et al. (2010) A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat. Genet.* 42, 203–209

## Mechanism and Genotype-Phenotype Correlation of Two Proximal 6q Deletions Characterized Using mBAND, FISH, Array CGH, and DNA Sequencing

M. Vlckova<sup>a</sup> M. Trkova<sup>b</sup> Z. Zemanova<sup>c</sup> M. Hancarova<sup>a</sup> D. Novotna<sup>a</sup>  
D. Raskova<sup>b</sup> A. Puchmajerova<sup>a</sup> J. Drabova<sup>a</sup> Z. Zmitkova<sup>a</sup> Y. Tan<sup>a</sup>  
Z. Sedlacek<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, <sup>b</sup>Gennet, and <sup>c</sup>Center of Oncocytogenetics, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University 1st Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic

### Key Words

Array CGH · Centromere fission · Deletion junction · Marker chromosome · Proximal 6q deletion

### Abstract

Proximal 6q deletions have a milder phenotype than middle and distal 6q deletions. We describe 2 patients with non-overlapping deletions of about 15 and 19 Mb, respectively, which subdivide the proximal 6q region into 2 parts. The aberrations were identified using karyotyping and analysed using mBAND and array CGH. The unaffected mother of the first patient carried a mosaic karyotype with the deletion in all metaphases analysed and a small supernumerary marker formed by the deleted material in about 77% of cells. Her chromosome 6 centromeric signal was split between the deleted chromosome and the marker, suggesting that this deletion arose through the centromere fission mechanism. In this family the location of the proximal breakpoint in the centromere prevented cloning of the deletion junction, but the junction of the more distal deletion in the second patient was cloned and sequenced. This analysis showed that the latter aberration was most likely caused by non-homologous end joining. The second patient also had a remarkably

more severe phenotype which could indicate a partial overlap of his deletion with the middle 6q interval. The phenotypes of both patients could be partly correlated with the gene content of their deletions and with phenotypes of other published patients.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Three different phenotypic groups have been suggested in carriers of interstitial 6q deletions according to the location of the defect: proximal deletions (6q11q16) with upslanted fissures, thin lips, and hernias; middle deletions (6q15q25) with microcephaly, hypertelorism, intrauterine growth retardation, respiratory problems, and limb malformations; and distal deletions (6q25qter) with cleft palate, retinal abnormalities, genital hypoplasia, and seizures [Hopkin et al., 1997]. Hypotonia, ear and facial dysmorphism, and mental retardation are common to all 3 groups [Hopkin et al., 1997]. However, most of the older studies were based solely on karyotyping, and the size and location of the deletions were determined only at low resolution. The recent boom of microarray methods allows fine mapping of the deletion breakpoints and a much more precise delineation of the extent and gene content

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel  
1424-8581/11/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/cgr

Zdenek Sedlacek  
Department of Biology and Medical Genetics  
Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol  
Plzenska 130/221, CZ-15000 Prague 5 (Czech Republic)  
Tel. +420 257 296 153, E-Mail zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz

of the aberrations which in turn allows better genotype-phenotype correlations. In addition, molecular analysis of the deletion breakpoints can shed light on the aberration mechanisms.

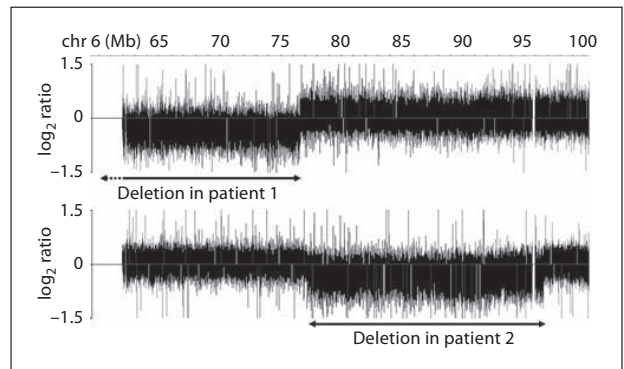
We present 2 patients with proximal 6q deletions identified using karyotyping. Detailed analysis of the deletions showed that they subdivided the proximal 6q region into 2 parts of similar size. One of the deletions involved the centromere and arose most likely through the centromere fission mechanism, while the second deletion was probably caused by non-homologous end joining. The patients had remarkably different phenotypes which could be partly correlated with the gene content of their deletions and with phenotypes of other patients with proximal 6q deletions.

## Materials and Methods

### Case Report

Patient 1 was the second child of healthy unrelated parents. The age of the mother and father was 41 and 45 years, respectively. The pregnancy was uneventful. Cytogenetic analysis of amniotic fluid cells performed due to advanced maternal age showed an apparently normal female karyotype. The delivery was at the 31st week of gestation by Caesarean section due to breech and fetal distress. The birth weight of the girl was 1,740 g (>75th centile) and length was 44 cm (>75th centile). The neonatal period was unremarkable. At the age of 2 months she developed hypotonia and affective paroxysms. EEG showed an abnormal pattern, and subsequent MRI proved delayed myelination and bilateral frontal lobe atrophy, but no other major anomalies. The girl was referred to a geneticist at the age of 3 years because of developmental delay and absent speech. She had mild facial dysmorphism (high forehead, hypertelorism, epicanthal folds, dysplastic ears), single palmar crease on the right hand, pectus excavatum, hypotonia, and mild mental retardation. The audiologic exam was normal.

Patient 2 was the first child of healthy unrelated 30-year-old parents. Fetal ultrasound showed a heart defect and cleft palate. Prenatal karyotype was 46,XY,?del(6)(q?). During the third trimester, polyhydramnion occurred. The boy was born at the 40th week of gestation by spontaneous delivery. His weight was 3,390 g (>50th centile) and length was 53 cm (>95th centile). He suffered from a congenital heart defect (common atrium), cleft palate, and diaphragmatic hernia. Facial dysmorphism (low forehead, epicanthal folds, prominent eyelids, broad nasal tip, anteverted flared nostrils, long philtrum, micrognathia, dysplastic ears), atypical dermatoglyphs, micropenis, and cryptorchidism were also present. On examination at the age of 8 months his length was 74 cm (>50th centile), weight was 8,720 g (25th centile), and head circumference was 48 cm (95th centile). The boy suffered from developmental delay, seizures, laryngomalacia, bilateral iris coloboma and optic disc hypoplasia, and showed hypermobility of joints. EEG proved focal epilepsy, and CT scan showed global atrophy of the brain, partial agenesis of corpus callosum, and dilatation of the ventricles.



**Fig. 1.** Fine mapping of deletions in patients 1 and 2 using array CGH. The deletions are marked by double arrows. In patient 1 the proximal breakpoint mapped to the centromere gap and the exact size of the deletion was not known (dashed arrow). The deletions did not overlap and were separated by about 0.7 Mb of DNA.

### Karyotyping, Array CGH, mBAND, FISH, and Molecular Analysis of the Breakpoints

Cytogenetic analysis of blood lymphocytes was performed using standard protocols. mBAND analysis with the XCyte6 probe (MetaSystems, Altlußheim, Germany) was used for fine assessment of the deletions in both patients. Chromosome 6 painting probe WCP6 (Cambio, Cambridge, UK) was used to exclude a balanced insertional translocation in the parents of patient 2. FISH analysis of patient 1 and her mother was performed with chromosome 6 centromeric probe D6Z1 (Cytocell, Cambridge, UK). Genomic DNA was isolated from blood using Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Custom array CGH analysis was performed by Nimblegen on the catalogue array HG18\_CHR6\_FT with median probe spacing of 404 bp, and the results were analysed using SignalMap (Nimblegen, Madison, Wisc., USA). Long-range PCR (LR-PCR) used the Expand Long Template PCR System (Roche, Basel, Switzerland). The primer sequences are available on request. PCR fragments were purified using QIAamp PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced on an ABI PRISM 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). Bioinformatic analysis used the hg18 human genome assembly available in the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

## Results

Karyotyping of patient 1 showed a small deletion of 6q11q13. Array CGH mapped the proximal deletion breakpoint to the centromere genome assembly gap (chr 6 Mb 58.89–61.94). The distal breakpoint mapped around Mb 76.55. The total size of the deleted region was ~15 Mb (fig. 1). It contained 34 protein-coding RefSeq genes. The unaffected mother of patient 1 carried a mosaic karyo-

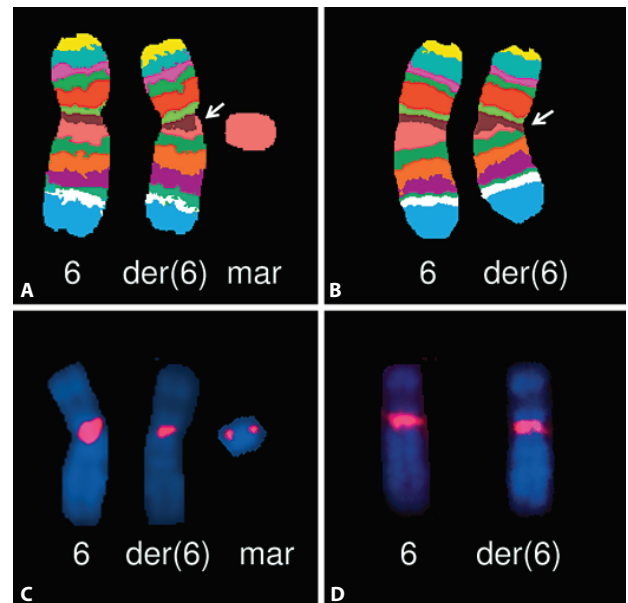
type with the same deletion in all metaphases analysed and, in addition, a small supernumerary marker in 77% of cells, probably a ring chromosome. mBAND analysis confirmed that the marker chromosome constituted of proximal 6q material deleted from the derived chromosome 6 (fig. 2A).

Postnatal cytogenetic analysis of patient 2 revealed a deletion of 6q14q16, and mBAND analysis confirmed the result of the karyotyping (fig. 2B). Chromosome painting excluded a balanced insertional translocation in both parents who had normal karyotypes. Array CGH analysis of patient 2 indicated that the deletion affected chromosome 6 between Mb 77.23–96.63. The length of the deletion was ~19.5 Mb (fig. 1). The deleted region contained 58 protein-coding RefSeq genes.

FISH analysis of the mother of patient 1 with the chromosome 6 centromeric probe showed in all cells analysed a significantly weaker signal from the derivative chromosome 6 compared to the normal homologue, and a weak signal was also present on the marker chromosome (fig. 2C). However, the signals from the normal and deleted chromosome 6 homologues of patient 1 were of similar intensity (fig. 2D).

Fine mapping of the distal deletion breakpoint in patient 1 was a prerequisite for the intended cloning of the proximal breakpoint using inverse PCR. Array CGH suggested that the distal breakpoint mapped to intron 1 of the *MYO6* gene, within a 3.5-kb DNA stretch proximal to nucleotide 76,555,196. Sequence analysis of a series of PCR products of genomic DNA spanning known SNPs and/or possible STRs showed that patient 1 was heterozygous for SNP rs2748963 (G/T) at nucleotide 76,559,033 while all markers in the 10.5-kb interval proximal to this SNP were non-informative (homo- or hemizygous). Heterozygosity for SNP rs2748963 was retained in LR-PCR products extending to nucleotide 76,554,600. This nucleotide was located at the distal end of a 3-kb long contiguous cluster of various Alu and L1 repeats (fig. 3). This information together with the array data indicated that the distal deletion breakpoint in patient 1 was most likely located within this repetitive element cluster, precluding the use of inverse PCR for cloning of the proximal breakpoint located in the centromeric heterochromatin.

In patient 2 the proximal breakpoint mapped between the *IMPG1* and *HTR1B* genes, and the distal breakpoint was located in intron 1 of *FUT9*. The deletion junction was bridged with a LR-PCR product. Sequencing of this DNA fragment showed that the deletion joined nucleotides 77,231,427 and 96,635,141, with 7 nucleotides not belonging to any of the breakpoints added at the junction



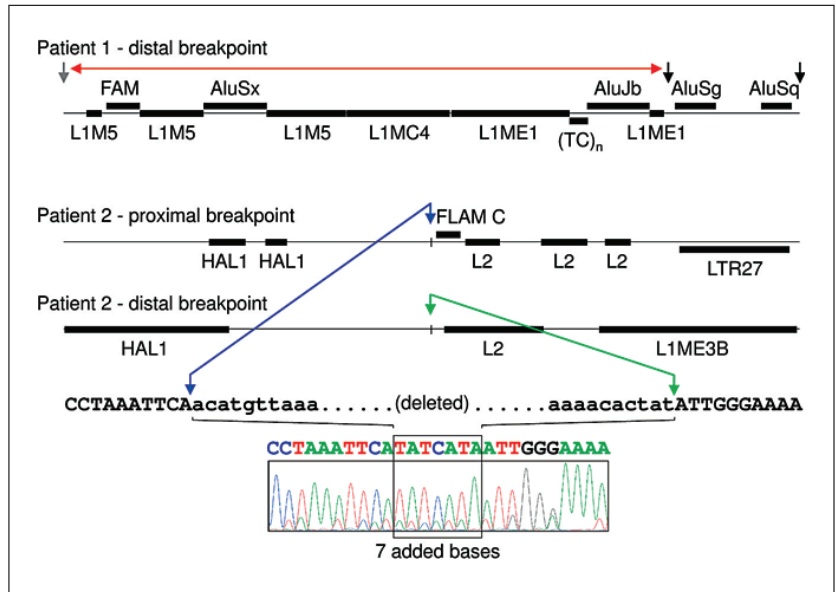
**Fig. 2.** mBAND analysis of chromosome 6 in the mother of patient 1 (A) and in patient 2 (B), and FISH analysis of chromosome 6 centromere in the mother of patient 1 (C) and in patient 1 (D). The mBAND analyses showed small deletions of proximal 6q (arrows) in both cases (A, B). The marker chromosome in the mother of patient 1 consisted of proximal 6q material deleted from the derived chromosome 6 (A). The signals of the chromosome 6 centromeric probe were present both on the deleted homologue and the marker (2 signals may suggest a double ring chromosome) in the mother of patient 1, and the signal on the deleted homologue was weaker than that on the normal chromosome 6 (C). In patient 1 no difference in signal intensity could be observed (D).

