

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ŽIVILĖ ČIULADAITĖ

NESUBALANSUOTŲ CHROMOSOMINIŲ STRUKTŪROS POKYČIŲ  
PAPLITIMAS ŽMOGAUS GENOME IR JŲ REIŠMĖ INTELEKTINĖS  
NEGALIOS ETIOPATOGENEZEI

Daktaro disertacijos santrauka  
Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2009–2013 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje

**Mokslinis vadovas:**

prof. habil. dr. Vaidutis Kučinskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

**Konsultantas:**

prof. dr. Philippos Patsalis (Kipro neurologijos ir genetikos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

**Disertacija ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:**

**Pirmininkas** – prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

**Nariai:**

prof. dr. Valmantas Budrys (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

prof. dr. Dalius Jatužis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

prof. dr. Angelika Dawson (Manitobos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

**Oponentai:**

prof. habil. dr. Limas Kupčinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2013 m. rugsėjo mėn. 18 d. 15 val. VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Raudonojoje auditorijoje (E122).

Adresas: Santariškių 2, LT-08661, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2013 m. rugpjūčio mėn. 14d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

## TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	4
I. ĮVADAS .....	7
II. TYRIMŲ APŽVALGA .....	18
2.1 Technologijų pažanga.....	18
2.2. KSP paplitimas žmogaus genome .....	21
2.3. Retų KSP įtaka nervų sistemos vystymuisi ir funkcionavimui .....	23
2.4. KSP vertinimas/interpretavimas. Pagrindiniai kriterijai. Problemos. ....	24
2.5. KSP formavimosi mechanizmai .....	27
III. DARBO METODOLOGIJA .....	38
3.2. TYRIMO eiga.....	38
3.3. TYRIMO metodai .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.1 Rutininis citogenetinis tyrimas (diferencinis G dažymas).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3. TYRIMO metodai .....	40
3.3.1. Rutininis citogenetinis tyrimas (diferencinis G dažymas).....	40
IV. TYRIMŲ REZULTATAI .....	46
4.1. Bendroje populiacijoje paplitusių KSP apibūdinimas.....	46
4.2. KSP palyginimas tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėje .....	52
4.3. Reti KSP .....	56
4.4. KSP formavimosi mechanizmai .....	82
4.5. vLGH metodo diagnostinė nauda.....	84
V. IŠVADOS .....	88
VI. NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	89
PRIEDAS.....	104

## SANTRUMPU SARAŠAS

*ACTB* – actin, beta

Alu – trumpi pasikartojimai

*ARID1A* – *AT rich interactive domain 1A (SWI-like)*

BAC (angl. *bacterial artificial chromosome*) – dirbtinė bakterijų chromosoma

bp – bazių pora

cAMF – ciklinis adenozinmonofosfatas

*CaMKII* – *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*

CING (angl. *The Cyprus Institute of Neurology and Genetics*) – Kipro neurologijos ir genetikos institutas

CNS – centrinė nervų sistema

*CNTNAP2* (angl. *contactin associated protein-like 2* )

*COMT* – *Catechol-O-methyltransferase*

*CRIP1a* – *cannabinoid receptor interacting protein 1*

*CTNND2* – *catenin (cadherin-associated protein), delta 2*

DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*

*Dgcr8* – *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DGT – dvigrandžiai trūkiai

DGV – *Database of Genomic Variants*

*DIP2A* – *DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila)*

DNR – deoksiribonukleorūgštis

*DSCAM* – *Down syndrome cell adhesion molecule*

*ErbB4* (angl. *v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4*)

*FCN3* – *ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 3 (Hakata antigen)*

FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija

GFI – glikozilfosfatidilinozitolis

*GPR3* – *G protein-coupled receptor 3*

HR – homologinė rekombinacija

INN – intelektinė negalia

IQ – intelekto koeficientas  
*KCNH2* – *potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 2*  
KSP – kopijų skaičiaus pokytis  
LCR (angl. *low copy repeat*) – žemo dažnio kopijų pasikartojimai  
*LINE* (angl. *long interspersed element*) – ilgos išsibarsčiusios sekos  
*MAPK3* – *mitogen-activated protein kinase 3*.  
Mb – megabazė  
*MEF2C* – *myocyte enhancer factor 2C*  
MGC – Medicininės genetikos centras  
MHEJ (angl. *microhomology-mediated end joining*) – mikrohomologijos lemiamas galų susijungimas  
miRNR – maža ribonukleorūgštis  
MMBIR (angl. *microhomology-mediated break-induced replication, MMBIR*) – mikrohomologijos lemiamas, trūkio sukelta replikacija  
NAHR (angl. *non allelic homologous recombination*) – nealelinė homologinė rekombinacija  
NHEJ (angl. *non-homologous end joining*) – nehomologiškas galų susijungimas  
NKS – naujos kartos sekvenavimas  
*NSD1* – *nuclear receptor binding SET domain protein 1*  
*NSD1* - *nuclear receptor binding SET domain protein 1*  
OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*  
*OTX1* – *orthodenticle homeobox 1*  
*PCNT* – *pericentrin*  
*PCP4* – *Purkinje cell protein 4*  
*PIGV* – *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class V*  
*PRMT2* – *protein arginine methyltransferase 2*  
*PRODH* – *proline dehydrogenase (oxidase) 1*  
RA – raidos atsilikimas  
*RAI1* – *retinoic acid induced 1*  
RL-PGR – realaus laiko polimerazės grandininė reakcija

*S100* – *S100 calcium binding protein A1*  
*SEZ6L2* – *seizure related 6 homolog (mouse)-like 2*  
*SHANK3* – *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*  
*SLC4A10* – *solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10*  
SLŽA – sudėtinė nuo ligacijos priklausomų žymenų amplifikacija  
SSA (angl. *single strand anealing*) – viengrandžių galų susijungimas  
*TBX1* – *T-box 1*  
*TBX6* – *T-box 6*  
*TRPM2* – *transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2*  
*TSPEAR* – *thrombospondin-type laminin G domain and EAR repeats*  
*UBE3A* – *ubiquitin protein ligase E3A*  
vLGH – vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija  
VNP – vieno nukleotido polimorfizmas  
VNP-LGH – vieno nukleotido polimorfizmu paremta lyginamoji genomo hibridizacija  
VU ŽMGK – Vilniaus universiteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedra  
VULSK – Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos  
ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

## I. ĮVADAS

Nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai — delecijos, duplikacijos ar insercijos, kurių dydis varijuoja nuo kilobazės iki kelių ar keliolikos megabazių dydžio, bendrai vadinami DNR kopijų skaičiaus pokyčiais (KSP) — yra pagrindinis žmogaus genomo įvairovės šaltinis, svarbus veiksnys, lemiantis fenotipinę įvairovę ir ligas (Stankiewicz & Lupski, 2010). Vienas dažniausių žmogaus sveikatos sutrikimų, siejamų su KSP, yra intelektinė negalia (INN). Amerikos protinio atsilikimo asociacija ir Amerikos psichiatrijos asociacija INN, kitaip vadinamą protiniu atsilikimu, apibrėžia kaip žymiai mažesnę nei vidutinė intelekto funkciją su adaptacinių įgūdžių ribotumu, pasireiškiančią iki 18 metų amžiaus (Shevell *et al.*, 2003).

Nesubalansuoti genomo pokyčiai su INN siejami nuo 1959 metų, kai buvo nustatyta, kad papildoma 21 chromosoma lemia *Down* sindromą. INN genetinių priežasčių, kurių svarbią dalį sudaro submikroskopiniai chromosominiai persitvarkymai, vadinami patogeniniais DNR kopijų skaičiaus pokyčiais, spektras sparčiai išaugo kartu su technologijų pažanga molekulinės citogenetikos ir molekulinės genetikos srityse, atitinkamai didelės raiškos vektorinės lyginamosios hibridizacijos (vLGH) ir naujos kartos sekvenavimo (NKS) technologijų pritaikymu klinikinėje praktikoje.

Nors KSP reikšmė fenotipinei įvairovei ir ligoms yra žinoma seniai, jų funkcinio poveikio mechanizmai nėra galutinai įrodyti. Didelio pajėgumo DNR sekvenavimo ir mikrolustų technologijų pažanga suteikė galimybę analizuoti KSP žmonių populiacijose ir modeliniuose organizmuose bei sukonstruoti KSP genolapį.

Viso žmogaus genomo tyrimai, taikant LGH, atskleidė, kad yra bent 12000 KSP, kurie apima daugiau nei 1000 genų ir sudaro 5–12 % žmogaus genomo (McCarroll *et al.*, 2010; Redon *et al.* 2006). Kiekvieno asmens genome yra vidutiniškai 1000 KSPs. Dauguma KSP yra dažni ir kliniškai nereikšmingi, o reti KSP gali būti kliniškai reikšmingi, lemiantys skirtingus fenotipus priklausomai nuo genetinės srities ir pokyčio tipo.

Praplėtus žinias apie žmogaus genomo įvairovę ypač susidomėta INN, kuri yra aktuali sveikatos sutrikimo problema (lemianti iki 40 % neįgalumo atvejų) visame pasaulyje, genetinėmis priežastimis. INN dažnis bendroje populiacijoje yra nuo 1 iki 3 % (Shevell *et al.*, 2003; Leonard H & Wen X, 2002). Dviem trečdaliams pacientų INN priežastys yra genetinės, tačiau jų diagnostika sudėtinga dėl gausybės skirtingų genetinių pokyčių bei mechanizmų, pasireiškiančių dažnai kliniškai neatskiriamais ar sunkiai atskiriamais vienas nuo kito fenotipais. Nepaisant spartaus technologinio progreso genetikos ir genomikos mokslo srityje, INN priežasties nustatymo tikimybė varijuoja. Pastebėta, kad kuo sunkesnė yra INN, tuo dažniau jos priežastis būna kiekybiniai chromosomų struktūros pokyčiai – KSP (Liang *et al.*, 2008).

Šio mokslinio darbo metu buvo atlikti didelės skiriamosios gebos vLGH tyrimai tiriamiesiems, turintiems INN, ir kontrolinės grupės asmenims. Gauta informacija apie plačiai žmogaus genome paplitusius KSP ir retuosius Lietuvos populiacijai būdingus KSP yra pagrindas įvertinti retus KSP. Atlikus išsamią bioinformacinę retų, galimai kliniškai reikšmingų variantų analizę, įvertinta KSP įtaką centrinės nervų sistemos (CNS) funkcionavimui ir nustatyti galimi genai kandidatai INN bei kitiems klinikiniais požymiams.



## **Darbo tikslas, uždaviniai**

**Tikslas** – nustatyti genetinių sričių kiekybinius pokyčius bei jose esančius stiprius genus kandidatus, kurių dozės pokytis lemia intelektinę negalią.

### **Uždaviniai:**

1. Įvertinti žmogaus genome paplitusių kopijų skaičiaus pokyčius pagal pokyčių pobūdį, dydį, padėtį bei dažnius, remiantis molekulinio kariotipavimo rezultatais, gautais tiriant Lietuvos populiaciją.
2. Parinkti kriterijus retų KSP patogeniškumo vertinimui, remiantis kontrolinės grupės ir asmenų, turinčių intelektinę negalią, molekulinio kariotipavimo tyrimų rezultatais.
3. Nustatyti galimus genus kandidatus, susijusius su intelektine negalia, remiantis retų KSP bioinformacine analize: genų, kurių kopijų skaičius pakinta, raiškos pobūdžiu, molekuline funkcija, sąveika su kitais genais, konkretaus geno mutacijos atvejų genotipo-fenotipo analize.
4. Įvertinti galimus chromosomų struktūros pokyčių formavimosi mechanizmus, remiantis aplink trūkio taškus esančių sekų architektūrinėmis ypatybėmis.
5. Įvertinti 105 K ir 400K mikrolustų diagnostinį efektyvumą.

### **Darbo naujumas ir reikšmė**

Gilinimasis į INN priežastis ir patogenezę yra labai svarbus dėl šios būklės paplitimo populiacijoje masto, ilgalaikių socialinių ir ekonominių priežasčių bei ribotų gydymo galimybių. Žinoma, kad INN priežastys yra labai heterogeninės, daugeliu atvejų – genetinės. Genetinės diagnozės nustatymas asmenims, turintiems INN, dažnai yra sudėtingas dėl didelio su šia būkle siejamo genetinio ir fenotipinio heterogeniškumo. Genetinės priežastys gali būti įvairios – nuo didelių citogenetinių persitvarkymų iki taškinių mutacijų ir epigenetinių pokyčių. Ypač mokslininkus domina retos monogeninės (paveldimos pagal

Mendelio dėsnis) ligos, nes nustatant jų genetines priežastis gaunama vertingų žinių apie ligos patogenezės mechanizmus, sutrikdytus biologinius kelius ir gydymo galimybes (Ng *et al.*, 2010).

Ilgą laiką buvo sunku išaiškinti genetinius INN etiologijos aspektus. Manoma, kad citogenetiniai pokyčiai sudaro didžiąją dalį INN genetinių priežasčių (van Karnebeek *et al.*, 2005; Rauch *et al.*, 2006), tačiau rutininis kariotipavimas G dažymo metodu nustato tik didesnius nei 5 Mb dydžio pokyčius. Daugybės genų nukleotidų sekos nustatymas – itin daug laiko užimantis ir brangus metodas, todėl daugiausia tyrimų siekiant nustatyti ligą lemiančius genus buvo atliekama sankibos analizės ir pozicinio klonavimo metodais, į tyrimus įtraukiant dideles šeimas su daug ta pačia liga sergančių individų. Šiuos tyrimus riboja įvairūs veiksniai: nedidelis tinkamų analizei šeimų skaičius, su liga siejamų genetinių sričių heterogeniškumas arba sumažėjęs reprodukcinis tinkamumas.

Pastaruoju metu naujų su INN siejamų genų nustatymo greitis sparčiai išaugo. Tai lėmė pažanga molekulinės citogenetikos ir molekulinės genetikos srityse, atitinkamai didelės raiškos vLGH ir NKS technologijų pritaikymas mokslinėje ir klinikinėje praktikoje. Dabar įmanoma nustatyti patologiją lemiančias mutacijas daugumai asmenų, turinčių INN, nepriklausomai nuo jos dažnumo populiacijoje, heterogeniškumo ir paveldėjimo tipo (Topper *et al.*, 2011). Taigi, kiekvienas tiriamasis, kuriam pasireiškė nežinomos kilmės klinikinė liga, tampa pagrindiniu ir svarbiausiu objektu, nustatant pagal Mendelio dėsnis paveldimų ligų naujus genus kandidatus.

Pritaikius genominių mikrolustų technologiją vLGH INN tyrimuose, atskleista daug naujų INN citogenetinių priežasčių, geriau suprasti INN etiopatogenezės mechanizmai. Per pastaruosius kelerius metus aprašyta daug naujų mikrodelecinių ir mikroduplicacinių sindromų, papildytas jau žinomų ligų klinikinių požymių sąrašas, nustatytos žinomų sindromų genetinės priežastys, nustatyti arba patikslinti ligų patogenezės mechanizmai ir netgi nustatyti genai kandidatai, kurių kiekybiniai ar struktūros pokyčiai lemia klinikinį fenotipą.

Be to, žinant genetinę diagnozę, lengviau galima įvertinti ligos pasikartojimo šeimoje riziką, pasiūlyti tikslingą prenatalinę diagnostiką. Remiantis empiriniais duomenimis, nežinomos etiologijos ligos pasikartojimo šeimoje rizika yra apie 3–7 % (Van Naarden Braun *et al.*, 2005), o *de novo* delecijų ar duplikacijų pasikartojimo rizika yra žymiai mažesnė. Tačiau jeigu nustatoma autosominė recesyvinė genetinė priežastis ar paveldėta translokacija, ligos pasikartojimo rizika išauga atitinkamai iki 25 % ar 50 %.

Nors didelės skiriamosios gebos vLGH metodas yra labai vertingas įrankis nustatyti smulkioms delecijoms/duplikacijoms ir atrasti galimiems genams kandidatams INN, klinikinis retų ir smulkių KSP interpretavimas yra sudėtingas dėl genetinio heterogeniškumo ir skirtingų molekulinų patogenezės mechanizmų. Dėl to vLGH tyrimai bei KSP analizė yra tikslingi ir labai vertingi ne tik sergančiųjų, bet ir kontrolinės sveikos tam tikros populiacijos grupėje. KSP tyrinėjimas asmenų, turinčių INN, ir sveikų Lietuvos populiacijos asmenų grupėje yra visiškai nauja mokslinių tyrinėjimų kryptis Lietuvoje. Kontrolinės grupės ištyrimas palengvina smulkių, duomenų bazėse neskelbtų delecijų/duplikacijų interpretavimą ir bus pagrindas tolesniems tyrimams. Sukaupta informacija apie Lietuvos populiacijai būdingus KSP padės įvertinti unikalių pacientams nustatytų KSP patogeniškumą. Be to, išsamus KSP tyrinėjimas padės geriau suprasti KSP formavimosi mechanizmus, patikrinti kitų mokslininkų iškeltas hipotezes apie nestabilias genomo sritis, nustatyti genominius skirtumus tarp Lietuvos ir kitų populiacijų.

Išsami bioinformacinė retų galimai kliniškai reikšmingų variantų analizė rodo KSP įtaką CNS funkcionavimui – nustatyti galimi genai kandidatai INN bei kitiems klinikiniais požymiams. Žinant geną kandidatą, atsiranda galimybė taikant genų inžineriją kurti gydymą.

### **Ginamieji teiginiai:**

1. Nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai yra plačiai paplitę žmogaus genome, dauguma jų yra dažni ir kliniškai nereikšmingi.

2. Reti DNR kopijų skaičiaus pokyčiai statistiškai reikšmingai skiriasi tiriamųjų, turinčių INN, ir sveikųjų asmenų grupėse pagal dydį ir genų skaičių.
3. Genai, koduojantys sinapsių formavimosi ir išlaikymo, chromatino kondensacijos ir neurotransmisijos procesuose dalyvaujančius baltymus, yra svarbūs normaliai CNS raidai bei funkcijai ir yra potencialūs genai kandidatai INN.
4. Unikalūs, reti chromosomų struktūros persitvarkymai susidaro dėl replikacijos klaidų, o dažni – dėl neteisingos rekombinacijos.
5. 400 K mikrolustas yra didelės skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo įrankis, tinkamas moksliniams populiaciniams ir diagnostiniams tyrimams.

## **Darbo aprobacija**

### **Publikacijos disertacijos tema:**

1. Kasnauskiene J, **Ciuladaite Z**, Preiksaitiene E, Utkus A, Peciulyte A, Kučinskas V. A new single gene deletion on 2q34: ERBB4 is associated with intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2013 Jun;161(6):1487-90.
2. **Čiuladaitė Ž**, Matulevičienė A, Bandanskytė A, Brazaitis A, Kasnauskiene J, Kučinskas V. Familial Distal Monosomy 5p15.3-pter With Trisomy 12q24.2-qter Resulting in Neurodevelopmental Delay and Dysmorphic Features. *J Child Neurol*. 2013 Jan 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23340083.
3. Kasnauskiene J, Cimbalištie L, Utkus A, **Ciuladaite Z**, Preiksaitiene E, Pečiulytė A, Kučinskas V. Two new *de novo* Interstitial Duplications Covering 2p14–p22.1: clinical and molecular analysis. *Cytogenet Genome Res*. 2013;139(1):52-8.
4. Preiksaitiene E, Männik K, Dirse V, Utkus A, **Ciuladaite Z**, Kasnauskiene J, Kurg A, Kucinskas V. A novel *de novo* 1.8 Mb

- microdeletion of 17q21.33 associated with intellectual disability and dysmorphic features. *Eur J Med Genet.* 2012 Nov;55(11):656-9.
5. Preiksaitiene E, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Tumiene B, Patsalis PC, Kučinskas V. Clinical and molecular characterization of a second case of 7p22.1 microduplication. *Am J Med Genet A.* 2012 May;158A(5):1200-3.
  6. Kasnauskiene J, **Ciuladaite Z**, Preiksaitiene E, Matulevičienė A, Alexandrou A, Koumbaris G, Sismani C, Pepalytė I, Patsalis PC, Kučinskas V. A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18 - A new candidate gene for intellectual disability? *Eur J Med Genet.* 2012 Apr; 55(4): 274-7.
  7. **Čiuladaitė Ž**, Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Utkus A, Cimbališienė L, Matulevičienė A, Pečiulytė A, Ambrozaitytė L, Aleksiūnienė B, Dirsė V. Molekulinis kariotipavimas ir intelektinės negalios genetinės priežastys: klinikiniai atvejai. *Sveikatos mokslai* 2012(1): 67–72.
  8. Preikšaitienė E, Utkus A, **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Kučinskas V. Genetinės diagnozės nustatymas esant intelektinei negaliai: Phelan-McDermid sindromo pavyzdys. *Sveikatos mokslai* 2012(1): 73–77.
  9. Kasnauskiene J., Cimbališienė L., **Ciuladaite Z**, Preiksaitiene E., Kučinskiene Z.A., Hettinger J., Sismani C., Patsalis P.C., Kučinskas V. *De novo* 5q35.5 duplication with clinical presentation of Sotos syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011 Oct; 155A(10): 2501-7.
  10. **Ciuladaitė Z**, Kasnauskienė J, Cimbališienė L, Preikšaitienė E, Patsalis PC, Kučinskas V. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. *J Appl Genet.* 2011 Nov; 52(4): 443-9.

#### **Žodiniai pranešimai:**

1. **Čiuladaitė Ž**, Kučinskas V. Copy number variation: new insights in human genome diversity and intellectual disability. *Evolutionary medicine: new solutions for the old.* 2012 06 12-15. Vilnius.

2. **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Kučinskas V. Array-CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with intellectual disability and multiple congenital anomalies. 11<sup>th</sup> Baltic Congress of Laboratory Medicine. 2012 05 19-23. Vilnius.
3. **Čiuladaitė Ž**, Kučinskas V. DNR kopijų skaičiaus pokyčių tyrimas – naujas instrumentas genų kartografavime. Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyriaus kasmetinė jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gyvybės ir geomokslų perspektyvos“. 2012. Vilnius.
4. **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Pečiulytė A, Patsalis PC, Kučinskas V. Patogeninių kartotinių sekų reikšmė protinės raidos atsilikimo etipatogenezėje. Mokslas – žmonių sveikatai: 4-oji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija. 2011 04 07. Kaunas.
5. Šliužas V, **Čiuladaitė Ž**, Kučinskas V. „Frequency of chromosome involvement into major chromosome structure rearrangements“. 11<sup>th</sup> Baltic Congress of Laboratory Medicine. 2012 05 19-23. Vilnius.
6. Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Cimbalistienė L, **Čiuladaitė Ž**, Hettinger JA, Sismani C, Patsalis PC, Kučinskas V. *De novo* 5q35.3 duplikacija, lemianti Sotos sindromo klinikinį pasireiškimą. Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyriaus kasmetinė jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gyvybės ir geomokslų perspektyvos". 2011. Vilnius.

### Stendiniai pranešimai:

1. **Čiuladaitė Ž**, Kučinskas V. Analysis of rare copy number variants in healthy individuals and individuals with ID. International Congress of Genetics and the Human Genome Meeting 2013, Singapore.
2. **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Germanas Š, Jakaitienė J, Kučinskas V. A genome – wide survey of copy number variations in population of Lithuania. European human genetics conference 2013, June 8-11, Paris, France.
3. **Čiuladaitė Ž**, Utkus A, Kasnauskienė J, Preikšaitienė E, Pečiulytė A, Kučinskas V. A *de novo* interstitial deletion at 1p36.11 in a patient presenting with severe psychomotor delay, sensorineural hearing loss, congenital heart defect and dysmorphic features. European human genetics conference 2012, June 23-26, Nürnberg, Germany.
4. **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Matulevičienė A, Preikšaitienė E, Alexandrou A, Patsalis PC, Kučinskas V. A microduplication of the critical Rubinstein-Taybi deletion region: a contiguous gene syndrome? Chromosome research. 8th European cytogenetics conference, 02-05 July, 2011, Portugal.
5. **Čiuladaitė Ž**, Matulevičienė A, Kasnauskienė J, Aleksišūnienė B, Kučinskas V. Small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 3 in patient with severe psychomotor developmental delay and dysmorphism. European human genetics conference 2011, May 28-31, Amsterdam, The Netherlands.
6. Preikšaitienė E, Molytė A, **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Utkus A, Kučinskas V. Phenomic clues to genomic variation in patients with developmental delay or intellectual disability. European human genetics conference 2013, June 8-11, Paris, France.
7. Liaugaudienė O, Cimbalistienė L, **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskienė J, Preikšaitienė E, Kučinskas V. New critical region for recently defined 4q21 microdeletion syndrome. European human genetics conference 2013, June 8-11, Paris, France.

8. Preiksaitiene E, Kasnauskiene J, **Ciuladaitė Z**, Tumiene B, Patsalis PC, Kučinskas V. A second case of 7p22.1 microduplication: clinical and molecular characterization. European human genetics conference 2012, June 23-26, Nürnberg, Germany.
9. Liaugaudienė O, Cimbalištienė L, **Čiuladaitė Ž**, Kasnauskiene J, Preikšaitienė E, Kučinskas V. *De novo* duplication 15q22.21-24.1 in patient with mental retardation, congenital heart defect and dysmorphic features. European human genetics conference 2012, June 23-26, Nürnberg, Germany.
10. Kučinskas V, Kasnauskiene J, Čiuladaitė Ž, Preikšaitienė E, Koumbaris G, Patsalis PC. Pathogenic chromosomal aberrations in the families with Mental Retardation and developmental delay detected by array-CGH. 12th International Congress of Human Genetics and the American Society of Human Genetics 61st Annual Meeting, 11-15 October 2011, Montreal, Canada.
11. Preikšaitienė E, Kasnauskiene J, **Čiuladaitė Ž**, Dirsė V, Cimbalištienė L, Utkus A, Matulevičienė A, Tumienė B, Magini P, Baptista J, Patsalis PC, Kurg A, Kučinskas V. Clinical features associated with submicroscopic chromosomal aberrations in patients with mental retardation/ developmental delay. European journal of human genetics : European human genetics conference 2011, May 28-31, Amsterdam.
12. Dirsė V, Kasnauskiene J, Utkus A, Preikšaitienė E, **Čiuladaitė Ž**, Männik K, Kurg A, Kučinskas V. A de novo 1.8Mb 17q21/33 microdeletion detected by SNP-CGH in patient with mental retardation and dysmorphic fetatures. European human genetics conference 2011, May 28-31, Amsterdam, The Netherlands.
13. Kasnauskiene J, **Čiuladaitė Ž**, Preikšaitienė E, Hettinger J, Patsalis PC, Kučinskas V. *De novo* deletion 10p14 in patient with mental retardation, speech impairment and hypothyroidism. European human genetics conference 2011, May 28-31, Amsterdam, The Netherlands.



14. Kasnauskienė J, Čiuladaitė Ž, Alexandrou A, Koumbaris G, Patsalis PC, Kučinskas V. Chromosomal aberrations delineated by aCGH and RT-PCR in the families with mental retardation. The 60th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, 2010, Washington.