(fig. 3). No low copy repeats or dispersed repetitive elements were involved in the breakpoints, and their sequences had no homology (fig. 3).

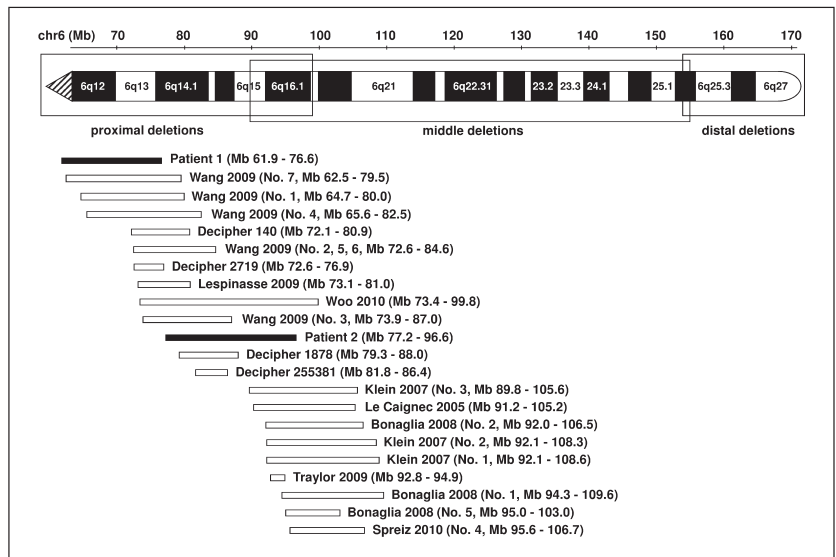
## Discussion

To our knowledge, 20 patients with deletions affecting the proximal 6q region and possibly extending to the adjacent part of middle 6q have been analyzed using array CGH and described in the literature [Le Caignec et al., 2005; Klein et al., 2007; Bonaglia et al., 2008; Derwinska et al., 2009; Lespinasse et al., 2009; Traylor et al., 2009; Wang et al., 2009; Spreiz et al., 2010; Woo et al., 2010] or the Decipher database [Firth et al., 2009] (fig. 4). Most of these patients were analysed using low-resolution arrays, and in none of them an attempt was made to clone the

**Fig. 3.** Repeats at the distal deletion breakpoint in patient 1 and repeat content and sequence of both breakpoints in patient 2. LINE repeats in the 3.5-kb regions around the breakpoints are drawn on the line, SINE repeats above and other repeats below the line. In patient 1 (with the proximal breakpoint in the centromere gap), the distal breakpoint could be mapped only approximately to a cluster of repeats (red horizontal double arrow). The gray arrow marks the position very likely to be single-copy based on the array CGH data. The right black arrow points to heterozygous SNP rs2748963, and heterozygosity was retained on LR-PCR products extending to the position marked by the left black arrow. In patient 2 both the proximal (blue arrows) and distal breakpoints (green arrows) were located in repeat-poor regions. DNA sequencing showed that 7 bases were added at the junction. The deleted sequence is in lowercase.



**Fig. 4.** Alignment of deletions in patients 1 and 2 with published deletions. Only patients with deletions not associated with other rearrangements, fine mapped using array methods and overlapping with but not extending significantly the region covered by deletions in our patients, were included. The ideogram on top shows the classification of 6q deletions.



deletion breakpoints and to elucidate the mechanisms of the aberrations.

The aberration in the mother of our patient 1 was likely caused by centromere fission. This mechanism of parallel formation of a deleted chromosome and a marker, most often a ring chromosome derived from the deleted material, was proposed by Barbara McClintock in 1938 and recently suggested to be referred to by her name

[Baldwin et al., 2008]. The marker probably compensated for the deletion and caused the normal phenotype of the mother. However, due to its likely ring structure and the inherent instability of rings [Kosztolanyi, 1987], this marker was present only in a mosaic state, and was not transmitted or was lost in the early development of patient 1. About a dozen of patients who inherited an unbalanced karyotype from a parent with a balanced constitu-

tion involving centromere misdivision have been described [reviewed in Burnside et al., 2011]. Interestingly, while in the mother the centromeric signal from the deleted chromosome 6 was significantly weaker than that from the normal homologue, possibly reflecting the centromere fission, both chromosomes 6 in patient 1 showed signals of equal intensity, which could indicate some kind of healing or regaining of the centromeric alpha satellite arrays on the deleted chromosome. This and the absence of any new constriction on the deleted chromosome suggests that in this case the amount of the alpha satellite material retained on the deleted chromosome was sufficient to support the centromere function. This contrasted with a recently published similar event on chromosome 8 which, however, resulted in neocentromere formation [Burnside et al., 2011].

The distal deletion breakpoint in patient 1 likely involved a dense cluster of dispersed repeats rich in transposable sequences which precluded the cloning of the deletion junction. Interestingly, LINEs and SINEs are known to be present at increased frequency in the arrays of the centromeric alpha satellite repeats [Ugarkovic, 2009], and thus non-allelic homologous recombination may have played a role in the formation of this aberration [Lupski and Stankiewicz, 2005]. On the contrary, the absence of homology and different repeat content in the vicinity of the deletion breakpoints in patient 2 argued against non-allelic homologous recombination as the mechanism causing the aberration. The presence of 7 newly added bases at the deletion junction could be a signature of non-template directed repair associated with non-homologous end joining [Lupski and Stankiewicz, 2005].

The deletions in our 2 patients did not overlap and subdivided the proximal 6q region into 2 parts of almost equal length (fig. 4). The phenotypic abnormalities in our patients were of remarkably different severity. While the phenotype of patient 1 was relatively mild compared to the previously published cases and patient 2, the phenotype of patient 2 was more severe than that of other patients with proximal 6q deletions. Major anomalies were more often described in patients with middle or distal 6q deletions [Hopkin et al., 1997]. As the boundary between the proximal and middle 6q deletions was not exactly defined [Hopkin et al., 1997], the deletion in patient 2 might overlap with the region of the middle deletions.

The deletion of the distal part of proximal 6q in patient 2 may had more severe consequences due to the higher gene density in this region. Although the deletions in patients 1 and 2 were of similar size, the number of genes

deleted in patient 2 was almost a double of that in patient 1. Both deletions were too large and with too many genes to allow assigning of individual symptoms to specific genes. Neither of our patients showed symptoms of recessive disorders caused by genes located in the region (*EYS*, *LMBRD1*, and *SLC17A5* in patient 1, and *LCA5*, *BCKDHB*, *SLC35A1*, and *RARS2* in patient 2) indicating lack of mutations on the remaining alleles of these genes. Interestingly, at the age when they were last examined, the patients also did not show any recognizable symptoms of dominant disorders mapping to the deletions: multiple epiphyseal dysplasia type 6 (*COL9A1*) [Czarny-Ratajczak et al., 2001], cone-rod dystrophy type 7 (*RIMS1*) [Johnson et al., 2003], and autosomal dominant nonsyndromic sensorineural hearing loss (*MYO6*) [Melchionda et al., 2001] in patient 1, and autosomal dominant atrophic macular degeneration (*ELOVL4*) [Bernstein et al., 2001; Zhang et al., 2001] in patient 2. The disorders can have a later onset, but other published deletion cases also showed no symptoms, indicating that these disorders may result from gain-of-deleterious-function mutations, although truncating mutations have also been described in at least some of them [Bernstein et al., 2001; Melchionda et al., 2001; Zhang et al., 2001]. Multiple genes in both deletions were good candidates for the developmental delay and mental retardation observed in both patients (e.g. *KHDRBS2*, *BAI3*, *B3GAT2*, *KCNQ5*, and *FILIP1* in patient 1, and *HTR1B*, *ORC3L*, *GABRR1*, *GABRR2*, and *EPHA7* in patient 2).

Some of the genotype-phenotype correlations were contradictory. A study of a small deletion involving only 2 genes suggested that the defect of *EPHA7* could negatively affect brain size and shape and lead to microcephaly. However, microcephaly was not observable in all patients with deletions overlapping the *EPHA7* locus [Traylor et al., 2009], and patient 2, who also has the *EPHA7* gene deleted, rather showed macrocephaly. This implies that some symptoms may be masked by the general population variability, and/or that the effect of some genes can be overridden by the effects of other loci deleted together with the specific gene.

Alignment of individual symptoms observed in our patients and other deletion carriers described in the literature indicated that hydronephrosis and other urinary tract defects might be enriched in patients with deletions overlapping middle 6q13, and similarly other symptoms could be assigned to deletions of other subregions (joint laxity and umbilical hernia to 6q14.1, cleft palate to 6q15, and various eye problems to 6q16.1). Similarly, while macrostomia was prevailing in patients with deletions of

the proximal part of the region studied, microstomia was characteristic for the distal part; and the same applied to upslanting and downslanting palpebral fissures. No obvious candidate genes for these phenotypes could be identified in these regions. Obesity could be characteristic for defects in the *SIM1* gene in the Prader-Willi-like candidate region of 6q16 [Bonaglia et al., 2008], which is distal to the region deleted in our patient 2. However, careful alignment of the published phenotypes also showed that the patients often clustered according to the author of the report rather than the chromosome region deleted, further stressing the importance of standardized phenotyping.

It can be expected that the widespread use of microarray and next-generation sequencing technologies will lead to the identification of small aberrations in patients with less complex phenotypes, which will be more informative for the correlation of individual symptoms with specific genes in the proximal 6q region.

### Acknowledgements

Supported by grants MZOFNM2005, MZOVFN2005, and CHERISH (EC FP7 223692). The study makes use of data generated by the DECIPHER Consortium (<http://decipher.sanger.ac.uk>) funded by the Wellcome Trust.

### References

- Baldwin EL, May LF, Justice AN, Martin CL, Ledbetter DH: Mechanisms and consequences of small supernumerary marker chromosomes: from Barbara McClintock to modern genetic-counseling issues. *Am J Hum Genet* 82:398–410 (2008).
- Bernstein PS, Tammur J, Singh N, Hutchinson A, Dixon M, et al: Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the *ELOVL4* gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3331–3336 (2001).
- Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, et al: Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 16:1443–1449 (2008).
- Burnside RD, Ibrahim J, Flora C, Schwartz S, Tepperberg JH, et al: Interstitial deletion of proximal 8q including part of the centromere from unbalanced segregation of a paternal deletion/marker karyotype with neocentromere formation at 8p22. *Cytogenet Genome Res* 132:227–232 (2011).
- Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozłowski K, Perala M, et al: A mutation in *COL9A1* causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity. *Am J Hum Genet* 69:969–980 (2001).
- Derwinska K, Bernaciak J, Wisniowiecka-Kowalnik B, Obersztyn E, Bocian E, et al: Autistic features with speech delay in a girl with an approximately 1.5-Mb deletion in 6q16.1, including *GPR63* and *FUT9*. *Clin Genet* 75:199–202 (2009).
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, et al: DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 84:524–533 (2009).
- Hopkin RJ, Schorry E, Bofinger M, Milatovich A, Stern HJ, et al: New insights into the phenotypes of 6q deletions. *Am J Med Genet* 70:377–386 (1997).
- Johnson S, Halford S, Morris AG, Patel RJ, Wilkie SE, et al: Genomic organisation and alternative splicing of human *RIMI1*, a gene implicated in autosomal dominant cone-rod dystrophy (CORD7). *Genomics* 81:304–314 (2003).
- Klein OD, Cotter PD, Moore MW, Zanko A, Gilats M, et al: Interstitial deletions of chromosome 6q: genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. *Clin Genet* 71:260–266 (2007).
- Kosztolanyi G: Does ‘ring syndrome’ exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75:174–179 (1987).
- Le Caignec C, Swillen A, Van Asche E, Fryns JP, Vermeesch JR: Interstitial 6q deletion: clinical and array CGH characterisation of a new patient. *Eur J Med Genet* 48:339–345 (2005).
- Lespinasse J, Gimelli S, Bena F, Antonarakis SE, Ansermet F, et al: Characterization of an interstitial deletion 6q13-q14.1 in a female with mild mental retardation, language delay and minor dysmorphisms. *Eur J Med Genet* 52:49–52 (2009).
- Lupski JR, Stankiewicz P: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1:e49 (2005).
- Melchionda S, Ahituv N, Bisceglia L, Sobe T, Glaser F, et al: *MYO6*, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell’s waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 69:635–640 (2001).
- Spreiz A, Muller D, Zotter S, Albrecht U, Baumann M, et al: Phenotypic variability of a deletion and duplication 6q16.1–q21 due to a paternal balanced *ins(7;6)(p15;q16.1q21)*. *Am J Med Genet A* 152A:2762–2767 (2010).
- Traylor RN, Fan Z, Hudson B, Rosenfeld JA, Shaffer LG, et al: Microdeletion of 6q16.1 encompassing *EPHA7* in a child with mild neurological abnormalities and dysmorphic features: case report. *Mol Cytogenet* 2:17 (2009).
- Ugarkovic DI: Centromere-competent DNA: structure and evolution. *Prog Mol Subcell Biol* 48:53–76 (2009).
- Wang JC, Dang L, Lomax B, Turner L, Shago M, et al: Molecular breakpoint mapping of 6q11-q14 interstitial deletions in seven patients. *Am J Med Genet A* 149A:372–379 (2009).
- Woo KS, Kim JE, Kim KE, Kim MJ, Yoo JH, et al: A de novo proximal 6q deletion confirmed by array comparative genomic hybridization. *Korean J Lab Med* 30:84–88 (2010).
- Zhang K, Kniazeva M, Han M, Li W, Yu Z, et al: A 5-bp deletion in *ELOVL4* is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet* 27:89–93 (2001).