## II. TYRIMŲ APŽVALGA

Naujosioms technologijoms pažengus viso žmogaus genomo tyrimų srityje, pasikeitė mūsų supratimas apie žmogaus genomo variavimą (dinaminę struktūrą). Ypač viso žmogaus genomo tyrimas vLGH/VNP-LGH metodais, kuriais nustatomos plačiai visame genome paplitusios mikrodelecijos ir mikroduplicacijos (KSP), parodė, kad žmogaus genomo struktūra dar labiau kinta nei anksčiau manyta. Žmogaus genomo analizė atskleidė, kad yra bent 12000 KSP, kurie apima daugiau nei 1000 genų. Beveik 13 % žmogaus genomo sudaro KSP (Redon *et al.*, 2006).

Nustačius KSP, atsirado naujų galimybių tirti genetines ligas, nustatyti ligos genus. Per pastaruosius kelerius metus gauta daug žinių apie genetinę nervų sistemos vystymosi sutrikimų etiologiją ir patogenezę. Dabar žinoma, kad KSP yra dažniausia genetinė priežastis, lemianti keletą nervų sistemos vystymosi sutrikimų: INN, autizmą, šizofreniją, epilepsiją ir dėmesio trūkumą (Leonard H& Wen X, 2002). Viso genomo KSP tyrimai įrodė, kad retos delecijos ar duplicacijos gali būti susijusios su nervų sistemos vystymosi pažeidimu.

### 2.1 TECHNOLOGIJŲ PAŽANGA

Per pastaruosius 50 metų įdėta daug pastangų siekiant išsiaiškinti nervų sistemos vystymosi sutrikimų priežastis, sukurti naujus diagnostinius metodus bei sukurti ar pritaikyti gydymą. Nuo 1956 m. pradėjus taikyti citogenetinę analizę, nustatytos *Dawn*, *Terneri*, *Klainfelter*, *Patau* ir *Edwards* sindromų genetinės priežastys – chromosomų skaičiaus pokyčiai. 1959 m. nustatytas pirmasis chromosomų skaičiaus pokytis – 21-os chromosomos trisomija, lemiantis INN (Lejeune *et al.*, 1959). Tais pačiais metais pasirodė Ford *et al.*, Jacobs *et al.* pirmieji pranešimai apie lytinių chromosomų skaičiaus pokyčius (Ford *et al.*, 1959). 1960 m. Patau (Patau *et al.*, 1960) ir Edwards su kolegomis (Edwards *et al.*, 1960) atpažino sindromus, nulemtus atitinkamai 13 ir 18 chromosomų trisomijų. 1963 m. citogenetikai pastebėjo, kad struktūriniai chromosomų pokyčiai – chromosomų segmentų translokacijos ir delecijos –

gali lemti dauginių raidos defektų sindromus ir INN. Pirmasis aprašytas chromosomų struktūros pokytis – 5-os chromosomos trumpojo peties dalies delecija, lemianti *Cri du chat* sindromą (Lejeune *et al.*, 1963). Tai buvo ir pirmasis struktūrinis chromosominis persitvarkymas, aprašytas Lietuvoje (Kučinskas *et al.*, 1974).

Tikslesnė žmogaus chromosomų analizė prasidėjo nuo 1970 m., kai Caspersson su bendraautoriais sukūrė metodą žmogaus chromosomų ruožuotumui išgauti, jas dažant fluorescenciniais dažais (Caspersson *et al.*, 1970). Seabright (1972) pademonstravo, kad chromosomų ruožuotumas gali būti gaunamas veikiant tripsinu ir dažant Giemsa dažais (Seabright, 1972). Sparčiai tobulėjant diferenciniams chromosomų dažymo metodams, atsirado galimybė nustatyti didesnius nei 5–10 Mb dydžio chromosomų struktūros persitvarkymus – translokacijas, inversijas, delecijas, duplikacijas. Tokie citogenetiškai matomi chromosomų pokyčiai sudaro apie 10–15 % INN priežasčių (Ropers *et al.*, 2008).

Nuo 1980 m. genetinės diagnostikos galimybes praplėtė molekulinis citogenetinis fluorescentinės *in situ* hibridizacijos (FISH) metodas, kuriuo, naudojant įvairių tipų zondus, metafazinėse chromosomose ir interfaziniame branduolyje nustatoma specifinių DNR segmentų padėtis ir skaičius. Tačiau FISH tyrimas tikslingas tais atvejais, kai, remiantis paciento klinikiniais požymiais, įtariamas konkretus mikrodelecinis ar mikroduplikacinis sindromas arba kai kariotipe yra matomi pakitimai, kuriuos būtina patikslinti. Taigi, pritaikyti šį diagnostinį molekulinį citogenetinį metodą galima tik kliniškai įtariant konkretų genetinį sindromą. Tiriant tik konkretų chromosomos fragmentą, neaptinkami chromosominiai pakitimai kitose genomo srityse. INN diagnostikoje pradėjus taikyti subtelomerinį FISH ar sudėtinės nuo ligacijos priklausomų žymenų amplifikacijos (SŽLA) metodus, papildomai nustatoma 5 % INN priežasčių (6,3–10,2 % – esant sunkiai ar vidutinei INN ir < 1 % – lengvai INN) (Baroncini *et al.*, 2005). Tačiau ir šie du metodai apsiriboja tik specifinėmis chromosomų sritimis – subtelomerinėmis chromosomų dalimis.

Nuo 2004 m. pradėtas taikyti vLGH metodas sukėlė perversmą mokslo ir diagnostikos srityse. Naudojami įvairūs zondai, nuo dirbtinių bakterinių chromosomų (BACs, 80–200 kb) iki oligonukleotidų (25–80 bp). Klinikinėje praktikoje taikomi įvairūs genominiai lustai, skirti analizuoti visoms chromosomoms, chromosomų dalims, specifiniams regionams (pvz., telomeroms) ir visam genomui.

vLGH turi daug pranašumų, palyginti su tradicine citogenetine analize ir FISH. Šis tyrimas dėl didelės skiriamosios gebos gali suteikti labai išsamios informacijos, yra jautrus. vLGH metodu vieno eksperimento metu galima nustatyti bet kurios genetinės srities segmentinį nesubalansuotumą (aneuploidiją, deleciją, duplikaciją). Be to, oligonukleotidiniais vektoriais vieno nukleotido polimorfizmo (VNP) pagrindu galima nustatyti vieno nukleotido pokyčius, mažus DNR kopijų skaičiaus pokyčius (kelių kb), heterogeniškumo praradimą, vientėvę disomiją ir didelius DNR kopijų pokyčius (iki visos chromosomos aneupoidijos). vLGH metodas yra efektyviausias iš visų iki šiol citogenetikoje taikytų metodų nesubalansuotiems chromosominiams pokyčiams nustatyti.

vLGH trūkumas tas, kad, skirtingai nuo tradicinio kariotipavimo, šiuo metodu negalima nustatyti subalansuotų chromosomų persitvarkymų, tokių kaip reciprokinės translokacijos, robertsoninės translokacijos ir inversijos. Vidutiniškai 6 % gimusiųjų, kuriems nustatyti subalansuoti chromosomų struktūros persitvarkymai, pasireiškia raidos atsilikimas ar raidos defektai. Manoma, kad šiais atvejais kliniškai reikšmingas gali būti ties chromosominių trūkių sritimi esančio geno sekos nutraukimas, translokuoto fragmento (genų) vietos pasikeitimas arba labai mažos, mikroskopiškai nematomos delecijos ar duplikacijos (Gijsbers *et al.*, 2009). Danų tyrėjų duomenimis, tik apie 0,78 % potencialiai patogeninių subalansuotų persitvarkymų liks neaptikta vLGH metodu, neatliekant tradicinio kariotipavimo (Hochstenbach *et al.*, 2009).

Hochstenbach *et al.* (2009) siekdami įvertinti chromosomų analizės metodų diagnostinę naudą neaiškios kilmės raidos atsilikimo (RA)/INN atvejais, palygino klasikinio kariotipavimo tyrimų (n=36325), atliktų 1999–

2006 m. Olandijoje, diagnostinį efektyvumą ir subtelomerinio FISH bei vLGH tyrimų diagnostinę naudą. Subtelomerinio FISH ir vLGH tyrimų diagnostinis efektyvumas įvertintas atlikus šių tyrimų metaanalizę. Klasikinio kariotipavimo metodu ~3,8 % tiriamųjų su neaiškios kilmės RA/INN nustatyti nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai, kurie būtų nustatyti ir vLGH metodu. Subtelomerinio FISH tyrimo diagnostinis efektyvumas varijuoja nuo 2,4 % iki 5,1 % priklausomai nuo pacientų atrankos kriterijų (vidutiniškai 2,9 %). vLGH metodo 12,3 % diagnostinis efektyvumas apskaičiuotas remiantis *PubMed* duomenų bazėje skelbiamų 29 vLGH studijų, kuriose buvo tiriami asmenys su RA/INN, ir normaliais klasikiniu kariotipo tyrimo, ir subtelomerinio FISH tyrimo rezultatais. Hochstenbach *et al.* (2009) įrodė, kad vLGH metodas yra efektyviausias ieškant chromosomų struktūros pokyčių, kurie sudaro 2/3 INN genetinių priežasčių. vLGH metodo diagnostinis efektyvumas galėtų siekti 19,8 %, jeigu pacientai, turintys neaiškios kilmės RA/INN, būtų tiriami pirmiausia vLGH metodu. Šiuo metodu būtų nustatomi nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai, tarp jų ir tie, kurie nustatomi taikant rutininius citogenetinius metodus – rutininį kariotipo tyrimą bei subtelomerinį FISH tyrimą.

Miller *et al.* (2010) pasiūlė vLGH tyrimą kaip pirmaeilį neaiškios kilmės INN, RA, autizmo ir dauginių įgimtų defektų atveju. Rutininis kariotipavimas G dažymo metodu turėtų būti atliekamas tik pacientams su aiškiu chromosominiu sindromu (pvz., *Down* sindromu) bei tais atvejais, kai šeimoje yra buvę chromosominių persitvarkymų arba pasikartojančių savaiminių persileidimų.

## **2.2. KSP PAPLITIMAS ŽMOGAUS GENOME**

DNR sekų kopijų skaičiaus pokyčiai (KSP) – delecijos, duplikacijos ar insercijos, kurių dydis varijuoja nuo 1 kb iki kelių megabazių dydžio, – yra pagrindinis žmogaus genetinės ir fenotipinės įvairovės šaltinis. KSP lemia ne tik kliniškai nereikšmingų požymių varijavimą, bet ir ligas. Pagal tai skiriami du KSP fenotipo asociacijos modeliai.

Pirmasis modelis – dažni kliniškai nereikšmingi KSP. Šie KSP dažniausiai apima genus, kurių biologinė funkcija susijusi su atsparumu vaistams, imunitetu, sensoriniu suvokimu. Pagal šį modelį dažni KSP, kurie pakeičia genų dozę, lemia atsparumą ŽIV (Gonzalez *et al.* 2005), Krono ligai (Fellermann *et al.* 2006), glomerulonefritui sisteminės vilkligės atveju (Aitman *et al.* 2006).

Antrasis modelis – reti, paprastai didesni KSP. Retiems KSP būdingas didelis penetrantiškumas bei trumpalaikis egzistavimas populiacijoje. Paprastai jie vyksta *de novo* arba išlieka tik keliose kartose. Dauguma retų KSP lemia genetinius sutrikimus. Šiuo metu yra žinoma daugybė kliniškai atpažįstamų sindromų, susijusių su kognityvinių funkcijų sutrikimu, cukriniu diabetu, epilepsija ir kitais sutrikimais.

2004 m. atsiradus viso genomo analizės įrankiams, kuriais galima gauti informaciją apie genomo struktūrą, buvo parodyta, kad KSP yra plačiai paplitę sveiko žmogaus genome ir yra pagrindinis genetinės variacijos šaltinis (Iafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004). Sebat *et al.* (2004), naudodamas genominių lūstą su 85000 oligonukleotidinių žymenų, išdėstytų vidutiniškai kas 35 kb, nustatė didesnius nei 100 kb dydžio KSP. Tokios skiriamosios gebos genominiu lūstu 20 sveikų asmenų grupėje buvo nustatyti 221 KSP, kurie sudarė 76 KSP regionus. Iafrate *et al.* (2004), naudodamas genominių lūstą, kurio skiriamoji geba ~1 Mb, 55 nesusijusių asmenų grupėje nustatė 255 KSP. 102 (41 %) KSP buvo nustatyti daugiau nei vienam individui, vadinasi, jie iš tiesų nėra reti, o yra polimorfiniai variantai. Atlikus bioinformacinę šių KSP analizę paaiškėjo, kad šie genomo regionai apima genus, susijusius su ląstelės augimo ir metabolizmo reguliavimu.

KSP tyrimai parodė žymiai didesnę žmogaus genomo variaciją, nei iki tol buvo manyta. Skirtingų didelės skiriamosios gebos genominių lūstų sukūrimas ir taikymas žmogaus genomo tyrimams padėjo geriau suprasti KSP biologinę reikšmę, įvertinti KSP paplitimą žmogaus genome.

Redon *et al.* (2006) sukonstravo pirmąjį žmogaus genomo KSP genolapį atlikę 500K VNP-LGH ir BAC-LGH tyrimus. 270 sveikų asmenų grupėje nustatė 1447 KSP regionus, beveik pusė jų buvo dažni.

Plataus masto KSP studijų rezultatai skelbiami *DGV* duomenų bazėje (*Database of Genomic Variants*). Šioje duombazėje esantys KSP sudaro 29,7 % žmogaus genomo (<http://projects.tcag.ca/variation>, atnaujinta 2012). Tačiau KSP dalis žmogaus genome gali būti pervertinta, nes pirmųjų KSP studijų metu buvo naudojamos mažos skiriamosios gebos mikrolustai (pvz., BAC mikrolustai), dėl to KSP dydis dažnai nustatytas didesnis, nei iš tiesų yra. Tai įrodo pakartotiniai LGH tyrimai, atlikti taikant didesnės skiriamosios gebos mikrolustus. Perry *et al.* (2008), naudodamas labai didelės skiriamosios gebos (~1 kb) mikrolustą, pakartotinai atliko molekulinį kariotipavimą 30 asmenų, kuriems anksčiau buvo nustatyti 2191 KSP. Patvirtinti buvo tik 1153 KSP regionai (52,6 %), 1020 (88 %) iš jų buvo mažesni, nei anksčiau manyta. McCarroll *et al.* (2010), pakartotinai tirdamas asmenis ir naudodamas didesnės skiriamosios gebos mikrolustus, taip pat pastebėjo, kad dauguma KSP yra mažesni. Vadinasi, dideli KSP gali būti mažesni, negu anksčiau teigta, ir galbūt užima tik 5 % žmogaus genomo.

### **2.3. RETŲ KSP ĮTAKA NERVŲ SISTEMOS VYSTYMUISI IR FUNKCIONAVIMUI**

KSP tyrinėjami įvairiose nervų sistemos vystymosi sutrikimų grupėse: INN (Sharp *et al.* 2006), autismo (Sebat *et al.* 2007, Marshall *et al.* 2008), shizofrenijos (International Schizophrenia consortium, 2008, Walsh *et al.* 2008), epilepsijos (Striano *et al.* 2012), dėmesio trūkumo hiperaktyvumo sutrikimų (Williams *et al.* 2010). Remiantis ankstesnių studijų rezultatais, reti KSP yra dažniau nustatomi sergančiųjų grupėje nei kontrolėje, nepriklausomai nuo sutrikimo tipo. Pastebėta, kad reti *de novo* kilmės (arba segreguojantys su liga šeimoje) KSP lemia didesnę dalį INN atvejų, gali būti bet kurioje genomo vietoje ir įvairuoja dydžiu. Asmenų, turinčių INN, grupėje nustatytiems retiems KSP būdingas didesnis genų, siejamų su specifiniais CNS fenotipais, skaičius nei kontrolinėje grupėje nustatytiems retiems KSP (Sharp *et al.*, 2006; Sebat *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2008).

## 2.4. KSP VERTINIMAS/INTERPRETAVIMAS. PAGRINDINIAI KRITERIJAI. PROBLEMOS.

Pasirinkus didelės skiriamosios gebos mikrolustus LGH tyrimui, galima nustatyti smulkius, netgi mažesnius nei 100 kb dydžio KSP. Naudojant didelės skiriamosios gebos mikrolustus, dažnai susiduriama su smulkių (< 100 kb) chromosominių struktūrinių pokyčių interpretavimo – klinikinės reikšmės vertinimo, problema. Ypač sunku vertinti mikroduplicacijas. Paprastai mikroduplicacijos lemia švelnesnę arba labiau varijuojantį klinikinį fenotipą nei tos pačios srities mikrodelecija. Pavyzdžiui, dup22q11.2 (Wentzel *et al.*, 2008).

Vertinant KSP, atsižvelgiama į pokyčio dydį, tipą, kilmę, persidengimą su žinomais sindromais bei persidengimą su sveikųjų populiacijai būdingais KSP. Literatūroje aprašyta keletas KSP interpretavimo principų. Skirtingi tyrėjai pasirenka skirtingus pagrindinius kriterijus.

Koolen *et al.* (2009) vertino KSP atsižvelgdamas į pokyčio kilmę. Jis teigė, kad paveldėti pokyčiai dažniausiai yra kliniškai nereikšmingi. Tačiau yra žinoma kliniškai reikšmingų arba galimai kliniškai reikšmingų iš sveikų tėvų paveldėtų delecijų/duplicacijų atvejų. Patogeniškumą gali lemti kiti papildomi veiksniai, pavyzdžiui, mutacija kitame alelyje, lemianti recesyvią būklę, mozaikiškumas, imprintingas ar kito neaiškios klinikinės reikšmės KSP buvimas.

Gijsbers *et al.* (2009) pasirinko kitą KSP vertinimo strategiją. KSP, persidengiantys su žinomais sindromais, buvo priskiriami kliniškai reikšmingiems pokyčiams neatsižvelgiant į kilmę – *de novo* ar paveldėta. Kitus, galimai patogeninius KSP vertino pagal kilmę. Paveldėti, nepersidengiantys su žinomais sindromais KSP buvo interpretuojami kaip kliniškai nereikšmingi polimorfiniai variantai.

Panašią KSP vertinimo strategiją naudojo Buysse *et al.* (2009). Pirmiausia KSP, sutampantys su žinomais mikrodeleciniais/mikroduplicaciniais sindromais ar su žinoma sritimi, kurios delecija ar duplicacija siejama su RA, priskiriami kliniškai reikšmingiems KSP. Antrajame etape atrenkami dažni KSP, kurie vertinami kaip kliniškai nereikšmingi. Kitų galimai kliniškai



reikšmingų KSP patogeniškumą vertino pagal kilmę – *de novo* pokyčius priskyrė kliniškai reikšmingiems, paveldėtus – nereikšmingiems.

Bruno *et al.* (2009) vertino KSP remdamasis Lee *et al.* (2007a) rekomendacijomis. Patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai dažniau būna: *de novo* kilmės, nepersidengiantys su polimorfiniais regionais (esančiais duomenų bazėje *Database of Genomic Variants*, <http://projects.tcag.ca/variation>), persidengiantys su žinomais ligą lemiančiais chromosominiais pokyčiais (pateiktais *DECIPHER* arba *ECARUCA* duomenų bazėse: <http://decipher.sanger.ac.uk>, [www.ecaruca.net](http://www.ecaruca.net)), apimantys ligos genus (aprašytus *OMIM* duomenų bazėje, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Be to, jie teigė, kad delecijų patogeniškumas yra didesnis nei duplikacijų, o didesni pokyčiai, tikėtina, yra labiau patogeniniai nei mažesni.

Ypač sudėtingas retų, iki tol neskelbtų struktūrinių variantų – delecijų/duplikacijų – interpretavimas. Reta delecija/duplikacija gali būti kliniškai reikšminga, tiesiogiai susijusi su tirama liga, gali būti rizikos veiksnys, t. y. lemti polinkį sirgti tam tikra liga, arba gali būti tik retas polimorfinis variantas, nesusijęs su tirama liga. Paprastai manoma, kad *de novo* pokyčiai dažniau būna patogeniniai, tačiau šis teiginys tinka tik stambiams chromosomų struktūros pokyčiams, kurie nustatomi rutininiais citogenetiniais metodais. Smulkių (< 500 kb) *de novo* delecijų ir duplikacijų patogeniškumas turėtų būti svarstomas, nes smulkių KSP mutavimo dažnis yra gana didelis. Segmentinės delecijos ir duplikacijos susiformuoja atitinkamai 1 iš 8 naujagimių ir 1 iš 50 naujagimių. Dauguma šių KSP yra kliniškai nereikšmingi polimorfiniai variantai. *De novo* kilmė nėra pagrindinis kriterijus, lemiantis KSP patogeniškumą. Todėl, vertinant retų KSP klinikinę reikšmę, svarbu nustatytus KSP palyginti su KSP, būdingais kontrolinei grupei.

Taip pat svarbu įvertinti genų, įtrauktų į pokytį, funkciją ir raišką. Stipriausi genai kandidatai, kurių dozės perteklius ar haplonepakankamumas lemia INN patogenezę, yra genai, dalyvaujantys nervų sistemos raidoje, embriogenezėje ar kitose CNS funkcijose. Vertinant nustatytą pokytį, svarbu atsižvelgti į delecijos ar duplikacijos dydį. Kuo didesnis pokytis, tuo didesnė

tikimybė, kad jis bus patogeninis. Visų pirma tai susiję su tuo, kad didesnė tikimybė, jog didesnis pokytis apima daugiau genų, todėl esant didesnei imčiai gali būti daugiau dozei jautrių signaliniame ar raidos procese dalyvaujančių produktų. Nustatyta, kad genetinės informacijos praradimas daugiau nei 2 % genomo nesuderinamas su gyvybe. Duplikacijų pasekmės dažniausiai būna ne tokios reikšmingos kaip delecijų. Nepaisant to, yra atvejų, kai padvigubėjus tam tikrų chromosomų fragmentų, sutrinka normali CNS veikla. Aprašyta keli šimtai mikrodublikacinių sindromų, kurių vienas iš klinikinių pasireiškimų būdų – INN ar RA.

Tos pačios genetinės srities kiekybiniai pokyčiai, nepriklausomai nuo to, ar tai delecija, ar duplikacija, dažniausiai lemia tų pačių organų sistemų pažeidimą, kartais – panašų klinikinį vaizdą, pavyzdžiui, 17p11.2 genetinės srities delecija arba duplikacija lemia *Smith-Magenis/Potocki-Lupski* sindromą. Tačiau taip pat galimas ir skirtingas klinikinis pasireiškimas, kaip kad esant 17p12 genetinės srities, apimančios *PMP22* geną, kiekybiniams pokyčiams: šios srities duplikacija lemia *Charcot-Marie-Tooth* ligą, o delecija – įgimtą neuropatiją su labiliu pulso spaudimu; ar net priešingą fenotipą, pavyzdžiui, *Sotos* sindromą, kuriam būdingas hiperaugimas, lemia *NSD1* geno haplonepakankamumas dėl geno funkciją inaktyvuojančių mutacijų arba 5q35 genetinės srities delecijos, o tos pačios srities duplikacija kliniškai pasireiškia augimo atsilikimu, mikrocefalija bei INN.

KSP patogeniškumą gali lemti keletas skirtingų mechanizmų – geno/genų dozės pokytis, pozicijos efektas, recesyvi būklė, reguliacinių elementų ar koduojančios DNR sekos nutraukimas. Tačiau poveikis fenotipui labiausiai priklauso nuo to, ar pokytis apima dozei jautrius genus. Manoma, kad dozei jautrūs genai sudaro 5–10 % visų genų (Cody&Hale, 2011). Pavyzdžiui, *Smith-Magenis* sindromą dažniausiai lemiančioje delecijoje yra 52 genai, tačiau iš jų vienintelis *RAI1* genas yra atsakingas už 21 iš 30 sindromui būdingų klinikinių požymių. Vadinasi, specifinį sindromui fenotipą tikriausiai lemia tik 3 ar 4 iš 52 (~6 %) dozei jautrūs genai (Girirajan *et al.*, 2006). Taigi, dozei jautrių genų

nustatymas yra svarbus pereinant nuo citogenetinio iki molekulinio chromosominės aberacijos supratimo.

## **2.5. KSP FORMAVIMOSI MECHANIZMAI**

Kiekybinius chromosomų struktūros pokyčius – delecijas ar duplikacijas – lemia rekombinaciniai arba replikaciniai mechanizmai (Stankiewicz&Lupski, 2010).

### **2.5.1. Rekombinaciniai mechanizmai**

Vykstant rekombinacijai gali pakisti genetinės medžiagos kopijų skaičius. Rekombinaciniai mechanizmai, kurių metu pakinta DNR kopijų skaičius, yra nealelinė homologinė rekombinacija (NAHR), trūkio sukelta replikacija, viengrandžių galų susijungimas ir transpozicija (Chen *et al.*, 2010). Šios rekombinacijos vyksta tam tikru ląstelės ciklo metu pagal joms būdingus mechanizmus, kurių pasekmė – struktūriniai genomo pokyčiai: delecijos, duplikacijos, inversijos ar translokacijos.

Rekombinacijai įvykti reikalingi trūkiai, kurie atsiranda ne atsitiktinai, o tam tikrose genomo srityse – karštuosiuose taškuose. NAHR dažniausiai lemia trūkiai kartotinėje, o ne unikaloje sekoje (Sasaki *et al.*, 2010). Kartotinės sekos žmogaus genome, tarp kurių gali vykti NAHR, yra judrieji elementai, tokie kaip *Alu*, ilgi disperguoti elementai (angl. *long interspersed element*, *LINE*), ar mažo dažnio pasikartojimai (angl. *low-copy repeats*, *LCR*) (Stankiewicz&Lupski, 2002).