# Skin Lesions in a Boy With X-linked Lymphoproliferative Disorder: Comparison of 5 *SH2D1A* Deletion Cases

**AUTHORS:** Ester Mejstříková, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Aleš Janda, MD, PhD,<sup>a,c</sup> Ondřej Hrušák, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Hana Bučková, MD, PhD,<sup>d</sup> Markéta Vlčková, MD,<sup>e</sup> Miroslava Hančárová, MSc,<sup>e</sup> Tomáš Freiberg, MD, PhD,<sup>f</sup> Barbora Ravčuková, MSc,<sup>f</sup> Karel Veselý, MD, PhD,<sup>g</sup> Lenka Fajkusová, PhD,<sup>h</sup> Lenka Kopečková, PhD,<sup>h</sup> David Sumerauer, MD, PhD,<sup>a</sup> Edita Kabičková, MD,<sup>a</sup> Anna Šedivá, MD, PhD,<sup>i</sup> Jan Starý, MD, PhD,<sup>a</sup> and Zdeněk Sedláček, PhD<sup>e</sup>

Departments of <sup>a</sup>Pediatric Hematology and Oncology, <sup>b</sup>Biology and Medical Genetics, and <sup>c</sup>Immunology, and <sup>d</sup>Childhood Leukemia Investigation Prague (CLIP), Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; <sup>e</sup>Centre of Chronic Immunodeficiency (CCI), University Medical Centre Freiburg and University of Freiburg, Freiburg, Germany; <sup>f</sup>Dermatological Division, Department of Pediatrics, University Hospital Brno, Medical Faculty of Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>g</sup>Molecular Genetics Laboratory, Centre for Cardiovascular Surgery and Transplantation, and Department of Clinical Immunology and Allergology, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>h</sup>1st Institute of Pathological Anatomy, St. Anne's Hospital and Medical Faculty of Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>i</sup>Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, University Hospital Brno and Masaryk University, Brno, Czech Republic

## KEY WORDS

*SH2D1A*, *ODZ1*, SAP, teneurin, X-linked lymphoproliferative syndrome, aplastic anemia, lymphoma, dermatitis, psoriasis, dermatosclerosis, vesiculobullous skin disease

## ABBREVIATIONS

EB—epidermolysis bullosa  
EBV—Epstein-Barr virus  
FIM—fulminant infectious mononucleosis  
HLH—hemophagocytic lymphohistiocytosis  
NKT—natural killer T lymphocytes  
XLP—X-linked lymphoproliferative disorder

Drs Mejstříková and Janda contributed equally to this work.

[www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2011-0870](http://www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2011-0870)

doi:10.1542/peds.2011-0870

Address correspondence to Aleš Janda, MD, PhD, Centre of Chronic Immunodeficiency (CCI), University Medical Center Freiburg and University of Freiburg, Breisacher Str. 117, 79095 Freiburg, Germany. E-mail: ales.janda@uniklinik-freiburg.de

PEDIATRICS (ISSN Numbers: Print, 0031-4005; Online, 1098-4275).

Copyright © 2012 by the American Academy of Pediatrics

**FINANCIAL DISCLOSURE:** Dr Janda received an unrestricted fellowship grant from the European Society for Immunodeficiencies provided by Baxter; the other authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

## abstract



*SH2D1A* gene defects are the cause of X-linked lymphoproliferative disorder (XLP-1), a rare condition characterized by severe immune dysregulation. We present a patient lacking the typical symptoms of XLP-1, but experiencing a severe unusual skin condition encompassing features of dermatosclerosis and vesiculobullous skin disease. A maternal cousin of the patient was diagnosed with XLP-1 and found to carry a deletion of the *SH2D1A* gene. *SH2D1A* deletion was also identified in our patient, which offered a possible explanation for his skin symptoms. Subsequent analysis showed that the deletion in both cousins was identical and involved the whole *SH2D1A* gene and a part of the adjacent *ODZ1* gene. High phenotypic variability of XLP-1 observed in this family prompted us to analyze the genotype-phenotype correlation of 2 different-sized deletions involving *SH2D1A* and *ODZ1* in 5 patients from 2 families, and we report the clinical and laboratory data on these individuals. Our findings illustrate the wide clinical variability of XLP-1, both inter- and intrafamilial, which may complicate the diagnosis of this condition. The comparison of phenotypes of our patients argues against a strong involvement of the *ODZ1* gene in the skin disorder and other symptoms observed in our index patient. His hitherto not described severe skin condition extends the phenotypic range of XLP-1. *Pediatrics* 2012;129:523–528



The X-linked *SH2D1A* gene encodes SAP (Signaling Lymphocyte Activation Molecule [SLAM]-Associated Protein), a small adaptor protein. SAP interacts with SLAM family members and assists their tyrosine-phosphorylation signaling important in most lymphocyte subsets.<sup>1,2</sup> SAP also exerts proapoptotic function in the restimulation-induced death of activated lymphocytes.<sup>3</sup> Impairment of SAP affects T, natural killer, natural killer T lymphocyte (NKT), and indirectly also B cells, resulting in varied immune defects.<sup>4</sup> SAP deficiency typically manifests in childhood or early adolescence as a rare primary immunodeficiency, X-linked lymphoproliferative disease (XLP-1, Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #308240), affecting 1 to 3 per million boys.<sup>5,6</sup> The typical phenotype includes hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and/or fulminant infectious mononucleosis (FIM) and dysgammaglobulinemia (frequently progressing into hypogammaglobulinemia). Approximately 25% of XLP-1 patients have non-Hodgkin lymphoma.<sup>7</sup> Aplastic anemia, pulmonary lymphoid granulomatosis, colitis, necrotizing vasculitis, and chronic active gastritis are less common.<sup>7-9</sup> Recently, *BIRC4* was identified as another causal X-linked gene in a minority of patients (XLP-2, OMIM #300635). It encodes the inhibitor-of-apoptosis protein (XIAP), a caspase inhibitor.<sup>10</sup> Although SAP and XIAP have antagonistic functions in apoptosis, the phenotypes of XLP-1 and XLP-2 are strikingly similar. The minor differences include the lack of NKT cells and higher incidence of hemorrhagic colitis in XLP-1, and the absence of lymphoma in XLP-2.<sup>11,12</sup> Although Epstein-Barr virus (EBV) has always been assumed to play a decisive role in XLP, it is now clear that a significant proportion of patients are EBV negative at presentation, and some do not develop FIM despite the EBV infection.<sup>7,8,13</sup> XLP therefore represents a general immune dysregulation rather than a defect of the anti-EBV response.<sup>7</sup>

Recently, lymphoproliferation and FIM have also been ascribed to the deficiency of interleukin-2-inducible T-cell kinase<sup>14</sup> (autosomal EBV-associated lymphoproliferative syndrome 1, OMIM #613011).

We present a male with an atypical skin condition who was found to carry a deletion of the whole *SH2D1A* and a part of the adjacent *ODZ1* gene, and report clinical and laboratory data of 2 families with 5 affected males carrying similar deletions. Our findings emphasize the wide clinical variability of XLP-1, both inter- and intra-familial. The hitherto not described severe skin condition in our index patient extends the phenotypic range of XLP-1.

## PATIENT PRESENTATIONS

### Patient A1

Patient A1, a boy from family A, had an episode of transient unconsciousness at the age of 3 years. Focal epileptiform discharges were found on electroencephalogram and antiepileptic therapy was initiated. Apart from the initial attack, no clinical symptoms recurred, and the cranial computed tomography scan was normal. The antiepileptic therapy was discontinued at 13 years of age, and the patient remained free of central neurologic symptoms. He also had attention deficit hyperactivity disorder, dyslexia, dysgraphia, and retarded speech development in childhood. However, his cognitive and intellectual abilities, memory, and emotional responses were normal when tested at 26 years of age.

At the age of 8 years he developed atrophic skin and scaling on the dorsal parts of his hands and feet, accompanied by dyspigmentation on the extremities and trunk. The condition was classified as psoriasis. After histologic examination, it was redefined as scleroderma-like syndrome. The

idiosyncratic effects of antiepileptic drugs (carbamazepine, phenobarbital, and valproic acid) were suspected, but changing the medication had no effect on the skin eruptions. Two years after manifestation, the infliction progressed into tiny droplet-like depigmentation around joints with bullae at the acral parts of the extremities. The severity of the condition culminated at the age of 13 years. A form of dystrophic epidermolysis bullosa (EB) was considered, but laboratory investigations did not support this diagnosis (Supplemental Information). The patient was treated with topical medication and intermittently with systemic steroids. The skin infliction oscillated with gradual improvement and stabilization; however, with remarkable scarring of the subcutaneous tissue resulting in joint movement limitation (elbows, knees, hands) and severe mutilation of hands and feet (Fig 1). The bullous eruptions have not reappeared in adulthood. Repeated extensive investigation of the residual lesions at the age of 26 years (histology, immunofluorescence, electron microscopy, molecular genetics; Supplemental Information) yielded additional evidence against EB. Only nonspecific inflammation in the areas of previously present bullae was seen; no structural abnormalities and pathologic antibodies in situ or in serum were detected. Mucous membranes have never been involved. Muscular hypotrophy, nail atrophy, and carious dentition were also present, and electromyogram revealed a mild neurogenic lesion. The patient was EBV negative.

The diagnosis of XLP-1 and identification of a *SH2D1A* deletion (Supplemental Information) in patient A2, a maternal cousin of patient A1 (see below), prompted us to also test patient A1. His *SH2D1A* gene was deleted, which yielded a possible new explanation for his



**FIGURE 1**  
Current residual skin lesions of patient A1. Atrophic skin with hyperkeratotic scales on elbows and knees (A, B), as well as on acral parts of his extremities (C, D) (status at 26 years of age). Atypical pseudosyndactyly and finger contracture with nail atrophy on 1 of the hands (C).

symptoms. To assist the genotype-phenotype correlation, patient A1 was compared with four other patients from 2 families. Clinical and laboratory features of all patients are summarized in Table 1.

### Patient A2

Patient A2 presented at the age of 16 years with generalized cervical, axillary, and abdominal lymphadenopathy, tiredness, wasting, ascites, and rapidly progressing pleural effusions, with no night sweats or fever. The diagnosis of Burkitt-like lymphoma with  $t(8;14)(q24;q32)$  translocation was established. The patient was treated according to the Berlin-Frankfurt-Munich B-cell Non-Hodgkin Lymphoma (BFM B-NHL) 2004 protocol,<sup>15</sup> achieving full remission in 5 months. Three months later, after a viral infection, marked pancytopenia occurred. fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography excluded lymphoma relapse. Bone marrow trephine biopsy confirmed the diagnosis of severe aplastic anemia. The patient underwent an uncomplicated transplantation of granulocyte-colony stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells from his healthy 9/10 HLA-matched brother. Currently, 24 months after transplantation, he is alive and well, requiring no supportive therapy. Prompted by the uncommon association of lymphoma and severe aplastic anemia, *SH2D1A* testing revealed a deletion of all exons. Additional analysis showed that both patients A1 and A2 carried identical deletions of *SH2D1A* and a part of *ODZ1* (Fig 2).

### Patient A3

Retrospectively, another affected boy, patient A3, was identified in family A. This maternal uncle of patients A1 and A2 was born in 1961 and died of acute liver failure due to probable FIM at 5 years of age. No other details or materials were available.

### Patient B1

Patient B1, from family B unrelated to family A, developed bronchopneumonia, fluidothorax, and hepatosplenomegaly at the age of 4 years, resulting in a

multiorgan failure. Identification of activated histiocytes in ascitic fluid led to the diagnosis of malignant histiocytosis, and the patient was promptly treated with a combined chemotherapy. Bone marrow transplantation was recommended but not approved by his parents. Within a few months after chemotherapy, panhypogammaglobulinemia manifested. Since then he has required immunoglobulin replacement. Genetic analysis revealed a deletion of *SH2D1A* and a part of *ODZ1*, larger than that in family A (Fig 2).

### Patient B2

A younger brother of patient B1 succumbed to FIM and malignant histiocytosis at the age of 2 years. No other details or materials were available.

## DISCUSSION

Only a few reports exist on dermatological symptoms in XLP-1 patients. Skin lichenification, depigmentation, or psoriasis have been documented.<sup>7,16</sup> There are no reports on a severe bullous skin condition with scaling associated with XLP. We suppose that the lesions in patient A1 could be of autoimmune origin and associated with immune dysregulation related to his SAP deficiency.

No autoantibodies expected of a bullous condition could be detected, possibly because we could only thoroughly examine the patient years after the disease flare when the skin changes were residual. The bioptic material from the enhanced disease-activity phase was not available for reanalysis. The hypothetical temporary presence of autoantibodies could be explained by the disruption of B-lymphocyte homeostasis. Hypergammaglobulinemia gradually progressing to hypogammaglobulinemia is a known feature of XLP-1, and autoreactive B-cell clones may disappear in parallel with normal B cells.

**TABLE 1** Clinical and Laboratory Characteristics of the Patients

Characteristics	Patient				
	A1	A2	A3	B1	B2
Year of birth	1984	1991	1961	1988	1993
Age at presentation, y	8	16	5	4	2
HLH/FIM	No	no	Yes <sup>a</sup>	Yes <sup>a</sup>	Yes <sup>a</sup>
Lymphoma	No	Yes <sup>a</sup>	No	No	No
Aplastic anemia	No	Yes	No	No	No
Dysgammaglobulinemia	Yes	No	NA	Yes <sup>b</sup>	Yes
Other symptoms	Severe skin lesions, <sup>a</sup> extensive dental caries, 1 seizure, abnormal EEG, ADHD	Eufunctional goiter	NA	Extensive dental caries	Coombs positive anemia
B cells	↓ class-switched memory cells, ↑ transitional cells, normal marginal zone B cells	NA	NA	↓ class-switched memory cells, ↓ marginal zone B cells	NA
NKT	↓↓	NA	NA	↓↓	NA
EBV status	Negative <sup>c</sup>	Negative <sup>c</sup>	NA	Positive <sup>d</sup>	Positive <sup>e</sup>
Treatment	Antiepileptics, systemic steroids, skin treatment	Chemotherapy, HSCT	NA	Chemotherapy, IVIg	Antibiotics, supportive treatment
Age at last follow-up, y	26	19	5	22	2
Outcome	Alive, experiencing sequelae of severe skin lesions	Alive and well	Deceased	Alive	Deceased

↑, increased; ↓, decreased; ↓↓, strongly decreased; NA, not available or not done; ADHD, attention-deficit/hyperactivity disorder; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; Ig, immunoglobulin; PCR, polymerase chain reaction.

<sup>a</sup> Presenting symptoms.

<sup>b</sup> Progressing into hypogammaglobulinemia.

<sup>c</sup> Serology and PCR.

<sup>d</sup> Viral capsid antibody IgA, IgG, IgM positive, Epstein-Barr nuclear antigen IgG negative, EBV PCR not performed.

<sup>e</sup> Heterophilic antibodies positive.

Grosieux et al<sup>16</sup> described a patient with signs of XLP presenting with pityriasis lichenoides and polyneuropathy explained by progressive systemic vasculitis. Several other cases of systemic vasculitis in XLP have been reported (reviewed in ref 17). Repeated skin biopsies yielded no evidence of vasculitis in patient A1. In addition, the course of his disease differed from the reported cases where it was acute, with fast progression and fatal outcome despite immunosuppression therapy.

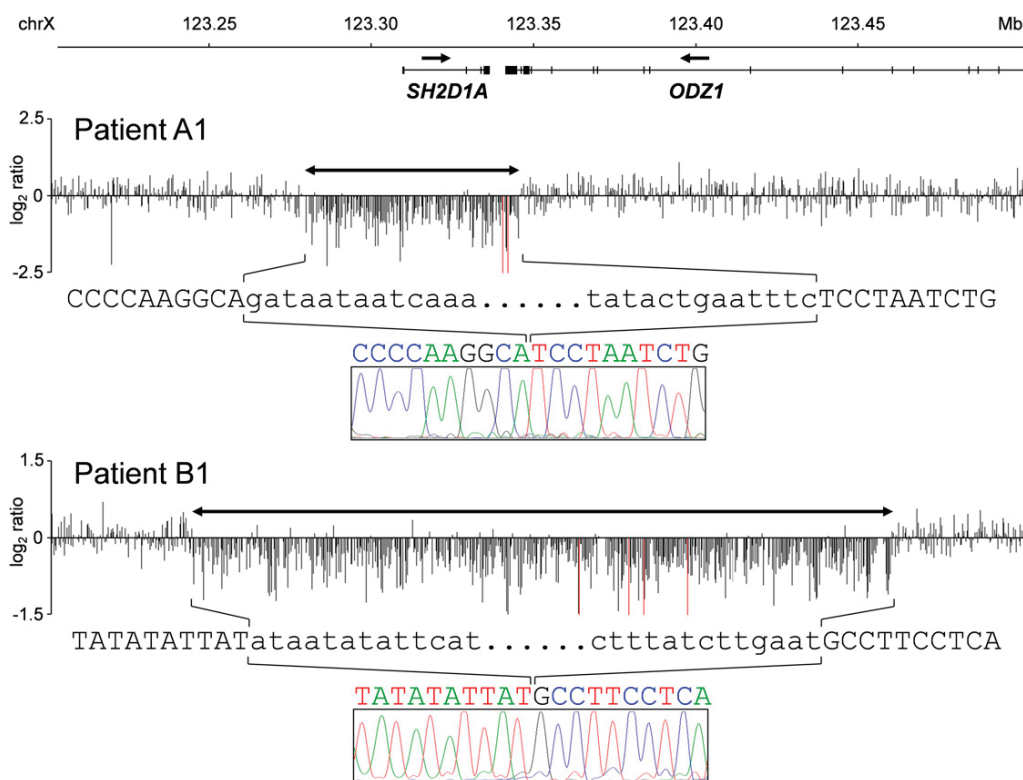
The picture of the skin condition, the absence of multiorgan involvement, and the long-term usage of antiepileptics before the occurrence of skin symptoms argue against anticonvulsant hypersensitivity syndrome.<sup>18</sup> However, we cannot exclude the impact of this therapy on the skin in a SAP-deficient environment. We also cannot fully exclude other concurrent genetic defects responsible for the skin defect, but our extensive analysis (Supplemental

Information) did not support this possibility, and we consider this scenario unlikely.

We also speculated that the additional symptoms in patient A1 could have been due to an expansion of the *SH2D1A* deletion during its transmission in family A, a phenomenon rarely described in other microdeletions.<sup>19</sup> This hypothesis was not confirmed; the deletions in both cousins were identical, involving only *SH2D1A* and *ODZ1*. The phenotypic impact of the *ODZ1* defect is unclear. *ODZ1* codes 1 of 4 teneurins, a family of transmembrane proteins with predominantly neural expression. Their exact function is unknown, but it may include cell adhesion, signaling, and gene regulation in neuronal development.<sup>20</sup> It is tempting to attribute the neurologic, learning, and behavioral deficits of patient A1 to the truncation of his *ODZ1* gene, but the absence of these symptoms in patient A2, who has the same deletion, and in patient B1, whose

*ODZ1* deletion is even larger, is at odds with this explanation. Our doubts on the effects of *ODZ1* deficiency are also supported by previous observations of no additional symptoms in several XLP-1 families with 3.5-Mb deletions that include *ODZ1*.<sup>5</sup>

The only curative option for patients with XLP-1 is an allogeneic transplantation of hematopoietic cells. However, the course of the disease is highly variable even in families with the same genetic defects, and a substantial number of long-term untransplanted survivors have been reported.<sup>7</sup> The patients who profit most from the transplantation are those presenting with HLH, FIM, or lymphoma.<sup>7</sup> This treatment option was not offered to our index patient, because his clinical situation was stable, and we were not convinced that the benefit of the transplantation would outweigh its risks. He is carefully monitored, and transplantation would be undertaken



**FIGURE 2**

Array CGH and sequence analysis of the SH2D1A and ODZ1 deletions. Regions of decreased array CGH signals mark the deletions (double arrows; red signals exceed the graph range). Deleted sequences are in lower case; sequences of the junctions are in color. The deletion in patient A1 (and A2) is smaller and fully contained in the deletion of patient B1. CGH, comparative genomic hybridization.

in case of disease progression and the onset of other manifestations.

We conclude that XLP-1 should be considered in males with classic presenting symptoms, but also in males with non-Hodgkin lymphoma associated with

severe aplastic anemia or skin lesions. A positive family history should prompt genetic testing, and once XLP-1 diagnosis is established, all males at risk should be monitored even when asymptomatic or presenting with atypical symptoms.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants IGA NS/9997-4, NS/10480-3, NS/10398-3, MSM0021620813, MZ0FN2005, and BMBF 01 EO 0803.

## REFERENCES

- Sayos J, Wu C, Morra M, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*. 1998;395(6701):462–469
- Bolino A, Yin L, Seri M, et al. A new candidate region for the positional cloning of the XLP gene. *Eur J Hum Genet*. 1998;6(5):509–517
- Snow AL, Marsh RA, Krummy SM, et al. Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2976–2989
- Nichols KE, Ma CS, Cannons JL, Schwartzberg PL, Tangye SG. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 2005;203:180–199
- Sumegi J, Huang DL, Lanyi A, et al. Correlation of mutations of the SH2D1A gene and Epstein-Barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood*. 2000;96(9):3118–3125
- Purtilo DT. X-linked lymphoproliferative disease (XLP) as a model of Epstein-Barr virus-induced immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*. 1991;13(2):181–197
- Booth C, Gilmour KC, Veys P, et al. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood*. 2011;117(1):53–62
- Brandau O, Schuster V, Weiss M, et al. Epstein-Barr virus-negative boys with non-Hodgkin lymphoma are mutated in the SH2D1A gene, as are patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP). *Hum Mol Genet*. 1999;8(13):2407–2413
- Rougemont AL, Fournet JC, Martin SR, et al. Chronic active gastritis in X-linked

- lymphoproliferative disease. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(2):323–328
10. Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature.* 2006;444(7115):110–114
  11. Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, Marsh RA. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood.* 2010;116(18):3398–3408
  12. Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood.* 2011;117(5):1522–1529
  13. Strahm B, Rittweiler K, Duffner U, et al. Recurrent B-cell non-Hodgkin's lymphoma in two brothers with X-linked lymphoproliferative disease without evidence for Epstein-Barr virus infection. *Br J Haematol.* 2000;108(2):377–382
  14. Huck K, Feyen O, Niehues T, et al. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1350–1358
  15. Reiter A. Diagnosis and treatment of childhood non-Hodgkin lymphoma. *Hematology(Am Soc Hematol Educ Program).* 2007;285–296
  16. Grosieux C, Amoric JC, Mechinaud F, et al. Cutaneous and neurologic vasculitis disclosing EBV-selective immunodeficiency [in French]. *Ann Dermatol Venereol.* 1996;123(6–7):387–392
  17. Talaat KR, Rothman JA, Cohen JI, et al. Lymphocytic vasculitis involving the central nervous system occurs in patients with X-linked lymphoproliferative disease in the absence of Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(6):1120–1123
  18. Mansur AT, Pekcan Yasar S, Göktay F. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: clinical and laboratory features. *Int J Dermatol.* 2008;47(11):1184–1189
  19. South ST, Rope AF, Lamb AN, et al. Expansion in size of a terminal deletion: a paradigm shift for parental follow-up studies. *J Med Genet.* 2008;45(6):391–395
  20. Tucker RP, Kenzelmann D, Trzebiatowska A, Chiquet-Ehrismann R. Teneurins: transmembrane proteins with fundamental roles in development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(2):292–297



**A Patient with de novo 0.45 Mb Deletion of 2p16.1: The Role  
of BCL11A, PAPOLG, REL and FLJ16341 in 2p15-p16.1  
Microdeletion Syndrome**

Journal:	<i>American Journal of Medical Genetics: Part A</i>
Manuscript ID:	12-0206.R4
Wiley - Manuscript type:	Clinical Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hancarova, Miroslava; Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Department of Biology and Medical Genetics Simandlova, Martina; Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Department of Biology and Medical Genetics Drabova, Jana; Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Department of Biology and Medical Genetics Mannik, Katrin; University of Tartu, Institute of Molecular and Cell Biology Kurg, Ants; University of Tartu, Institute of Molecular and Cell Biology Sedlacek, Zdenek; Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Department of Biology and Medical Genetics
Keywords:	2p15-p16.1 microdeletion syndrome, autism, copy number variation, developmental delay, intellectual disability, SNP array
Search Terms:	

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Dear Dr. Sedlacek:

I am happy to inform you that your paper

A Patient with de novo 0.45 Mb Deletion of 2p16.1: The Role of BCL11A, PAPOLG, REL and FLJ16341 in 2p15-p16.1 Microdeletion Syndrome

has been accepted for publication in the *American Journal of Medical Genetics*.

The accepted manuscript will be sent to the publisher, John Wiley & Sons, Inc. Your Production Editor should be:

Mr. Christopher Sannella  
STM Journal Production  
John Wiley & Sons, Inc.  
111 River Street  
Hoboken, NJ 07030  
email: [csannell@wiley.com](mailto:csannell@wiley.com)

It is necessary to reference your manuscript designation number (or the complete title) if you need to contact production for any reason.

Please note, if the authors have not returned the signed Copyright Transfer Agreement to the editorial offices, they will be requested to do so by the Publisher prior to publication of the manuscript. You can access the copyright transfer agreement at [www.wiley.com/go/ctaaus](http://www.wiley.com/go/ctaaus).

Please also note that the manuscript was copy edited by the Acting Editor for compliance with Journal style. It is the author's responsibility to insure that no errors were introduced.

The work will publish first online through Wiley's Early View feature (cited with a recognized digital object identifier, DOI). Subsequently it will publish in the print version on a space available basis.

Thank you for the opportunity to publish your work.