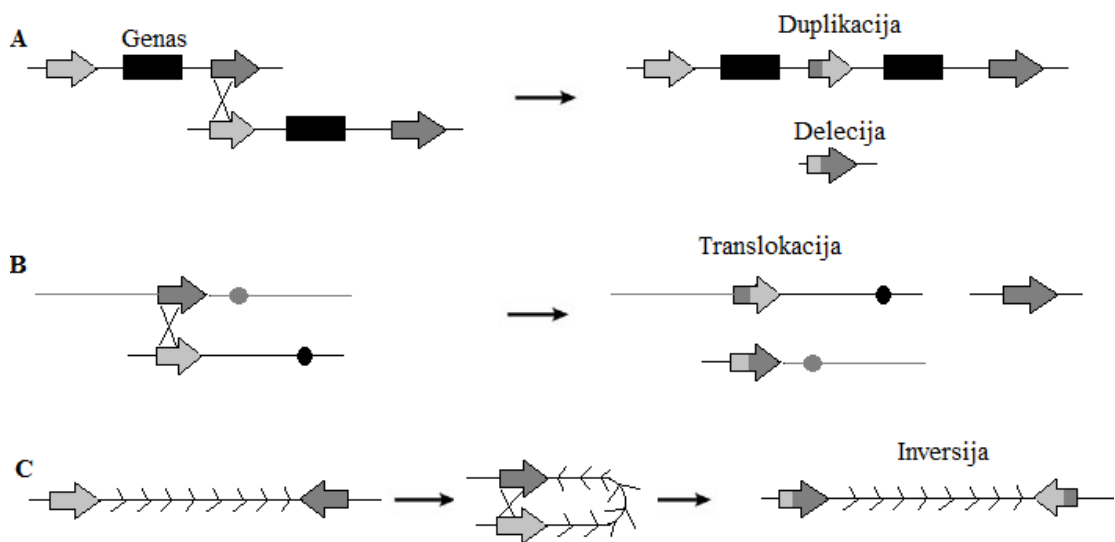
LCR, kitaip vadinami segmentinėmis duplikacijomis, yra DNR segmentai, pasikartojantys daugiau nei 2 kartus haploidiniame genome, ilgesni nei 1 kb (gali būti ilgesni nei 300 kb), kurių tarpusavio panašumas yra didesnis nei 95 % (Bailey *et al.*, 2006; Stankiewicz&Lupski, 2002). Jos dažniausiai randamos pericentromeriniuose ir subtelomeriniuose regionuose ir sudaro ~5 % viso žmogaus genomo (Emanuel&Saitta, 2007). *LCR* sekos gali apimti genus, jų fragmentus, pseudogenus, endogenines retrovirusų sekas, paraloginius fragmentus (Stankiewicz&Lupski, 2002). Pasikartojimai, apimantys *Alu* sekas, *LINE*, retrotranspozonus ar satelitinę DNR, priklauso didelio dažnio

pasikartojimams (angl. *highly repetitive sequences*) ir genome pasitaiko dažniau nei *LCR* (Stankiewicz&Lupski, 2002). Vykstant NAHR tarp *LCR*, trūkiausiai atsiranda jų viduje – taip visame genome susidaro pasikartojantys trūkių taškai (klasteriai). NAHR vykstant tarp judriųjų genomo elementų – *Alu-Alu* lemiamai rekombinacijai – trūkiausiai atsiranda 28 bp ilgio pasikartojančiose sekose (Zhang *et al.*, 2009a), dėl to gali susidaryti *LCR* ir KSP (*Alu* sekos yra netiesiogiai atsakingos už KSP susidarymą) (Shaw&Lupski, 2004).

### **2.5.1.1. Nealelinė homologinė rekombinacija**

Homologinė rekombinacija (HR) – gyvybiškai svarbus procesas, reikalingas užtikrinti tinkamam chromosomų pasiskirstymui ląstelės dalijimosi metu, pataisyti dvigrandžiams trūkiams (DGT) ar atstatyti sugriuvusioms replikacinėms šakutėms (angl. *collapsed/broken replication fork*) (Heyer *et al.*, 2010).

Homologinei rekombinacijai įvykti reikalingos ~200–300 bp ilgio, didelio panašumo sekos ir dalyvavimas Rad51 baltymo, kuris katalizuoja viengrandės DNR grandinės 3' galo įsiterpimą į dvigubą grandinę (Heyer *et al.*, 2010). HR yra tikslus klaidų taisymo mechanizmas, tačiau gali lemti ir struktūrinius genomo persitvarkymus. *LCRs*, kuriems būdingas didesnis nei 97 % sekų panašumas ir kurie vienas nuo kito nutolę mažesniu nei 10 Mb atstumu, yra substratai NAHR, kurios metu dėl netolygaus krosingoverio gali susidaryti įvairių struktūrinių persitvarkymų (Sasaki *et al.*, 2010). NAHR pasekmės gali būti įvairios, priklausomai nuo *LCRs* krypties ir padėties (2.1 pav.). Rekombinacija tarp tos pačios krypties *LCRs*, esančių toje pačioje chromosomoje, lemia delecijas ir/arba duplikacijas. Inversijos susidaro vykstant viduchromatidinei rekombinacijai tarp invertuotų sekų. NAHR tarp invertuotų, skirtingose chromosomose esančių sekų lemia izodicentriinių chromosomų susidarymą. Vykstant rekombinacijai tarp skirtingose chromosomose esančių *LCRs*, susidaro translokacijos (Sasaki *et al.*, 2010).



2.1 paveikslas. NAHR mechanizmo schema. A. Rekombinacija tarp tos pačios krypties LCRs, esančių toje pačioje chromosomoje, lemia delecijas ir/arba duplikacijas. B. Vykstant rekombinacijai tarp skirtingose chromosomose esančių *LCRs*, susidaro translokacijos C. Vykstant viduchromatidinei rekombinacijai tarp invertuotų sekų susidaro inversijos.

NAHR metu susidarę genetinės medžiagos pokyčiai lemia bent 30 genetinių sutrikimų (Sasaki *et al.*, 2010). Dėl NAHR galėjo susiformuoti Y chromosomos palindrominės sekos, kurios turi įtakos lytinių chromosomų aneuploidijai (Lange *et al.*, 2009). NAHR vyksta ne tik mejozės metu, susidarant nereikšmingiems polimorfizmams ar kliniškai svarbiems persitvarkymams, bet ir mitozės metu. Todėl prarandamas heterozigotiškumas ar susidaro somatinė mozaika (Zhang *et al.*, 2009a). Kad būtų išlaikytas heterozigotiškumas, kaip atsvara mitozinei NAHR, gali vykti nuo sintezės priklausomas DNR grandinių susijungimas (angl. *synthesis-dependent strand annealing*), kurio rezultatas būtų genų konversija. Naujagimių genome, lyginant su suaugusiais individais, nustatyta mažiau NAHR produktų; tai rodo, kaip intensyviai vyksta mitozinė NAHR (Flores *et al.*, 2007).

Remiantis NAHR mechanizmo schema, prognozuojama, kad pagal šį mechanizmą susidariusios delecijos gali turėti reciprokinę – atitinkamą tos pačios srities, duplikaciją. Teoriškai kiekviena NAHR nulemta mikrodelecija turėtų turėti reciprokinę duplikaciją su panašia arba priešinga klinika. Pvz., reciprokinės 22q11.23 regiono delecijos/duplikacijos lemia *DiGeorge* sindromą

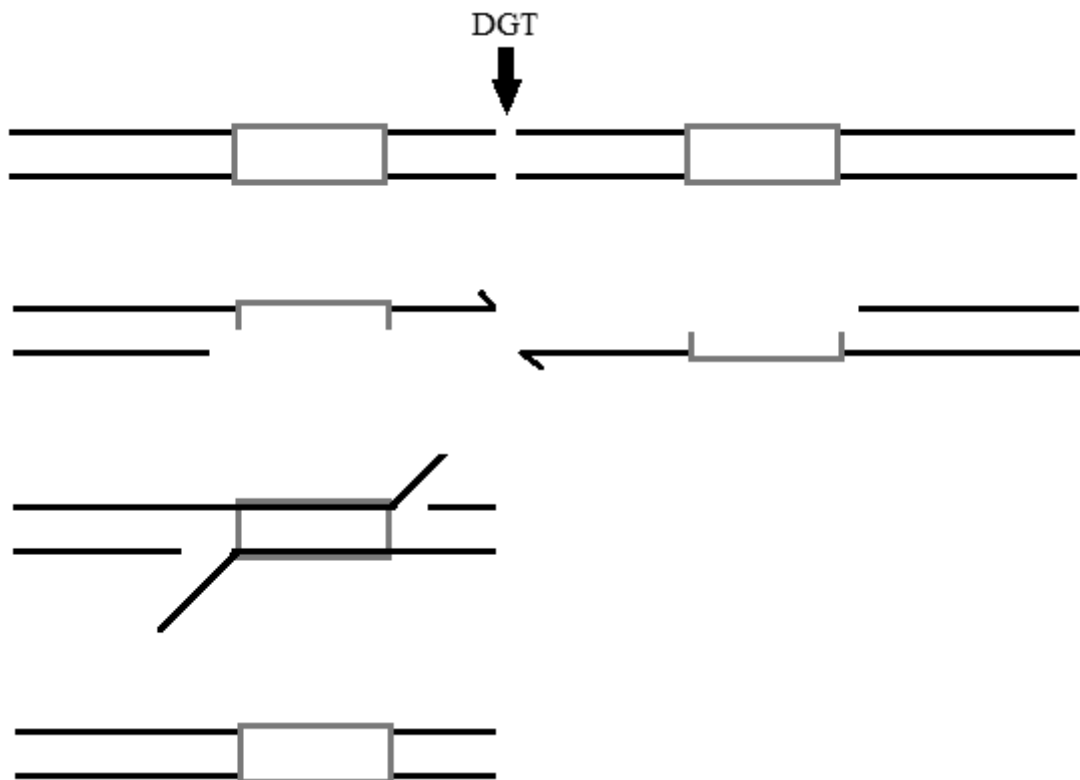
(Ensenauer *et al.*, 2003), *Potoski-Lupski* sindromo genetinė priežastis yra reciprokinė duplikacija *Smith-Magenis* sindromą lemiančiai 17p11.2 regiono delecijai (Ricard *et al.*, 2010). Tačiau viduchromosominė NAHR gali lemti tik delecijas, todėl delecijų ir duplikacijų dažnis nėra vienodas – delecijų dažnis didesnis.

Žinios apie NAHR, kaip KSP formavimosi mechanizmą, buvo sėkmingai pritaikytos naujiems genetiniams sutrikimams išaiškinti. Remiantis 22q11.2 regiono architektūrinėmis savybėmis, buvo pasiūlyti papildomi *LCRs*, esantys toliau nuo karštųjų *DiGeorge* sindromui taškų. Dėl to buvo nustatyta NAHR tarp *LCR22-4*, -5 ir -6, lemianti skirtingą kliniką – 22q11.2 distalinės delecijos sindromą (Ben-Shachar *et al.*, 2008). Sharp *et al.* (2006) pasirinko šią prognostinę metodologiją kitame lygyje. Jie kartografavo 130 galimų karštųjų rekombinacijos taškų visame žmogaus genome siekdami nustatyti suporuotus ilgesnius nei 10 kb *LCRs* su > 95 % sekų panašumu, tarp kurių yra įsiterpusios 10–50 kb ilgio sekos (Sharp *et al.*, 2006). Naudodami BAC lustą, patikrino kiekvieną iš 130 NAHR kandidatinių lokusų tirdami 290 asmenų su neaiškios kilmės INN ir nustatė naujas delecijas 17q31.31, 1q21.1, 15q13 ir 15q24 regionuose (Sharp *et al.*, 2006).

#### **2.5.1.2. Viengrandžių galų susijungimas**

Viengrandžių galų susijungimas (angl. *single-strand annealing, SSA*) vyksta, kai dvigrandis trūkis atsiranda tarp viena kryptimi pasikartojančių sekų (2.2 pav.) (Hedges&Deininger, 2007). Jeigu DGT iš abiejų pusių supa homologiškos sekos, tai toks chromosomos trūkis gali būti efektyviai pašalintas susijungus viengrandžiams chromosomų galams. Tačiau šiuo atveju prarandama viena iš homologiškų sekų. SSA metu nevyksta įsiterpimas prie homologinės sekos – 5' galai yra nuardomi egzonukleazės paliekant viengrandžius 3', jei tarp galų yra komplementarios sekos, jos susijungia, tada nuardomi po susijungimo likę nekomplementarūs 3' galai ir sulygiuojama (Hastings *et al.*, 2009a). SSA mechanizmui nereikalinga seserinė chromatidė, todėl jis gali būti naudojamas pažaidoms taisyti viso ląstelės ciklo metu

(Hedges&Deininger, 2007). Šis susijungimo mechanizmas lemia delecijas, nes sekos, esančios tarp homologinių sekų, ir viena kartotinė seka yra prarandamos. SSA gali būti teikiama pirmenybė prieš kitus rekombinacinius reparacijos mechanizmus, kad nevyktų krosingoveris, nors nežinoma, kodėl vietoje jo nenaudojamas nehomologiškas galų susijungimas, kurio metu būtų prarandama mažiau genetinės medžiagos (Hedges&Deininger, 2007). Nors SSA sukelti pokyčiai būna minimalūs, tačiau, jei nuardoma ilga 5' seka, gali susidaryti ir didesnių struktūrinių persitvarkymų (Hedges&Deininger, 2007).



2.2 paveikslas. Viengrandžių galų susijungimo (SSA) modelis. Dvigrandžiui trūkiui įvykus tarp viena kryptimi pasikartojančių sekų (pilki stačiakampiai), egzozonukleazė nuardo 5' galus, paliekami viengrandžiai 3' galai. Jei tarp galų yra komplementarios sekos, jos susijungia, tada nuardomi po susijungimo likę nekomplementarūs 3' galai ir sulygiuojama.

## 2.5.2. Replikaciniai mechanizmai

### 2.5.2.1. MMBIR/FoSTeS

Išanalizavus duplikacijas X chromosomoje, lemiančias Pelizaeus-Merzbacher ligą, buvo paskelbtas hipotetinis mechanizmo modelis FoSTeS (angl. *fork stalling template switching*) (Lee *et al.*, 2007b). FoSTeS modeliui

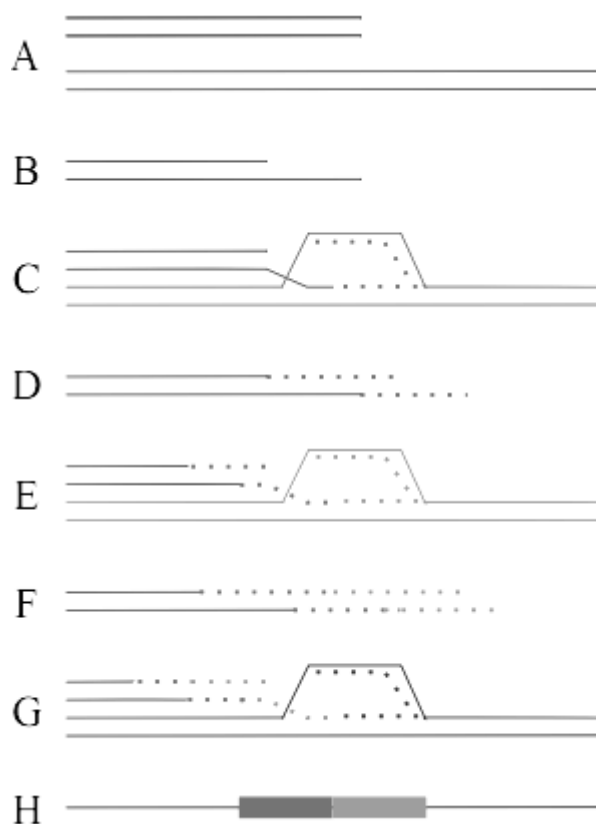
buvo būdinga tai, kad, ties DNR grandinės pažeidimu sugriuvus replikacinei šakutei (angl. *collapsed/broken replication fork*), sintetinama dukterinė grandinė disocijuoja nuo savo replisomos, jungiasi prie kitos replikacinės šakutės ir atkuriamą replikaciją, kurios gale susidaro genetinės medžiagos pokytis (Lee *et al.*, 2007b). Vėliau *FoSTeS* mechanizmo modelis buvo apibūdintas kaip mikrohomologijos lemiamas, trūkio sukeltas replikacinis (angl. *microhomology-mediated break-induced replication, MMBIR*) mechanizmas, kurio metu dėl homologijos, keičiant motininę grandinę, susidaro struktūriniai persitvarkymai su nepasikartojančiais galais (Zhang *et al.*, 2009a)(2.3 pav.).

MMBIR yra trūkio sukeltas, replikacija (angl. *break-induced replication, BIR*) paremtas mechanizmas. Replikacinės šakutės griūtį gali lemti: viengrandžiai trūkiai, DNR aduktai, nukleoproteinų kompleksai, nesuderintas nukleosomų išsidėstymas ir antrinės DNR struktūros (Hastings *et al.*, 2009a). Griūvant replikacinei šakutei, susidaro vienas dvigrandis trūkis. Ištaisyti trūkiui ir atkurti replikacijai naudojama *BIR*, kurios metu 5' galas yra nuardomas egzozonukleazės, 3' galas priartėja prie homologinės sekos, susidaro heterodupleksas, vyksta DNR grandinės sintezė, kurios metu gali kartotis prisijungimo ir atsiskyrimo ciklai. *MMBIR* mechanizmas naudojamas atkurti replikacijai tada, kai nepakanka baltymo (dėl atsako į stresą), kuris būtinas *BIR* (Hastings *et al.*, 2009a). Kadangi be atitinkamų baltymų jungimasis prie homologiškos sekos negalimas, *MMBIR* metu 3' galas prisijungia prie mikrohomologiškos viengrandės sekos. Tokios viengrandės sekos gali susidaryti ties replikacinėmis šakutėmis, eksizijos reparacijos vietose ar ties antrinėmis DNR struktūromis (Hastings *et al.*, 2009b). Ne B konformacijos DNR struktūrų dažnai randama prie KSP trūkių taškų, nes galbūt irgi lemia jų susidarymą (Conrad *et al.*, 2010).

*MMBIR* mechanizmas gali būti atsakingas už įvairius genomo struktūros persitvarkymus. Jo metu 3' galui prisijungus prie sekos už natyvios replisomos vietos susidaro duplikacija, o prieš ją – delecija. Prisijungimas galimas abiem kryptimis, todėl gali susidaryti inversija, o jei prisijungiama prie kitos chromosomos – translokacija (Zhang *et al.*, 2009b). *MMBIR* metu taip pat gali



susidaryti LCR, kurie yra substratai nealelinei homologinei rekombinacijai (NAHR), taip sudėtingi genomo regionai evoliucijos metu tampa vis sudėtingesni (Hastings *et al.*, 2009b). Tikėtina, kad kai kurie mikrohomologiškų jungčių persitvarkymai, kurie, kaip buvo manoma, sukelti nehomologiško galų susijungimo, iš tikrųjų yra susidarę vieno ciklo *MMBIR*. Lieka neatsakyta, ar mutacijos, polimorfizmai tose genomo srityse, kurios koduoja baltymus, dalyvaujančius DNR replikacijos procese, gali lemti dažnesnę replikacinės šakutės griūtį, kodėl tam tikriems individams būdinga didesnė *MMBIR* pasireiškimo tikimybė (Gu *et al.*, 2008).



2.3 paveikslas. Mikrohomologijos lemiamos, trūkio sukeltos replikacijos modelis. A. Griuvus replikacinei šakutei, susidaro vienas dvigrandis trūkis; B. Nuardomas 5' galas; C. Viengrandis 3' galas jungiasi prie mikrohomologiškos sekos, susiformuoja D-kilpa ir vyksta DNR sintezė; D. Dėl per mažo DNR polimerazės procesyvumo sintetinamas galas atsiskiria; E-F. Pakartotinai vyksta jungimasis, sintezės ir atsiskyrimai; G. Po kelių ciklų prisijungiama prie natyvios sekos, ir, jei DNR polimerazės procesyvumas pakankamas, sintezė vyksta iki galo.

### 2.5.2.2. Replikacijos nuslydimas

Replikacijos nuslydimas (angl. *replication slippage*, *RS*) modeliu galima paaiškinti vienetines delecijas ir tandemines duplikacijas, kurių gali atsirasti kryptingų pasikartojimų replikacijos metu (2.4 pav.)(Chen *et al.*, 2005a). Replikacijos metu susintetinus vieną pasikartojimą, sintetamos grandinės 3' galas gali disocijuoti ir prisikabinti prie tos pačios matricinės grandinės kito pasikartojimo (Chen *et al.*, 2005b). Tokį perėjimą gali lemti motininės grandinės antrinės struktūros (invertuotos sekos, kurios randamos tarp dviejų kryptingų pasikartojimų, gali sudaryti smeigtuko galvutės struktūrą ir taip sumažinti atstumą tarp pasikartojimų arba sutrikdyti polimerazės eigą) (Chen *et al.*, 2005b). Prisijungus prie matricos sintezė vyksta normaliai, ir priklausomai nuo to, ar buvo sugrįžta prie buvusio pasikartojimo, ar pereita prie būsimo, atitinkamai įvyks duplikacija arba delecija. *RS* gali pasikartoti kelis kartus iš eilės (serijinis), taip susidarytų didesni kiekybiniai persitvarkymai (Chen *et al.*, 2005b). *RS* atsiradimui įtakos turi pasikartojančių elementų ilgis (koreliacija yra neigiama) ir pasikartojimų skaičius (koreliacija teigiama). Kuo trumpesnis pasikartojantis elementas ir kuo daugiau pasikartojimų, tuo *RS* dažnesnis (Fan & Chu, 2007). Serijinis *RS* yra panašus į *MMBIR/FoSTeS* modelį, nes jo metu vyksta pakartotiniai replikacijos sutrikimai ir replikacijos šakutės darbai įtaką gali daryti tokie genomo elementai, kaip palindrominės sekos, kamieninės kilpos, pasikartojantys elementai (Gu *et al.*, 2008). Vykstant *RS* gali susidaryti smulkių (iki kelių kilobazių dydžio) kiekybinių persitvarkymų ir struktūrinių persitvarkymų – inversijų (Gu *et al.*, 2008). *RS* yra viena iš pagrindinių mikrosatelitų (trumpų tandeminių pasikartojimų) atsiradimo priežasčių (Fan & Chu, 2007).

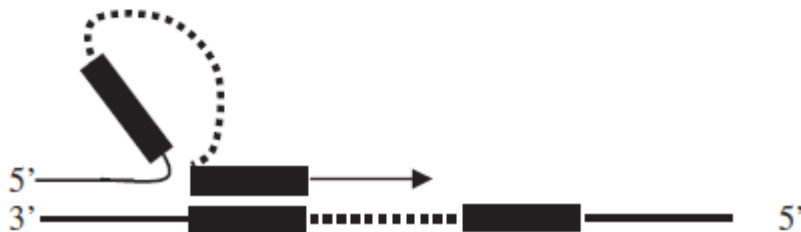
### A. Normali replikacija



### B. Delecijos susidarymas



### C. Duplikacijos susidarymas



2.4 paveikslas. Replikacijos nuslydimo modelis. (juodi stačiakampiai – tos pačios krypties pasikartojimai, punktyrinė linija – DNR seka, linkusi suformuoti antrines DNR struktūras) A. Normali replikacija. B. Delecijos susidaro kai replikacijos metu susintetinus vieną pasikartojimą, sintetinos grandinės 3' galas gali disocijuoti ir prisikabinti prie tos pačios matricinės grandinės kito pasikartojimo. C. Duplikacijos susidaro, kai replikacijos metu susintetinus vieną pasikartojimą, sintetinos grandinės 3' galas gali disocijuoti ir prisikabinti prie buvusio pasikartojimo.

### 2.5.3. Nehomologiškas galų susijungimas

*NHEJ* yra nerekombinantinis, nereplikacinis mechanizmas. Žinduolių ir mielių ląstelėse *NHEJ* yra pagrindinis mechanizmas, ištaisantis DGTs, kuriuos lemia fiziologiniai veiksniai, tokie kaip V(D)J rekombinacijos, klasių kaitos fermentų klaidos, ir patologiniai veiksniai, tokie kaip topoizomerazės klaidos, mechaninis nutraukimas anafazės metu, jonizuojanti radiacija, laisvieji radikalai (Lieber *et al.*, 2008b). *NHEJ* vyksta visose ląstelės ciklo fazėse, ypač G1 stadijoje, todėl *NHEJ* teoriškai turėtų dominuoti HR atžvilgiu. Be to, HR įvykti būtina bent 200 bp homologija, o *NHEJ* gali palengvinti 1-4 bp terminalinės mikrohomologijos, nors jos ir nėra būtinos (Chen *et al.*, 2010).

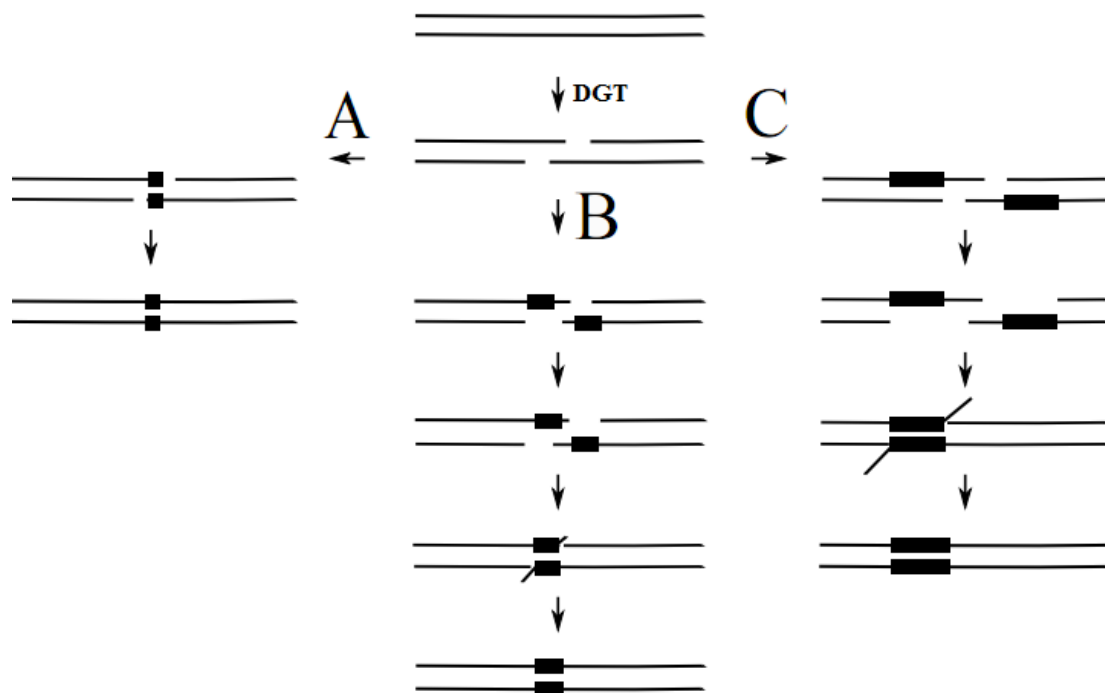
Nehomologiškam galų susijungimui nebūtina sekų homologija ties trūkių vietomis, tačiau jį gali stimuliuoti ar reguliuoti tam tikros genomo sekos, tokios kaip *LCR*, *LTR*, *LINE*, *Alu*, *MIR*, *MER2* (Zhang *et al.*, 2009).

Nehomologiškas galų susijungimas prasideda, kai *Ku* komplekso baltymai (ypač *Ku70* ir *Ku80*) atpažįsta trūkį ir prisijungia atitinkami baltymai prie DGT (jei DNR yra apsvyniojusi apie nukleosomą, tai pradžioje vyksta DNR difuzija nuo baltymų) (Lieber, 2008). Tada formuojasi kompleksas iš nukleazės, šalinančios oksiduotus nukleotidus ar cukrus, proteinkinazės, polimerazės ir ligazės, kurios sutvarko trūkio vietą ir sujungia galus (Lieber, 2008a). *NHEJ* mažina translokacijų tikimybę, nes jei pažeida iš karto aptinkama ir galai susijungia, tai atitrūkęs petys negali priartėti prie kitos chromosomos trūkio ir būti prijungtas (Lieber, 2010).