Sincerely,

John C. Carey, MD  
Editor-in-Chief  
American Journal of Medical Genetics

## Clinical Report

### **A Patient with *de novo* 0.45 Mb Deletion of 2p16.1: The Role of *BCL11A*, *PAPOLG*, *REL*, and *FLJ16341* in the 2p15-p16.1 Microdeletion Syndrome**

Miroslava Hancarova <sup>1</sup>, Martina Simandlova <sup>1</sup>, Jana Drabova <sup>1</sup>, Katrin Mannik <sup>2</sup>, Ants Kurg <sup>2</sup>  
and Zdenek Sedlacek <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Tartu, Estonia

Running title: Narrowing down the 2p15-p16.1 microdeletion

Corresponding author:

Zdenek Sedlacek, Department of Biology and Medical Genetics,

Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol,

Plzenska 130/221, 15000 Prague 5, Czech Republic.

Tel.: +420 257296153; fax: +420 224433520;

e-mail: [zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz](mailto:zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz)



**ABSTRACT**

The 2p15-p16.1 microdeletion syndrome is a novel, rare disorder characterized by developmental delay, intellectual disability, microcephaly, growth retardation, facial abnormalities, and other medical problems. We report here an 11-year-old female showing clinical features consistent with the syndrome and carrying a *de novo* 0.45 Mb long deletion of the paternally derived 2p16.1 allele. The deleted region contains only three protein-coding RefSeq genes, *BCLA11*, *PAPOLG*, and *REL*, and one long non-coding RNA gene *FLJ16341*. Based on close phenotypic similarities with six reported patients showing typical clinical features of the syndrome, we propose that the critical region can be narrowed down further, and that these brain expressed genes can be considered candidates for the features seen in this microdeletion syndrome.

**Key words**

2p15-p16.1 microdeletion syndrome; autism; copy number variation; developmental delay; intellectual disability; SNP array

## INTRODUCTION

The widespread use of microarrays has contributed to the identification of several new rare microdeletion syndromes including the deletions of 2p15-p16.1 [Rajcan-Separovic et al., 2007]. Since the first description of two unrelated patients with intellectual disability, autism, microcephaly, short stature, and various dysmorphic facial features who carried *de novo* 2p15-p16.1 deletions of 6.1 and 7.9 Mb [Rajcan-Separovic et al., 2007; Liu et al., 2011], five additional patients with overlapping deletions have been reported [de Leeuw et al., 2008; Chabchoub et al., 2008; Liang et al., 2009; Felix et al., 2010; Prontera et al., 2011]. Although all patients shared similar symptoms, differences were also noted, likely attributable to differences in the extent and gene contents of the deleted regions.

We report a patient with a deletion in this region, and we looked at the genotype-phenotype correlation of all patients published so far. The small size (0.45 Mb) of the deletion in the patient reported here can narrow down the critical region and point to interesting candidate genes that may contribute to the symptoms of the syndrome.

## CLINICAL REPORT

The patient, a currently 11-year-old female, was referred to a geneticist because of delayed psychomotor development. She was born to healthy non-consanguineous Caucasian parents. The pregnancy was uneventful and the birth parameters were within normal limits (weight 3,350 g, length 51 cm, head circumference 34 cm). Feeding problems were observed soon after birth and psychomotor delay was noted at 6 months of age. The growth parameters had dropped to the 3<sup>rd</sup> centile by 12 months of age and have remained low ever since. The patient was able to sit at 8 and walk at 18 months of age. Speech development was characterized by delayed receptive and expressive skills. At the age of 9 years her height was 126 cm, weight 22.5 kg and head circumference 48 cm (all below the 3<sup>rd</sup> centile). Her facial features were dysmorphic

(Fig. 1) and included facial asymmetry, mild ptosis, telecanthus, epicanthal folds, downslanting palpebral fissures, strabismus, hypermetropia, long and straight eyelashes, long and thin eyebrows, high palate, smooth and long philtrum, smooth upper vermilion border, everted lower lip, broad nasal root, prominent nasal tip, and small low set ears with enlarged cauda of the helix. She also showed wide internipple distance, pes planovalgus, and hypotonia. Her intelligence quotient score was 44 and she showed autistic features (lack of interest in social contacts and inadequate reactions to social stimuli, inadequate emotional reactions, stereotyped behavior, mimicking and repeating sounds, interest in communication with animals, hypochondria). At a follow-up examination at 11 years of age, her microcephaly, growth retardation and facial dysmorphism were even more pronounced, as was her autistic behavior, with persisting feeding problems. Magnetic resonance imaging did not show any brain abnormalities, but electroencephalography showed diffuse abnormal activity. The clinical features of this patient and previously published patients are summarized in Table I.

## METHODS

Blood samples were obtained from the patient and her parents after proper informed consent. The study was approved by our local ethics committee. Karyotyping, genetic testing for the fragile X syndrome and mutational analysis of the *MECP2* gene were performed according to standard protocols. The DNA of the patient was then analyzed using the Human CytoSNP-12 BeadChips (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Data analysis was performed using Genome Studio (Illumina) and QuantiSNP [Colella et al., 2007]. The proximal breakpoint of the deletion was fine mapped using MLPA [Schouten et al., 2002] as described in the Supplemental Methods (see Supporting Information online). The deletion was confirmed using FISH with BAC clone RP11-416L21 (BlueGnome, Cambridge, UK). The

inheritance and the parental origin of the deletion were determined using the same probe and subsequently by testing parents on the same array.

## RESULTS

The cytogenetic analysis of the patient showed normal female karyotype and gene testing excluded fragile X and Rett syndromes. The SNP array analysis identified a 0.45 Mb long deletion in 2p16.1, with the outermost deleted SNPs located at bases 60,543,481 and 60,981,483 (NCBI36/hg18) (Supplemental Fig. S1 - see Supporting Information online). On the proximal side, the deletion was flanked by a large run of homozygosity and this breakpoint was therefore fine mapped using custom multiplex ligation probe analysis (MLPA). Runs of homozygosity in this region were observed also in several other Czech individuals (data not shown). The MLPA analysis confirmed the position of the deletion breakpoint and showed that the *PUS10* gene was present in the patient in two copies (Supplemental Fig. S2 - see Supporting Information online). The FISH analyses confirmed the deletion in the patient but not in either of her parents (Supplemental Fig. S3 - see Supporting Information online). The SNP array analysis of the parents confirmed the *de novo* nature of the deletion and showed the absence of paternally derived SNP alleles in the patient's deleted interval, indicating that the deletion affected the paternal chromosome 2. The deleted region contained three protein-coding RefSeq genes (*BCL11A*, *PAPOLG*, and *REL*) and one long non-coding RNA gene (*FLJ16341*) (Fig. 2).

## DISCUSSION

The present case is the eighth reported patient with a deletion of the region associated with the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome [Rajcan-Separovic et al., 2007; de Leeuw et al., 2008; Chabchoub et al., 2008; Liang et al., 2009; Felix et al., 2010; Liu et al., 2011; Prontera et al., 2011]. The comparison of all patients including the present patient shows that the phenotype

of the syndrome is characterized by: growth retardation, moderate to severe intellectual disability, autistic behavior, microcephaly, vision impairment, short stature and characteristic facial dysmorphisms (Table I). Similarly to other microdeletion syndromes, the phenotype is variable, possibly reflecting the variable size and gene content of the deletions, variability in the expression of the remaining alleles and the influence of the genetic background of the rest of the genome. These genetic and other factors could have additional and/or modifying effects, especially on the minor clinical signs.

The 0.45 Mb long deletion in our patient is fully contained within the deletion overlap of five previously reported patients and the core 2.1 Mb region proposed to be causative for the syndrome [Liang et al., 2009], but it maps between the deletions of the two remaining patients [Chabchoub et al., 2008; Prontera et al., 2011] (Fig. 2). One of the latter patients has a phenotype similar to the other patients including the patient reported here (Table I), but her deletion is more telomeric (Fig. 2), affecting only the *VRK2* and *FANCL* genes. This patient also carries an additional *de novo* inversion and translocation [Prontera et al., 2011]. The second patient [Chabchoub et al., 2008], whose non-overlapping deletion is more centromeric (Fig. 2), is missing many symptoms including growth retardation and microcephaly (Table I), and is definitely the most divergent from the rest of the series, as already noticed by others [Liang et al., 2009; Prontera et al., 2011].

Given the molecular and phenotypic overlap with five other patients, we propose that the four genes deleted in the present patient could play an important role in the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome. The proximity of the flanking deletions could possibly also affect the expression of these genes via position effect. Interestingly, the deletions, where analyzed, always affected the paternal chromosome [Liang et al., 2009; Felix et al., 2010].

Among the genes affected there are three protein-coding genes, B-cell CLL/lymphoma 11A (*BCL11A*), poly(A) polymerase  $\gamma$  (*PAPOLG*) and v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene

homolog (*REL*), and one long non-coding RNA gene (*FLJ16341*). These genes are interesting candidates for the features of the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome. The zinc finger protein gene *BCL11A*, studied predominantly in hematopoiesis, is expressed in fetal brain [Satterwhite et al., 2001]. Recent research suggests that this gene controls neuronal morphology in mouse by regulating axon branching and dendrite outgrowth [Kuo et al., 2009]. Even more importantly, its product interacts with the product of *CASK*, a known X-linked intellectual disability gene [Kuo et al., 2010]. The *PAPOLG* gene is responsible for post-transcriptional 3' adenylation of mRNA precursors and small RNAs [Kyriakopoulou et al., 2001]. The gene is expressed in several areas of brain [Lein et al., 2007], and RNA processing is among the basic cellular processes frequently involved in intellectual disability [Najmabadi et al., 2011]. The *REL* gene encodes a ubiquitous transcription factor from the NF- $\kappa$ B family [Ballard et al., 1990] involved in synaptic plasticity and memory formation [Ahn et al., 2008]. The *FLJ16341* gene encodes a spliced 1.7 kb long non-coding transcript identified in several tissues including neuronal precursor cells and retina [Bonaldo et al., 1996; Kimura et al., 2006], the function of which however remains unknown.

The possible phenotypic impact of reduced dosage of this region is also supported by remarkable clustering of large deletions in patients from the DECIPHER database [Firth et al., 2009] or from large studies of developmental delay (DD) [Cooper et al., 2011; Kaminsky et al., 2011], while only small deletions were identified in normal individuals according to the Database of Genomic Variants (DGV) [Zhang et al., 2006] (Fig. 2). Large duplications of this region are less frequent. The DGV lists just one 3 Mb duplication identified in two studies of 270 HapMap individuals [Redon et al., 2006; Pinto et al., 2007]. Seven duplications of varying size overlapping this region have been reported in individuals with DD and other phenotypes [Firth et al., 2009; Cooper et al., 2011; Kaminsky et al., 2011], and the existence of a mirror 2p15-p16.1 microduplication syndrome cannot be ruled out. The copy number polymorphism and presence of segmental duplications and rearrangements in malignancies [Satterwhite et al., 2001] indicate

the instability of this region. The genotype-phenotype correlation in deletion carriers is complicated by phenotypic variability, absence of recurrent breakpoints and variable length of the deletions, some of which do not overlap and/or extend to the region of another recently described microdeletion syndrome, that of 2p14 [Wohlleber et al., 2011] (Fig. 2). During the submission of this article two additional patients have been described with *de novo* deletions of 2p16.1 and phenotypes similar to other reported cases [Piccione et al., 2012]. The carrier of the shorter deletion (642 kb) lacked one copy of *BCL11A*, *PAPOLG*, *REL*, *PUS10*, and *PEX13*. The analysis of the patient reported here is valuable because of her small deletion and phenotypic similarity with the typical clinical picture of the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome. The definitive implication of any of the proposed genes or any nearby genes alone or in combination will require the identification of additional patients with structural or nucleotide variants in this region, or functional studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the family of the patient for cooperation and the reviewers for helpful comments. Supported by European Commission grant CHERISH 223692, COST action BM1004 and LD11028, Czech research development grant 00064203, and grant SF0180027s10 from the Estonian Ministry of Education and Research.

## REFERENCES

- Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD. 2008. c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learn Mem* 15:539-549.
- Ballard DW, Walker WH, Doerre S, Sista P, Molitor JA, Dixon EP, Peffer NJ, Hannink M, Greene WC. 1990. The v-rel oncogene encodes a kappa B enhancer binding protein that inhibits NF-kappa B function. *Cell* 63:803-814.
- Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB. 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res* 6:791-806.
- Chabchoub E, Vermeesch JR, de Ravel T., de Cock P., Fryns JP. 2008. The facial dysmorphism in the newly recognised microdeletion 2p15-p16.1 refined to a 570 kb region in 2p15. *J Med Genet* 45:189-192.
- Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, Bassett AS, Seller A, Holmes CC, Ragoussis J. 2007. QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res* 35:2013-2025.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 43:838-846.
- de Leeuw N, Pfundt R, Koolen DA, Neefs I, Scheltinga I, Mieloo H, Sistermans EA, Nillesen W, Smeets DF, de Vries BB, Knoers NV. 2008. A newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15p16.1: narrowing down the critical region by adding another patient detected by genome wide tiling path array comparative genomic hybridisation analysis. *J Med Genet* 45:122-124.
- Felix TM, Petrin AL, Sanseverino MT, Murray JC. 2010. Further characterization of microdeletion syndrome involving 2p15-p16.1. *Am J Med Genet A* 152A:2604-2608.
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van VS, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 84:524-533.
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST, Richard G, Compton JG, Fuller AE, Gliem TJ, Huang S, Collinson MN, Beal SJ, Ackley T, Pickering DL, Golden DM, Aston E, Whitby H, Shetty S, Rossi MR, Rudd MK, South ST, Brothman AR, Sanger WG, Iyer RK, Crolla JA, Thorland EC, Aradhya S, Ledbetter DH, Martin CL. 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med* 13:777-784.
- Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, Ishii S, Sugiyama T, Saito K, Isono Y, Irie R, Kushida N, Yoneyama T, Otsuka R, Kanda K, Yokoi T, Kondo H, Wagatsuma M, Murakawa K, Ishida S, Ishibashi T, Takahashi-Fujii A, Tanase T, Nagai K, Kikuchi H, Nakai K, Isogai T, Sugano S. 2006. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 16:55-65.