*NHEJ* vietoje sukuriama „informacinis randas“ – kelių nukleotidų (1–4 bp) delecijos – arba įterpiamos papildomos kelių nukleotidų (2–34 bp) sekos (dažniausiai mitochondrinės arba retrotranspozonų, kurie prijungiami, kad susiderintų nevienodi trūkių galai, kilmės (Lieber, 2008b).

Viena iš pagrindinių *NHEJ* alternatyvų yra mikrohomologiškas galų susijungimas (angl. *microhomology-mediated end joining*, *MHEJ*) (2.5 pav.) (Yu & McVey, 2010). Pagrindiniai *MHEJ* skirtumai nuo *NHEJ* yra šie: *MHEJ* įvykti būtina 5–25 bp mikrohomologija ir jam nereikalingi prie DNR galų besijungiantys baltymai (McVey & Lee, 2008). *NHEJ* turėtų dominuoti *MHEJ* atžvilgiu, kai yra reparuojami patologiški DNR trūkiai, nes jie atsiranda atsitiktinai ir tokiais atvejais retai būna pakankama homologija *MHEJ* mechanizmui. Tačiau *MHEJ* nėra tiesiog atsarginis reparacijos mechanizmas, naudojamas, kai kitiems mechanizms įvykti nėra sąlygų. Klasių kaitos rekombinacijos metu trūkiai įprastai yra susijungia *NHEJ* mechanizmu, tačiau šios rekombinacijos trūkiai gali susijungti be ligazės IV naudojant mikrohomologiją (Yan *et al.*, 2007). *MHEJ* metu gali įvykti delecijų, nes dalis naudojamų priešingų grandinių mikrohomologijų yra prarandama (McVey & Lee, 2008). Nors *MHEJ* yra fiziologiškai svarbus ir jo sukelti persitvarkymai

gali lemti genetines ligas, siūloma jo neišskirti kaip atskiro mechanizmo ir vadinti „nuo ligazės IV nepriklausančiu *NHEJ*“ (Lieber, 2008a).



2.5 paveikslas. DGT galų susijungimo schema. DNR grandinėje įvykus DGT, trūkio vieta gali būti reparuota trimis mechanizmais: A. Nehomologiškų galų susijungimu; B. Mikrohomologiškų galų susijungimu; C. Viengrandžių galų susijungimu. (Juodi stačiakampiai reiškia homologines sritis).

### **III. DARBO METODOLOGIJA**

Mokslinis darbas vykdytas mokslinių projektų PROGENET („Patogeninių kartotinių sekų reikšmė protinio atsilikimo etiopatogenezeje“, finansuojamo Lietuvos mokslo tarybos pagal Nacionalinę programą „Lėtinės neinfekcinės ligos“, sutarties Nr. LIG-12/2010) ir CHERISH („Protinio atsilikimo diagnostikos gerinimas vaikams iš Rytų Europos ir Centrinės Azijos, taikant genetinį apibūdinimą ir bioinformatiką/statistiką“, finansuojamo Europos Sąjungos 7 programos [FP7/2007-2013], sutarties Nr. 223692) pagrindu. Mokslinis tyrimas atliktas laikantis asmens duomenų apsaugos bei bioetikos reikalavimų, gavus Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto pritarimą leidimo papildymui Nr. 158200-6-057-067LP1, kuriuo buvo patvirtinta asmens informavimo forma ir sutikimo forma tiriamojo tėvams/teisėtiems atstovams.

#### **3.1. TYRIMO OBJEKTAS**

Pagrindiniai šio mokslinio darbo tiriamieji – INN turintys asmenys (N=175) ir kontrolinę grupę sudarantys asmenys, kurių IQ normalus (N=150). Kai kuriais atvejais (nustačius paveldėtą galimai patogeninį KSP) buvo tiriami probando sibsai, II ir III eilės giminaičiai. Tiriamieji, turintys INN, buvo atrinkti gydytojų genetikų iš Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos (VULSK) Medicininės genetikos centro (MGC) 2006–2011 klinikinio registro pagal standartizuotus asmenų, turinčių INN, kriterijus. Pagrindinis kriterijus – neaiškios kilmės INN (vertinant Vekslerio testu,  $IQ < 70$ ) arba RA ( $< 6$  metų vaikams, vertinant Denverio ar kitu testu).

#### **3.2. TYRIMO EIGA**

Siekiant įvertinti KSP reikšmę genetinei įvairovei bei ligoms, molekulinis kariotipavimas vLGH metodu atliktas asmenims, turintiems INN (N=175), ir kontrolinės grupės asmenims (N=150) – normalų IQ turintiems, tiriamųjų, turinčių INN, tėvams. Įvertinus hibridizacijos kokybę, tolesnė molekulinio

kariotipavimo rezultatų analizė atlikta 325 tiriamiesiems (175 asmenims, turintiems INN, ir 150 kontrolinės grupės asmenų).

100 asmenų, turinčių INN, buvo tirti naudojant 105 K mikrolustą, kurio vidutinė skiriamoji geba – apie 21 kb. Nustatyti pokyčiai buvo analizuojami naudojant tarptautines duomenų bazines, vertintas jų patogeniškumas. Galimai kliniškai reikšmingi pokyčiai buvo tvirtinami kitu nepriklausomu metodu ir buvo nustatoma jų kilmė tiriant tėvus.

Siekiant įvertinti žmogaus genomo variabilumą ir palyginti KSP paplitimą sergančiųjų ir sveikųjų asmenų genome, tyrimui pasirinktas didesnės skiriamosios gebos – 400 K – mikrolustas. Jis leido nustatyti net labai smulkius KSP. Šiuo mikrolustu tirti 75 asmenys, turintys INN, ir sveiki jų tėvai, turintys normalų IQ. Vidutinė 400 K mikrolusto skiriamoji geba yra 7 kb, tačiau, siekiant išvengti klaidingai teigiamų rezultatų, mažesni nei 20 kb dydžio KSP nebuvo įtraukti į tolesnę analizę.

Vertintas didesnių nei 20 kb KSP pasiskirstymas tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėje pagal dydį, pokyčio tipą, į pokytį patenkančių genų skaičių. Atlikta išsami retų KSP analizė. Reti tiriamųjų, turinčių INN, grupėje nustatyti KSP buvo lyginami su tėvų molekulinio kariotipavimo rezultatais ir buvo nustatoma jų kilmė. Galimai patogeniniai *de novo* pokyčiai buvo tvirtinami kitu nepriklausomu metodu.

Pagal persidengimą KSP, nustatyti kontrolinės grupės asmenims, buvo suskirstyti į regionus (KSPR). Jeigu vieno KSP pabaiga yra kito KSP pradžia, tai šie du KSP sudaro vieną KSPR, kurio pradžia sutampa su pirmojo KSP pradžia, o pabaiga – su antrojo KSP pabaiga. Vertintas segmentinių duplikacijų buvimas arba nebuvimas KSPR. Tiriamųjų, turinčių INN, kopijų skaičiaus pokyčiai palyginti su kontrolinės grupės asmenų kopijų skaičiaus pokyčiais naudojant  $\chi^2$  kriterijų.

### **3.3. TYRIMO METODAI**

#### **3.3.1. Rutininis citogenetinis tyrimas (diferencinis G dažymas)**

Tyrimas atliktas G dažymo metodu pagal patvirtintą VŠĮ VUL Santariškių klinikų direktoriaus patvirtintą metodiką (DP 48-2012).

#### **3.3.2. Fluorescencinė *in situ* hibridizacija (FISH)**

Tyrimas atliktas pagal patvirtintą VŠĮ VUL Santariškių klinikų direktoriaus patvirtintą metodiką (M145-2007).

#### **3.3.3. Realus laiko polimerazės grandininė reakcija (RT-PGR)**

Galimai patogeniniai KSP tvirtinti RT-PGR metodu pagal Weksberg R. *et al.* (2005).

#### **3.3.4. Vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija (vLGH)**

##### **DNR išskyrimas**

DNR buvo išskirta iš periferinio kraujo limfocitų VU MF Žmogaus ir medicininės genetikos katedros darbuotojų fenolio chloroformo metodu pagal patvirtintą metodiką.

##### **DNR paruošimas tyrimui**

Koncentracija nustatoma spektrofotometru, matuojant tirpalo optinį tankį 260 ir 280 nm bangos ilgiu ir vertinant 260/280 santykį. DNR skiedžiama iki darbinės koncentracijos – 10ng/μl.

##### **Paruoštos tiriamosios ir referentinės DNR skaidymas restrikcijos endonukleazėmis (AluI ir RsaI):**

1. 500 ng genomines DNR praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki galutinio tūrio – 20,2 μl.
2. Paruošiamas skaidymo mišinys:
  - 2,0 μl dejonizuoto vandens,



- 2,6 µl 10Xbuferio C,
  - 0,2 µl acetilinto BSA(10 µg/µl),
  - Alu I(10 U/µl) + RsaI(10 U/µl).
3. Į mikromėgintuvėlius su 20,2 µl genominės DNR įdedama po 5,8 µl skaidymo mišinio.
  4. Inkubuojama 2 val. 37 °C temperatūroje.
  5. Inkubuojama 20 min. 65 °C temperatūroje tam, kad būtų inaktyvuoti fermentai.
  6. Mėgintuvėliai pernešami ant ledo, šaldoma 5 min.

**Suskaidytos tiriamosios ir referentinės DNR žymėjimas skirtingais fluorescuojančiais dažais:**

1. Į kiekvieną reakcijos mėgintuvėlį su 26 µl suskaidytos genominės DNR įdedama po 5µl atsitiktinių pradmenų ir gerai supipetuojama.
2. Inkubuojama 5 min. 95 °C temperatūroje.
3. Mėgintuvėliai pernešami ant ledo, šaldoma 5 min.
4. Paruošiamas žymėjimo mišinys:
  - 10,0 µl 5Xbuferio,
  - 5,0 µl 10XdNTP,
  - 3 µl cyaninine3-dUTP(1,0 mM) (tiriamajai genominei DNR)/3 µl cyaninine5-dUTP(1,0 mM) (referentinei genominei DNR),
  - 1,0 µl Egzo-Klenovo fragmento.

5. Į kiekvieną mikromėgintuvėlį su 31 µl genominės DNR įdedama po 19 µl žymėjimo mišinio.

6. Inkubuojama 2 val. 37 °C temperatūroje.

7. Inkubuojama 10 min. 65 °C temperatūroje.

### **Žymėtosios DNR valymas:**

1. Į kiekvieną mikromėgintuvėlį su 50 µl pažymėtos genominės DNR įdedama po 430 µl TE buferio.

2. Pažymėta genominė DNR perkeliama ant YM-30 filtro ir centrifuguojama 10 min. (8,000xg).

3. Nupilamas filtratas ir į kiekvieną mėgintuvėlį įdėjus po 480 µl TE buferio, centrifuguojama 12–13 min. (8,000xg).

4. Apverčiamas filtras ant švaraus mikromėgintuvėlio, centrifuguojama 1 min. (8,000xg).

5. Matuojamas išvalytos genominės DNR tūris. Jeigu tūris didesnis nei 12,5 µl, dar kartą filtruojama. Jeigu <12,5 µl, įdedama TE buferio iki galutinio 12,5 µl tūrio.

6. Paruošiamas tiriamosios ir referentinės DNR mišinys.

### **Suskaidytos bei pažymėtos tiriamosios ir referentinės DNR kohibridizacija ant mikrolusto. Pohibridizacinis mikrolustų plovimas.**

1. Pasiruošiamas 10x*Blocking Agent*: į 10x*aCGH Blocking Agent* įdedama 1,350 µl distiliuoto vandens ir palaikoma 60 min. kambario temp. prieš naudojant arba dedant į -20 °C temperatūrą.

2. Paruošiamas hibridizacijos mišinys:

- 25 µl cot-1 DNR,

- 26  $\mu$ l 10 x vLGH *blocking Agent*,
  - 130  $\mu$ l 2X HI-RPM *Hybridization Buffer*.
3. Į tiriamosios ir referentinės DNR mišinį (80  $\mu$ l) įdedama po 181  $\mu$ l hibridizacijos mišinio.
  4. Supipetuojama ir nucentrifuguojama.
  5. Mėgintuvėliai pernešami ant 95 °C kaitinimo bloko, po 3 min. dedama ant 37 °C kaitinimo bloko ir inkubuojama 30 min.
  6. Nucentrifuguojama 1 min. 6000 xg.
  7. Tiriamosios ir referentinės DNR mišinys perkeliamas ant mikrolusto.
  8. Suskaidytos bei pažymėtos tiriamosios ir referentinės DNR kohibridizacija bei mikrolustų plovimas buvo atliekamas automatiškai, naudojant TECAN hibridizacijos įrangą.

### **Hibridizacijos produkto skenavimas.**

Mikrolustas po 16 val. DNR hibridizacijos skenuojamas genominiu skaitytuvu.

### **Rezultatų apdorojimas.**

Skenuoti vaizdai kompiuterine programa *Feature Extraction V.9.5.3.1* programa konvertuojami į FE formatą. Duomenys FE formatu įkeliami į *NEXUS 6.0* analizės programą ir atliekamas molekulinis kariotipavimas.

Analizuojama kiekviena chromosoma (22 autosomos ir lytinės chromosomos X bei Y). Vertinamas hibridizacijos taškų išsidėstymas pagal tiriamosios ir referentinės DNR fluorescencijos intensyvumo logR santykį. Kiekvienas hibridizacijos taškas atitinka tam tikrą hibridizacijos žymenį. Jeigu keturių ir daugiau greta esančių hibridizacijos taškų LogR tarp 0 ir -1, fiksuojama DNR fragmento delecija, jeigu tarp 0 ir +1 – duplikacija.

Genominio pokyčio (delecijos/duplikacijos) dydis priklauso nuo hibridizacijos taškų skaičiaus.