- Kuo TY, Hong CJ, Chien HL, Hsueh YP. 2010. X-linked mental retardation gene CASK interacts with Bcl11A/CTIP1 and regulates axon branching and outgrowth. *J Neurosci Res* 88:2364-2373.
- Kuo TY, Hong CJ, Hsueh YP. 2009. Bcl11A/CTIP1 regulates expression of DCC and MAP1b in control of axon branching and dendrite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 42:195-207.
- Kyriakopoulou CB, Nordvang H, Virtanen A. 2001. A novel nuclear human poly(A) polymerase (PAP), PAP gamma. *J Biol Chem* 276:33504-33511.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbear TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sotd AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168-176.
- Liang JS, Shimojima K, Ohno K, Sugiura C, Une Y, Ohno K, Yamamoto T. 2009. A newly recognised microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behaviour, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2 Mb deletion. *J Med Genet* 46:645-647.
- Liu X, Malenfant P, Reesor C, Lee A, Hudson ML, Harvard C, Qiao Y, Persico AM, Cohen IL, Chudley AE, Forster-Gibson C, Rajcan-Separovic E, Lewis ME, Holden JJ. 2011. 2p15-p16.1 microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* 19:1264-1270.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Puttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wiczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478:57-63.
- Piccione M, Piro E, Serraino F, Cavani S, Ciccone R, Malacarne M, Pierluigi M, Vitaloni M, Zuffardi O, Corsello G. 2012. Interstitial deletion of chromosome 2p15-16.1: report of two patients and critical review of current genotype-phenotype correlation. *Eur J Med Genet* 55:238-244.
- Pinto D, Marshall C, Feuk L, Scherer SW. 2007. Copy-number variation in control population cohorts. *Hum Mol Genet* 16 :168-173.

- Prontera P, Bernardini L, Stangoni G, Capalbo A, Rogaia D, Romani R, Ardisia C, Dallapiccola B, Donti E. 2011. Deletion 2p15-16.1 syndrome: case report and review. *Am J Med Genet A* 155A:2473-2478.
- Rajcan-Separovic E, Harvard C, Liu X, McGillivray B, Hall JG, Qiao Y, Hurlburt J, Hildebrand J, Mickelson EC, Holden JJ, Lewis ME. 2007. Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. *J Med Genet* 44:269-276.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444-454.
- Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price HP, Gesk S, Steinemann D, Schlegelberger B, Oscier DG, Siebert R, Tucker PW, Dyer MJ. 2001. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98:3413-3420.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.
- Wohlleber E, Kirchhoff M, Zink AM, Kreiss-Nachtsheim M, Kuchler A, Jepsen B, Kjaergaard S, Engels H. 2011. Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. *Eur J Med Genet* 54:67-72.
- Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. 2006. Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenet Genome Res* 115:205-214.

TABLE I. Comparison of clinical features of patients with the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome

	Rajcan-Separovic 2007		De Leeuw et al. 2008	Chabchoub et al. 2008	Liang et al. 2009	Felix et al. 2010	Prontera et al. 2011	Present patient
	Subject 1	Subject 2						
<b>Deletion size</b>	6.1 Mb	7.9 Mb	3.9 Mb	570 kb	3.2 Mb	3.35 Mb	3.5 Mb	0.45 Mb
<b>General</b>								
Gender	Female	Male	Male	Male	Female	Female	Female	Female
Age at assessment (years)	8	6	32	16	4.5	4	9	11
Intrauterine growth retardation	+	-	-	NM	+	+	+	-
Postnatal growth retardation	-	+	+	-	+	+	+	+
Moderate intellectual disability	+	+	+	+	+	+	+	+
Feeding problems	+	+	+	NM	-	+	+	+
Short stature	-	+	+	-	+	+	+	+
Microcephaly	+	+	+	-	+	+	+	+
Height (centile)	75-90%	< 3%	< 3%	97%	< 3-5%	< 10%	< 3%	< 3%
Weight (centile)	75-90%	5-10%	NM	< < 3%	25-50%	< 10%	< 3%	< 3%
Head circumference (centile)	< < 2%	< < 2%	< 3%	75-90%	< 3-5%	< 10%	3-10%	< 3%
<b>Facial features</b>								
Bitemporal narrowing	+	+	+	NM	-	NM	+	-
Short forehead	+	+	+	-	-	+	-	-
Strabismus	+	-	+	NM	-	-	-	+
Ptosis	+	+	+	-	+	+	+	+
Telecanthus	+	+	+	+	+	+	+	+
Short palpebral fissures	+	+	+	NM	+	+	+	+
Downslanting palpebral fissures	+	+	+	+	-	NM	-	+
Epicanthal folds	-	+	+	NM	+	NM	+	+
Broad nasal root	+	+	+	+	+	+	+	+
High nasal root	+	+	NM	+	-	+	+	-
Prominent nasal tip	+	+	-	+	-	NM	+	+
Long, straight eyelashes	+	+	+	NM	-	+	-	+
Long, thin eyebrows	-	+	-	NM	-	NM	-	+
Large ears	+	+	-	+	-	+	+	-
Smooth and long philtrum	+	+	+	NM	+	+	+	+
Smooth upper vermillion border	+	+	+	+	-	NM	+	+
Everted lower lip	+	+	+	+	-	NM	+	+
High palate	+	+	+	+	-	+	+	+
Retrognathia	-	+	+	-	+	-	-	-
<b>Other physical features</b>								
Widened inter nipple distance	+	+	+	-	-	+	+	+
Extra nipple	-	+	-	NM	-	NM	-	-
Camptodactyly digit(s)	+	+	-	-	-	+	-	-
Metatarsus abductus	+	+	-	-	+	+	-	+
Spasticity legs	+	+	-	-	+	NM	+	+
<b>Other</b>								
Optic nerve hypoplasia	+	+	+	NM	+	-	-	-
Vision impairment	-	+	+	NM	NM	+	+	+
Hearing loss	-	+	-	NM	-	NM	-	-
Frequent respiratory infections	+	+	+	NM	-	-	-	-
Delayed language skills	+	+	+	+	+	+	+	+
Autistic behavior	+	+	-	-	+	-	-	+
Attention deficit behavior	+	+	-	-	+	NM	+	-
Urogenital abnormalities	+	+	+	+	-	-	-	-
Cardiac anomalies	NM	NM	NM	+	-	-	NM	-
Abnormal EEG	-	+	NM	NM	-	+	NM	+
Normal neuroimaging	-	-	NM	+	+	+	+	+
Cortical dysplasia	+	+	NM	-	-	-	NM	-
Structural brain abnormalities	+	+	NM	-	-	-	-	-

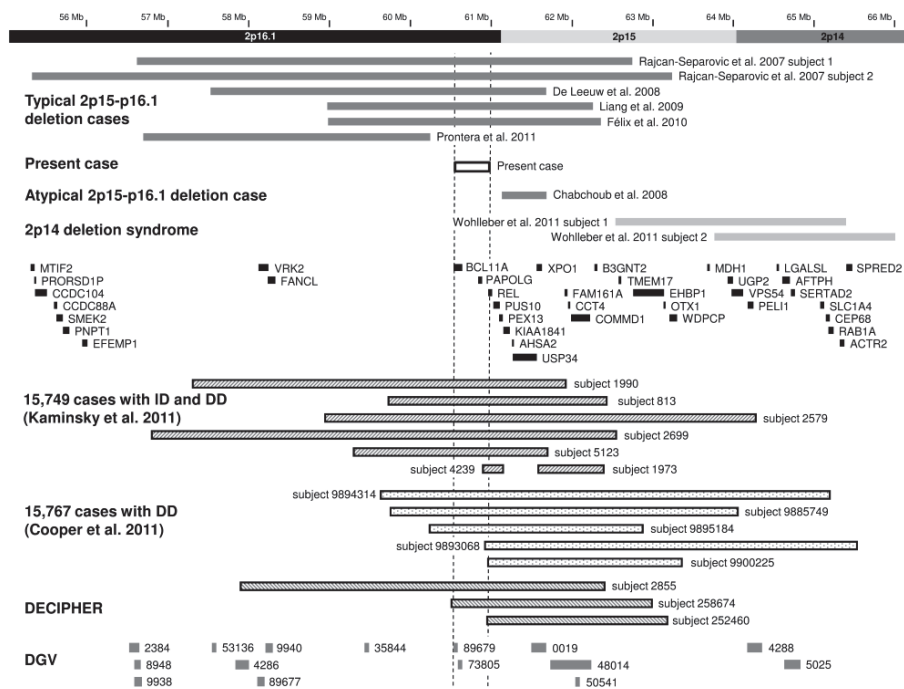
+, feature present; -, feature absent; NM, not mentioned; gray background, the phenotypically most divergent patient

**FIGURE LEGENDS**

FIG. 1: Facial photographs of the patient at 9 years of age showing facial asymmetry, mild ptosis, telecanthus, epicanthal folds (especially on the left eye), downslanting palpebral fissures, strabismus, smooth and long philtrum, everted lower lip, low set small and posteriorly rotated ears, and receding forehead.



FIG. 2: Schematic representation of the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome region, its protein-coding gene content and the deletions reported. Bars indicate deletions in patients from different studies and cohorts. Vertical dashed lines indicate the region deleted in the patient reported here. The *FLJ16341* gene is located right upstream of *REL*. Only DGV deletions larger than 25 kb are shown.



Elsevier Editorial System(tm) for European Journal of Medical Genetics  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Chromosome 12q13.13 deletions involving the HOXC gene cluster: phenotype and candidate genes

Article Type: Letter to the Editor

Keywords: Letter to the Editor - no keywords

Corresponding Author: Prof. Zdenek Sedlacek,

Corresponding Author's Institution: Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol

First Author: Miroslava Hancarova

Order of Authors: Miroslava Hancarova; Martina Simandlova; Jana Drabova; Monika Koudova; Marketa Havlovicova; Zdenek Sedlacek

Abstract: Letter to the Editor - no abstract

Letter to the Editor

Chromosome 12q13.13 deletions involving the *HOXC* gene cluster: phenotype and candidate genes

Miroslava Hancarova, Martina Simandlova, Jana Drabova, Monika Koudova, Marketa Havlovicova, Zdenek Sedlacek \*

Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Plzenska 130/221, 15000 Prague 5, Czech Republic

\* Corresponding author:

Tel.: +420 257296153; fax: +420 224433520;

E-mail address: [zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz](mailto:zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz) (Z. Sedlacek)

Running title: *HOXC* gene cluster deletions

We noted with interest the report by Jonsson et al. [1] in the June-July 2012 issue of the European Journal of Medical Genetics describing a patient with a *de novo* 1.1 Mb long microdeletion of 12q13.13 removing 33 protein-coding genes including the whole *HOXC* gene cluster. This patient and a patient described independently by Okamoto et al. [2], who has a longer, 1.7 Mb deletion of this region, represent the first cases of a human phenotype associated with hemizygous loss of *HOXC* and neighboring genes. They may represent a previously unknown microdeletion syndrome characterized by psychomotor retardation and skeletal abnormalities. Haploinsufficiency of the *HOXC* cluster was proposed to be responsible for the phenotype in both cases [1, 2].

Using SNP arrays (Human CytoSNP-12 BeadChips, Illumina) we have recently identified a male Czech patient with a *de novo* 12q13.13 microdeletion of 0.9 Mb (chr12:51,801,299-52,737,892, hg18) affecting 20 genes including the whole *HOXC* cluster (Fig. 1). Our patient was born at term with a weight of 3,770 g and length of 50 cm. The newborn had hypotonia, microcephaly, facial dysmorphism (wide nasal root, long philtrum, low set ears), short neck, cryptorchidism, congenital heart defects (ventricular septal defect, foramen ovale apertum, pulmonic stenosis), hypoplastic nails and abnormal palmar and plantar creases. Feeding problems resulted in failure to thrive, and now, at the age of 5 years, his weight is below the 3rd centile. He has a long, narrow face, hypotelorism, enophthalmus, mild hypermetropia, wide nose, fine hair, onychodystrophy, pedes plani and ulnar duction of both hands. The most remarkable is his disproportionate habitus with extremely long, narrow thorax and short lower limbs, and an atypical hand grip between index and middle fingers. He suffers from a mild intellectual disability. Ultrasound examination of the brain demonstrated a broader cisterna magna. The abdominal ultrasound examination was normal, as was the hearing test. The FISH analysis of the patient and his parents with BAC probe RP11-65C21 confirmed the *de novo* origin of the deletion in the boy.

The identification of our patient who has a deletion smaller than those carried by the two published cases could contribute to the definition of the phenotypic spectrum of this novel syndrome and the deciphering of its genetic background. The most typical features shared by all three patients are bone malformations, flexion contractures of hands and minimal flexion lines at distal interphalangeal joints [1, 2]. All patients have developmental delay, connective tissue insufficiency leading to hernias, valgus position of ankles or genua valga, and adducted thumbs of the hands. Other features possibly important for the syndrome, which are described only in two of the three cases, are congenital heart defects, pectus excavatum, kyphosis, scoliosis, poor speech, strabismus, long face, broad nose, downslanting palpebral fissures, high palate, low set ears and dysplastic nails [1, 2].

In addition to the published cases, two other patients with deletions overlapping this region are listed in the current version of the ISCA database (<https://www.iscaconsortium.org>). There is only limited clinical information on the carrier of the longer deletion (developmental delay and additional significant developmental and morphological phenotypes). The patient with the shorter deletion not involving the *HOXC* cluster showed developmental delay, distal arthrogryposis and malar hypoplasia. The DECIPHER database (<https://decipher.sanger.ac.uk>) lists only one aberration of this region, a duplication of the *HOXC* cluster in a patient with developmental delay. A similar duplication and a copy number variation of unknown direction (gain or loss) are also listed in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>), together with other aberrations clustering at the breakpoints of the deletion in our patient, which also coincide with segmental duplications (Fig. 1).

The *HOX* genes are highly conserved and play a key role in the determination of the body plan along the anterior-posterior body and limb axes during the embryonic development. Multiple mouse *Hoxc* knock out studies were performed with various destructive effects [3, 4]. However, aberrant phenotypes could only be observed in homozygous animals. In addition, it was suggested that loss of function of one gene acting in concert with other *Hoxc* genes causes a neomorphic transformation, while when all nine *Hoxc* genes are lost, the morphogenesis is conducted solely by other *Hox* clusters, resulting in a nearly complete rescue of proper skeletal morphogenesis [5]. It is unclear if these observations in the mouse model could also have consequences for the possible role of hemizygous deletions of the whole *HOXC* cluster in humans. The presence in this cluster of the *HOTAIR* gene, the product of which, a long non-coding RNA, is known to regulate in trans the expression of the *HOXD* genes in human but not in mouse [6], adds an additional level of complexity to the mechanism of deletions of this region. It is also possible that more delicate or human-specific phenotypes may not be recognizable in the mouse model.

If we neglect distant regulatory effects, the ISCA patient carrying a deletion not involving the *HOXC* cluster and yet sharing some features with the other patients may point to the role of genes neighboring the *HOXC* cluster in the clinical symptoms. The *RARG* gene coding the retinoid acid receptor gamma, a transcription factor, could contribute to the skeletal anomalies. The protein is required for skeletal growth and growth plate function, and retinoids influence the skeletogenesis in mice [7]. However, the deletion in the patient described by Okamoto does not include *RARG*. All three patients lack one copy of *SP7*, another candidate gene coding a bone-specific transcription factor required for osteoblast differentiation and bone formation [8]. Some genes in the overlap of all three deletions including *SP1*, *ATP5G2* or *MAP3K12* are expressed in the nervous system and their reduced



dosage can lead to intellectual disability. SP1 is an oxidative stress-induced transcription factor expressed in cortical neurons, which reduces apoptosis, positively regulates neuronal survival and is essential for early embryonic development in mice [9]. The *MAP3K12* gene is a member of the MAPK signaling cascade responding to growth factors. This pathway is important for normal cognitive development, and its components have been associated with intellectual disability [10].

We conclude that these cases may represent a new genetic disorder caused by hemizygous loss of the *HOXC* cluster and/or the adjacent genes. The genotype-phenotype correlation and the assignment of causal roles to specific genes will profit from the description of additional patients with this rare syndrome, and from the revision of the phenotype of heterozygous knock out animals.

#### Acknowledgments

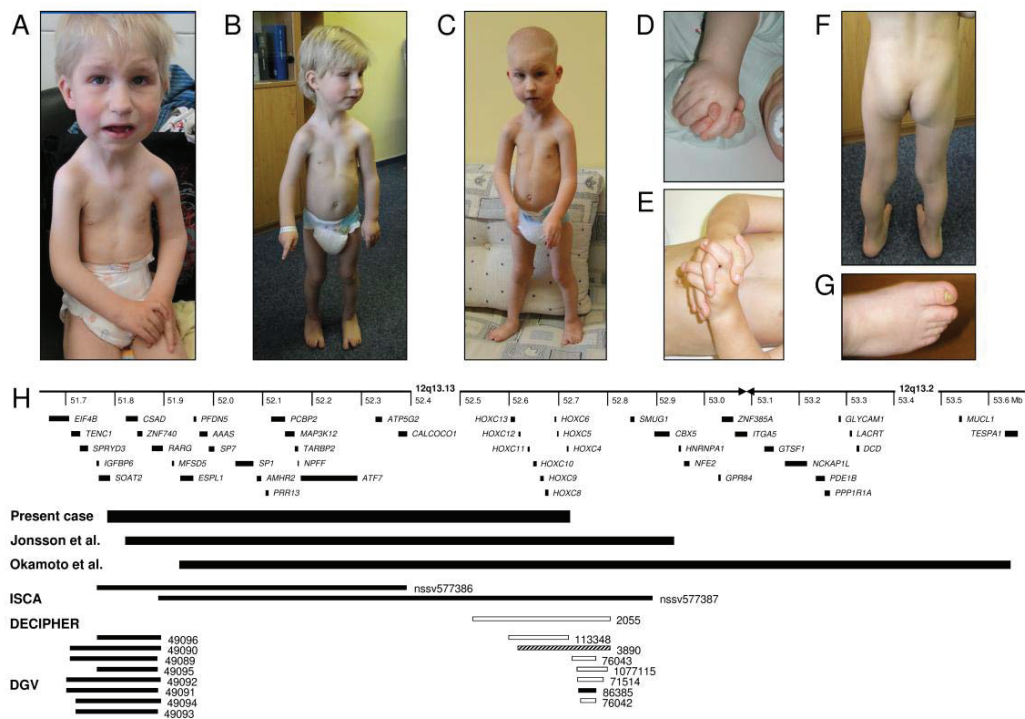
We thank the family of the patient for cooperation. The work was supported by European Commission grant CHERISH 223692 and Czech research development grant 00064203.

## References

- [1] Jonsson DI, Ludvigsson P, Aradhya S, Sigurdardottir S, Steinarsdottir M, Hauksdottir H, Jonsson JJ. A de novo 1.13 Mb microdeletion in 12q13.13 associated with congenital distal arthrogryposis, intellectual disability and mild dysmorphism. *Eur J Med Genet.* 2012; 55: 437-40.
- [2] Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A: 2997-3001.
- [3] Saegusa H, Takahashi N, Noguchi S, Suemori H. Targeted disruption in the mouse Hoxc-4 locus results in axial skeleton homeosis and malformation of the xiphoid process. *Dev Biol.* 1996; 174: 55-64.
- [4] Le Mouellic H, Lallemand Y, Brulet P. Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3.1 gene. *Cell.* 1992; 69: 251-64.
- [5] Suemori H, Noguchi S. Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol.* 2000; 220: 333-42.
- [6] Schorderet P, Duboule D. Structural and functional differences in the long non-coding RNA hotair in mouse and human. *PLoS Genet.* 2011; 7: e1002071.
- [7] Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, Westmoreland SV, Chambon P, Scadden DT, Purton LE. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell.* 2007; 129: 1097-110.
- [8] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108: 17-29.
- [9] Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* 1997; 89: 619-28.
- [10] Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord.* 2010; 2: 182-209.

## Figure legend

Fig. 1: The phenotype of the patient and the context of his 12q13.13 deletion. Photographs of the patient at the age of 3 (A), 4 (B) and 5 years (C) are shown together with details of his atypical hand grip (D, E; atypical position of the fingers can also be seen on A-C), a rear view of his abnormally shaped lower limbs (F), and hypoplastic nails on his feet (G). A diagram of the deleted region (H) shows the deletion in our patient and the two published cases together with the protein-coding genes in the region and aberrations listed in various databases. Black rectangles, deletions; open rectangles, duplications; hatched rectangle, gain or loss.



Manuscript Number:

Title: Identification and analysis of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15

Article Type: Short Chromosomal Imbalance Report

Keywords: 2p14-p15 deletion, 2p15-p16.1 microdeletion syndrome, copy number variation, developmental delay, intellectual disability, SNP array

Corresponding Author: Prof. Zdenek Sedlacek,

Corresponding Author's Institution: Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol

First Author: Miroslava Hancarova

Order of Authors: Miroslava Hancarova; Sarka Vejvalkova; Marie Trkova; Jana Drabova; Alzbeta Dleskova; Zdenek Sedlacek

Abstract: Microdeletions spanning 2p14-p15 have recently been described in two patients with developmental and speech delay and intellectual disability but no congenital malformations or severe facial dysmorphism. We report a 4-year-old boy with a de novo 3.7 Mb long deletion encompassing the region deleted in the previous cases. The patient had clinical features partly consistent with the published cases including intellectual disability, absent speech, microcephaly, long face, bulbous nasal tip and thin upper lip, but his overall clinical picture was more severe compared to the published patients. The identification of this additional patient and detailed analysis of deletions identified in various patient cohorts and in normal individuals support the existence of a new rare microdeletion syndrome in 2p14-p15. Its critical region is in the vicinity of the region deleted in the well established 2p15-p16.1 microdeletion syndrome. A thorough comparison of the deletions and phenotypes indicates that multiple genes located in this region are likely involved in intellectual functioning and that some patients may show composite and more complex phenotypes due to deletions spanning both critical regions.

Ms. Ref. No.: GENE-D-12-00721R1

Title: Identification of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15  
Gene

Dear Sedlacek:

Your manuscript "Identification of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15" has been provisionally accepted for publication in Gene. This acceptance is contingent on you making the changes requested below. Once you have made the following changes, please resubmit your paper.

Comments:

Reviewer #1: The authors revised their article according to the reviewers' comments, and the manuscript is now appropriate for publishing in the journal

Reviewer #2: The authors answered all the comments of the reviewers improving the manuscript quality.

Reviewer #3: The authors have revised the manuscript according to the reviewers' recommendations and the manuscript has been improved. They have responded to the comments in a suitable way.

I have one comment: I do not find it right to write hypotelorism when it has not been measured. A proposal could be apparent hypotelorism or a visual impression of hypotelorism (not measured).

To submit a revision, please go to <http://ees.elsevier.com/gene/> and login as an Author.

Your username is: [zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz](mailto:zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz)

If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/gene/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/gene/automail_query.asp).

On your Main Menu page is a folder entitled "Submissions Needing Revision". You will find your submission record there.

Please submit the revision within 4 weeks.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Meghan Jendrysik, Ph.D.  
Scientific Editor  
Gene

Short Communication

Identification of a patient with intellectual disability and *de novo* 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15

Miroslava Hancarova <sup>a</sup>, Sarka Vejvalkova <sup>a</sup>, Marie Trkova <sup>b</sup>, Jana Drabova <sup>a</sup>,  
Alzbeta Dleskova <sup>a</sup>, Marketa Vlckova <sup>a</sup>, Zdenek Sedlacek <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Gennet, Prague, Czech Republic

Running title: A new case with 2p14-p15 microdeletion

\* Corresponding author.

*E-mail address:* zdenek.sedlacek@lfmotol.cuni.cz (Z. Sedlacek)

Zdenek Sedlacek, Department of Biology and Medical Genetics,

Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol,

Plzenska 130/221, 15000 Prague 5, Czech Republic

Tel.: +420 257296153; fax: +420 224433520

**Abstract**

Microdeletions spanning 2p14-p15 have recently been described in two patients with developmental and speech delay and intellectual disability but no congenital malformations or severe facial dysmorphism. We report a 4-year-old boy with a *de novo* 3.7 Mb long deletion encompassing the region deleted in the previous cases. The patient had clinical features partly consistent with the published cases including intellectual disability, absent speech, microcephaly, long face, bulbous nasal tip and thin upper lip, but his overall clinical picture was more severe compared to the published patients. The identification of this additional patient and a detailed analysis of deletions identified in various patient cohorts and in normal individuals support the existence of a new rare microdeletion syndrome in 2p14-p15. Its critical region is in the vicinity of but clearly separate from the minimal region deleted in the well established 2p15-p16.1 microdeletion syndrome. A thorough comparison of the deletions and phenotypes indicates that multiple genes located in this region may be involved in intellectual functioning, and that some patients may show composite and more complex phenotypes due to deletions spanning both critical regions.

**Keywords**

2p14-p15 deletion, 2p15-p16.1 microdeletion syndrome, copy number variation, developmental delay, intellectual disability, SNP array

## 1. Introduction

During the last years many novel microdeletion and microduplication syndromes with intellectual disability (ID) have been identified using microarray methods (Cooper et al., 2011; Ropers, 2010). However, individually these syndromes account usually only for small fractions of percent of cases with ID, and many of the syndromes have been described only in a handful of patients. Reporting of new cases with known syndromes is important for the definition of the phenotype spectra of the syndrome and for the delineation of the minimal deleted region responsible for the symptoms. A report of a new patient can also support the causality of a defect which has only been described in a very limited number of individuals. In this paper we describe a patient with ID and a deletion of chromosome 2p14-p15. Our report supports the existence of a novel microdeletion syndrome with critical region adjacent to but clearly separate from that of the well established 2p15-p16.1 microdeletion syndrome (Piccione et al., 2012).

## 2. Material and methods

### 2.1 Patient

The patient was referred to a geneticist at 19 months of age because of microcephaly and developmental and speech delay. The boy was born as a second child to healthy non-consanguineous Czech parents aged 29 years (mother) and 30 years (father). The delivery was severely premature in the 25th week of gestation with birth weight of 680 g. The normal elder brother of the patient was also born prematurely in the 29th week of gestation. The patient required ventilatory support during the first month of life, a surgical ligation of persistent ductus arteriosus and two repairs of inguinal hernias. The first measurement of head circumference (HC) is available from 3 months after birth (32 cm, 25th centile, after correction for the gestational age). The boy had serious feeding problems. At the age of 6 months he was noted to have a very slow increase of HC, and severe microcephaly was clearly evident after 1 year of age. At 19 months his height, weight and HC were at -1.5 SD, -3.1 SD and -5 SD, respectively (Fig. 1). At the last examination at 4 years and 3 months the boy showed marked muscle and fat wasting, microcephaly and brachycephaly, and his height, weight and HC were at -1.9 SD, -2 SD and -5.4 SD, respectively. His facial features included long face with slight bitemporal narrowing, a visual impression of hypotelorism (not measured), bulbous nasal tip, smooth philtrum, thin upper lip, prominent chin and large,



protruding, low set and dysplastic ears (Fig. 1). The eruption of teeth was delayed (at 18 months of age). The patient had undescended testes and several small hemangiomas on legs and body. MRI of the brain showed at the age of 18 months a hemosiderin deposition in the left lateral ventricle and rims of hyperintense signal around the temporal and occipital horns of both lateral ventricles. These changes could be a consequence of intracranial hemorrhage in the newborn period. The psychomotor development of the boy was delayed. He started to walk shortly before the age of 3 years and at 4 years his developmental quotient corresponded to a less than 2-year-old child. The most obvious was his severe speech impairment. At the age of 4 years his speech corresponded to a 1-year-old child. He could follow simple instructions but his speech was nearly absent. His ID was classified as moderate to severe. Phoniatric examination showed no hearing impairment. Ophthalmological exam revealed bilateral myopia (-2D). The patient was severely hyperactive. He was under neurological surveillance because of cerebral palsy possibly caused by his severe perinatal history. He was diagnosed with common type spastic cerebral palsy with only discrete signs of diparesis and cerebellar ataxia but without any seizures in his personal history. The patient was referred to rehabilitation therapy and a special education centre, where he made slow progress in his cognitive and motor development.

## *2.2 Laboratory methods*

Peripheral blood samples were obtained from the patient and his parents based on their informed consent. Conventional cytogenetic analysis was performed using standard G-banding, and *FMRI* gene testing used the Fragile X PCR Kit (Abbott, Abbott Park, IL, USA). Genomic DNA of the patient was analyzed on a HumanCytoSNP-12 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using Genome Studio (Illumina) and QuantiSNP (Colella et al., 2007). The analysis used genome build hg18. The deletion identified was independently confirmed using FISH probe RP11-44A12 (BlueGnome, Cambridge, UK).

## **3. Results**

The cytogenetic analysis revealed a normal male karyotype, and the *FMRI* testing did not show any CGG trinucleotide expansion in the patient. The SNP array analysis revealed a 3.7 Mb long microdeletion of chromosome 2p14-p15 with the distal breakpoint between

rs6714793 and rs6722228, and the proximal breakpoint between rs7579084 and rs840776 (minimum span: chr2:62,013,233-65,731,466; maximum span: chr2:61,966,678-65,743,837). The distal deletion breakpoint was located in the *COMMD1* gene and the proximal breakpoint between the *SPRED2* and *MEIS1* genes. The deletion involved 18 protein-coding RefSeq genes (Fig. 2) and 6 non-coding RNA genes. The deletion was the sole aberration observed in the patient. It was confirmed using FISH in the patient but in none of his parents, indicating its *de novo* nature.

#### 4. Discussion

The deletion in our patient overlapped with the 2p14-p15 deletions described recently in two patients proposed to have a novel microdeletion syndrome (Wohlleber et al., 2011). The published patients showed developmental delay, mild ID and speech delay but no congenital malformations or severe facial dysmorphism (Table 1). The first case, an 8-year-old boy, had mild microcephaly. The other patient, a 12-year-old girl, had normal HC, and also her other phenotypic features and facial dysmorphism were much milder. The developmental and speech delay and the overall clinical picture of our patient were more severe compared to both of these published patients. This could be partly attributed to his prematurity and more severe perinatal history, as indicated also by the MRI findings. Growth and developmental retardation, microcephaly and cerebral palsy are also among known consequences of preterm delivery (Kytnarova et al., 2011). Concurrently, preterm births are frequent in carriers of genetic defects (Honein et al., 2009). Nevertheless, some aspects of the phenotype of our patient including ID, speech delay, long face, bulbous nasal tip and thin upper lip were reminiscent of the features seen in the reported patients. The similarity was higher with the more severely affected boy (Table 1), with whom our patient also shared feeding difficulties, microcephaly and very severe speech impairment, although the microcephaly in our patient was even more pronounced.

The phenotypes of the three patients could also differ due to the differences in the size and gene content of the deletions. The three deletions shared no common breakpoints, and the 3.7 Mb long deletion in our patient was the longest with the highest number of deleted genes. The shortest region of overlap of all three deletions contained 10 protein-coding genes (Fig. 2). Some of them could be candidates for ID based on their expression in the brain or their role in neuronal development or functioning. The *AFTPH* gene product aftiphilin is expressed

exclusively in the brain where it is enriched on clathrin-coated vesicles and is likely involved in trafficking in neurons. Aftiphilin is also found at synapses (Burman et al., 2005). The *SLC1A4* gene encodes an amino acid transporter and is expressed mostly in the brain. Its product is depleted in neurons in the cingulate cortex and in astrocytes of the white matter in schizophrenia, and in neurons in bipolar disorder and major depression, reflecting the changes in glutamatergic neurotransmission in these disorders (Weis et al., 2007). The *RAB1A* gene encodes a member of the Ras superfamily of GTPases. Its product is a key regulator of the intracellular vesicle transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus that it is crucial for proper neuron growth and neuronal differentiation (Maier et al., 2009).

Two recently published large studies of copy number variation in ID and developmental delay (DD) (Cooper et al., 2011; Kaminsky et al., 2011) and the DECIPHER database (Firth et al., 2009) list several overlapping deletions involving 2p14-p15. These deletions have variable breakpoints, length and gene contents. This together with the phenotypic heterogeneity usually seen in the novel microdeletion syndromes complicates the genotype-phenotype correlation. The symptoms of the 2p14-p15 syndrome are not specific and some are similar to the phenotypic features of the well established 2p15-p16.1 microdeletion syndrome, although some symptoms of the latter disorder such as telecanthus, broad nasal root, long philtrum, camptodactyly, structural brain anomalies and autism (Piccione et al., 2012) are missing in patients with 2p14-p15 deletions. Some specific recognizable phenotypic signs such as long face, bulbous nasal tip and thin upper lip seem to be characteristic of the 2p14-p15 syndrome. Several deletions overlap both the 2p14-p15 and the 2p15-p16.1 regions (Fig. 2), but the current narrowing down of the shortest region of overlap of the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome (Piccione et al., 2012) and the clear separation of the cluster of deletions including those in our patient and the previously published boy and girl (Fig. 2) support the existence of a novel microdeletion syndrome in the 2p14-p15 region. The definition of this condition will require the analysis of additional cases, because multiple genes from this broader region are likely to be involved in ID, and some patients may show composite and more complex phenotypes.

### **Acknowledgments**

We thank the family of the patient for cooperation and the reviewers for helpful comments. Supported by CHERISH 223692, CZ.2.16/3.1.00/24022 and a Czech grant for conceptual development of research organization 00064203.

## References

- Burman, J. L., Wasiak, S., Ritter, B., de Heuvel, E., McPherson, P. S., 2005. Aftiphilin is a component of the clathrin machinery in neurons. *FEBS Lett.* 579, 2177-84.
- Colella, S., Yau, C., Taylor, J. M., Mirza, G., Butler, H., Clouston, P., Bassett, A. S., Seller, A., Holmes, C. C., Ragoussis, J., 2007. QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* 35, 2013-25.
- Cooper, G. M., Coe, B. P., Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Vu, T. H., Baker, C., Williams, C., Stalker, H., Hamid, R., Hannig, V., Abdel-Hamid, H., Bader, P., McCracken, E., Niyazov, D., Leppig, K., Thiese, H., Hummel, M., Alexander, N., Gorski, J., Kussmann, J., Shashi, V., Johnson, K., Rehder, C., Ballif, B. C., Shaffer, L. G., Eichler, E. E., 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat. Genet.* 43, 838-46.
- Durbin, R. M., Altshuler, D., Brooks, L. D., Felsenfeld, A., McEwan, J., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., Collins, F. S., Peterson, J. L., Schafer, A. J., Xue, Y., Cartwright, R. A., 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 467, 1061-73.
- Firth, H. V., Richards, S. M., Bevan, A. P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., Van Vooren, S., Moreau, Y., Pettett, R. M., Carter, N. P., 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 524-33.
- Honein, M. A., Kirby, R. S., Meyer, R. E., Xing, J., Skerrette, N. I., Yuskiv, N., Marengo, L., Petrini, J. R., Davidoff, M. J., Mai, C. T., Druschel, C. M., Viner-Brown, S., Sever, L. E., 2009. The association between major birth defects and preterm birth. *Matern. Child Health J.* 13, 164-75.
- Kaminsky, E. B., Kaul, V., Paschall, J., Church, D. M., Bunke, B., Kunig, D., Moreno-De-Luca, D., Moreno-De-Luca, A., Mulle, J. G., Warren, S. T., Richard, G., Compton, J. G., Fuller, A. E., Gliem, T. J., Huang, S., Collinson, M. N., Beal, S. J., Ackley, T., Pickering, D. L., Golden, D. M., Aston, E., Whitby, H., Shetty, S., Rossi, M. R., Rudd, M. K., South, S. T., Brothman, A. R., Sanger, W. G., Iyer, R. K., Crolla, J. A., Thorland, E. C., Aradhya, S., Ledbetter, D. H., Martin, C. L., 2011. An evidence-

based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet. Med.* 13, 777-84.

Kytnarova, J., Zlatohlavkova, B., Kubena, A., Markova, D., Dokoupilova, M., Plavka, R., Zeman, J., 2011. Post-natal growth of 157 children born as extremely premature neonates. *J. Paediatr. Child Health.* 47, 111-6.

Maier, S., Reiterer, V., Ruggiero, A. M., Rothstein, J. D., Thomas, S., Dahm, R., Sitte, H. H., Farhan, H., 2009. GTRAP3-18 serves as a negative regulator of Rab1 in protein transport and neuronal differentiation. *J. Cell Mol. Med.* 13, 114-24.

Piccione, M., Piro, E., Serraino, F., Cavani, S., Ciccone, R., Malacarne, M., Pierluigi, M., Vitaloni, M., Zuffardi, O., Corsello, G., 2012. Interstitial deletion of chromosome 2p15-16.1: report of two patients and critical review of current genotype-phenotype correlation. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 238-44.

Ropers, H. H., 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 161-87.

Weis, S., Llenos, I. C., Dulay, J. R., Verma, N., Sabunciyan, S., Yolken, R. H., 2007. Changes in region- and cell type-specific expression patterns of neutral amino acid transporter 1 (ASCT-1) in the anterior cingulate cortex and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *J. Neural Transm.* 114, 261-71.

Wohlleber, E., Kirchhoff, M., Zink, A. M., Kreiss-Nachtsheim, M., Kuchler, A., Jepsen, B., Kjaergaard, S., Engels, H., 2011. Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. *Eur. J. Med. Genet.* 54, 67-72.

Table 1. The comparison of phenotypes of the three patients.

<b>Wohlleber et al. Patient 1</b>	<b>Wohlleber et al. Patient 2</b>	<b>Present case</b>
male 8 y 3 m	female 12 y	male 4 y 3 m
<b>Head and face:</b>		
microcephaly	x	microcephaly, brachycephaly
long face	x	long face
bulbous nasal tip	broad nasal tip	bulbous nasal tip
thin upper lip	thin upper lip	thin upper lip
slightly hooded eyelids	hooded eyelids	x
x	x	smooth philtrum, prominent chin
x	x	large dysplastic low set ears
<b>Other features:</b>		
mild funnel chest	x	x
smooth fetal finger pads	x	x
slight syndactyly of the 2nd and 3rd toes of the right foot	x	x
x	joint hypermobility	x
x	x	muscle and fat wasting
x	n. a.	undescended testes
<b>Milestones and cognitive and sensory development:</b>		
feeding problems	x	feeding problems
x	x	delayed teeth eruption
walked at 15 m	walked at 18 m	walked just before the age of 3 y
speech delay (2 - 3-word sentences at 5 y)	speech delay (single words at 3 y, simple sentences at 4 y)	speech delay (single words at 4 y)
mild ID	mild ID	moderate to severe ID
brain MRI normal	brain MRI normal	small changes in the lateral ventricles
generalized seizures	x	x
sensorineural hearing loss	x	x
mild hyperopia	x	bilateral myopia
x	clumsy	x
x	x	severe hyperactivity

y, years; m, months; x, character absent; n. a., not applicable

**Figure legends**

Fig. 1. Front and lateral views of the patient at the age of 19 months (A), 2 years and 3 months (B), and 4 years and 3 months (C, D).



Fig. 2. Schematics of the region affected by the deletion in our patient including the protein-coding gene content and the shortest region of overlap (SRO) of the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome. Deletions are depicted in red, duplications in blue. Deletions in the present case and in the previously published patients with the proposed 2p14-p15 microdeletion syndrome are shown together with aberrations identified in large published ID/DD cohorts and aberrations listed in DECIPHER, DGV and the 1000 Genomes Project (Durbin et al., 2010). Only aberrations overlapping with the deletion in our patient are shown. Deletions overlapping the 2p15-p16.1 microdeletion syndrome SRO are hatched.