### **Rezultatų analizė.**

Identifikuoti genomo pokyčiai – delecijos/duplikacijos – analizuojami naudojant tarptautines duomenų bazes ir vertinami pagal nustatytus vertinimo kriterijus. Pradinės duomenų analizės etape tiriamiesiems, turintiems INN, nustatyti KSP lyginami su vietinėje kontrolinėje grupėje nustatytais KSP bei tarptautinėje duomenų bazėje DGV (*Database of Genomic Variants*) esančiais KSP. Taigi, šiame etape įvertinamas polimorfizmų ar sekos variantų dažnumas genetinėje srityje, kurioje nustatytas pokytis, ir atmetami žinomi sekos variantai, tuo pat metu įvertinamas genetinis kontekstas. Galimai kliniškai reikšmingiems pokyčiams priskiriami tie, kurie nebūdingi sveikųjų populiacijai, t. y. nėra polimorfiniai KSP. Tokiu atveju tikėtina, kad pokytis, neaptinkamas sveikųjų asmenų genome, gali būti kliniškai reikšmingas. Nepolimorfiniai genomo pokyčiai analizuojami DECIPHER duomenų bazėje (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) siekiant palyginti kliniką bei delecijos/duplikacijos dydį su aprašytais žinomais mikrodeleciniais/mikroduplikaciniais sindromais.

Analizės išvada: nustatytas pokytis priskiriamas vienai iš patogeniškumo kategorijų:

- nepatogeniniai pokyčiai,
- galimai nepatogeniniai pokyčiai,
- galimai patogeniniai pokyčiai,
- patogeniniai pokyčiai.

Nepatogeniniams genomo pokyčiams priskiriami genomo pokyčiai, kuriuose nėra svarbią biologinę funkciją atliekančių genų ir kuriuose gausu polimorfinių sekos variantų. Galimai patogeniniams ir patogeniniams pokyčiams priskiriami genomo pokyčiai, kurių dydis ne mažesnis nei 20 kb, pokytį apimančioje srityje arba greta yra reikšmingų INN etiopatogenezei genų,

nėra žinomų aprašytų sekos variantų (polimorfizmų) toje srityje. Kiekvienas iš jų lyginamas su Lietuvos populiacijos kontrolinės grupės konkrečios genetinės srities molekulinio kariotipavimo rezultatais siekiant juos įvertinti lietuvių genomo ypatumų kontekste.

### **Galimai patogeninių pokyčių patvirtinimas.**

Galimai patogeniniai nesubalansuoti genomo pokyčiai tvirtinami molekuliniiais metodais – PGR arba FISH, nustatoma pokyčio kilmė – *de novo* ar paveldėta.

### **Tyrimo rezultatų klinikinis interpretavimas.**

Kiekvienu atveju analizuojama galimai patogeninio pakitimo genetinėje srityje esančių genų funkcija ir įtaka CNS raidai ir funkcijai bei INN patogenezei.

#### **3.3.4 Statistinė analizė**

Statistinė analizė atlikta naudojant IBM SPSS Statistics 20 programinį paketą. Tiriamųjų, turinčių INN, KSP palyginti su kontrolinės grupės asmenų kopijų skaičiaus pokyčiais naudojant  $\chi^2$  kriterijų. Esant mažam stebėjimų skaičiui vietoje  $\chi^2$  kriterijaus taikytas Fišerio kriterijus. Hipotezėms tikrinti ir sąsajų statistiniam patikimumui nustatyti pasirinktas  $p < 0,05$  reikšmingumo lygmuo.

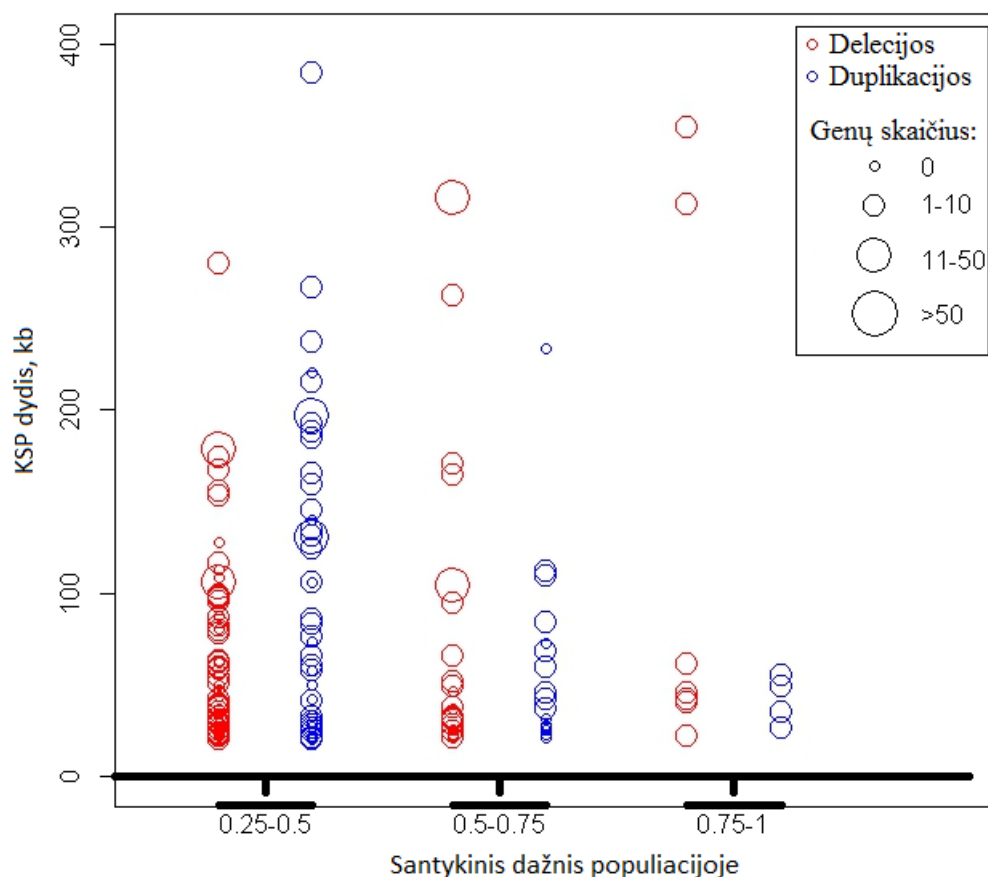
## **IV. TYRIMŲ REZULTATAI**

Šio tyrimo tikslas – nustatyti genetines sritis ir jose esančius stiprius genus kandidatus, kurių dozės pokytis lemia nervų sistemos raidos ir funkcijos sutrikimus. Rezultatai pateikti šio skyriaus atskirose dalyse, atitinkančiose išskeltus darbo uždavinius. Pirmiausia apibūdinti plačiai žmogaus genome paplitę KSP. Remiantis kontrolinės ir tiriamųjų, turinčių INN, grupių molekulinio kariotipavimo rezultatais, išskirti reti KSP ir aptarti konkrečių KSP pagrindiniai patogeniškumo kriterijai. Aprašyti kliniškai reikšmingi ir galimai kliniškai reikšmingi KSP, nauji genai kandidatai, kurių raiškos pokytis gali lemti INN.

### **4.1. BENDROJE POPULIACIJOJE PAPLITUSIŲ KSP APIBŪDINIMAS**

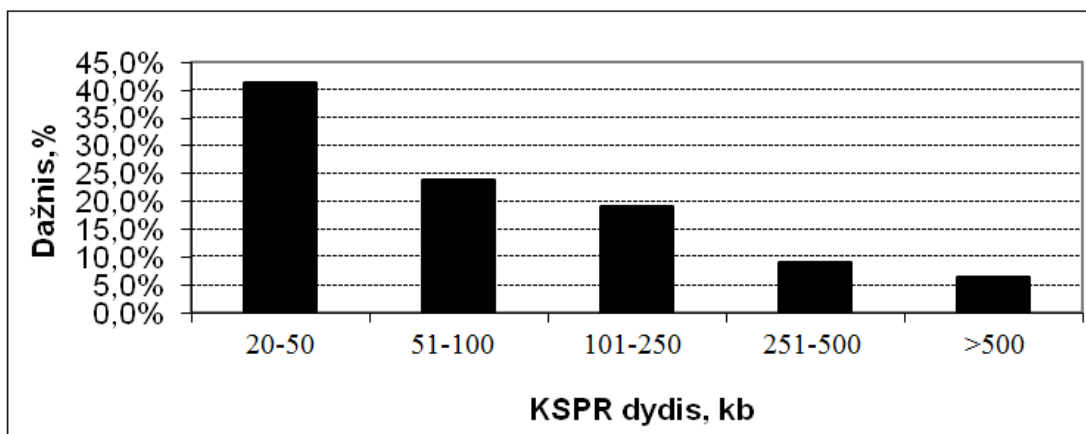
Tirtoje kontrolinėje grupėje (N=150) nustatyti 32 463 KSP. Dauguma jų (99,8 %) yra dažni, kliniškai nereikšmingi. Dažniausi KSP, būdingi >75 % individų, yra iki 100 kb dydžio, apimantys ne daugiau kaip 10 genų. Tarp dažnų <100 kb dydžio KSP dažnesnės yra delecijos (4.1 pav.).

Siekiant nustatyti, kurie žmogaus genomo regionai linkę varijuoti ir nėra jautrūs genų dozės pokyčiui, kontrolinėje grupėje nustatyti KSP suskirstyti į regionus. Remiantis KSP persidengimu, nustatyti 1072 KSP regionai (KSPR), kurie užima apie 165,8 Mb, t. y. sudaro 5,1 % žmogaus genomo (KSPR regionų skaičius 12-oje ir 19-oje chromosomose nevertintas, dėl ypač didelės KSP įvairovės su žemu LogR (<0,5 arba >-0,5)).



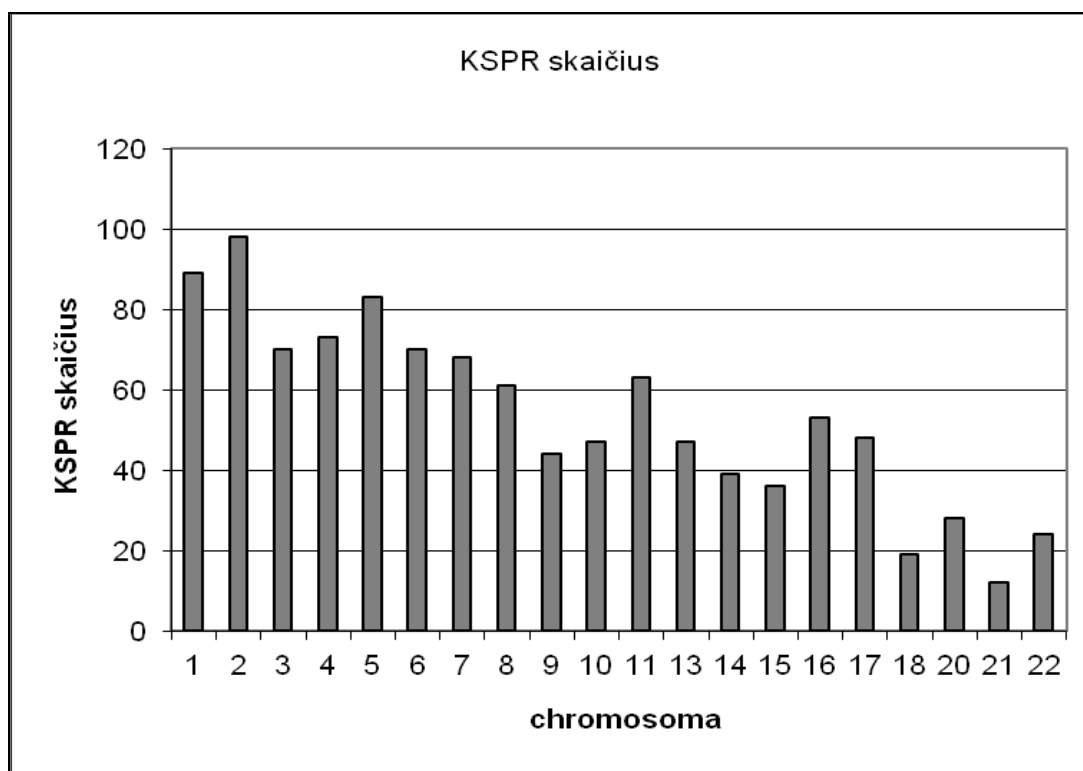
4.1 paveikslas. KSP dydis, genų skaičius ir santykinis dažnis tirtoje kontrolinėje grupėje. Delecijų ir duplikacijų paplitimas žmogaus genome priklauso nuo pokyčio dydžio ir genų skaičiaus. Populiacijoje dažniausi KSP, būdingi >0,75 individų, yra <100 kb, apimantys iki 10 genų. Populiacijoje retesniems KSP būdingas didesnis dydžio ir genų skaičiaus variavimas.

KSPR dydis varijuoja nuo 20 kb iki 5,2 Mb (mediana 65 kb). Pagal dydį visi KSPR suskirstyti į grupes: 20–50 kb dydžio, 51–100 kb, 101–250 kb, 251–500 kb, >500 kb. 4.2 paveiksle pateiktas KSPR dažnis, priklausantis nuo regiono dydžio. Smulkūs 20–50 kb dydžio KSPR yra dažniausi ir sudaro 41,3 % visų KSPR, tačiau užima mažiausią žmogaus genomo dalį (14,1 Mb). KSPR dydžiui didėjant, jų dažnis mažėja. KSPR, kuriuose aptinkamos delecijos, yra 1,4 kartus dažnesni nei KSPR, kuriuose nustatomos duplikacijos. 47,4 % (508/1072) KSPR būdingos tik delecijos, 27,3 % (293/1072) – tik duplikacijos, 25,3 % (272/1072) – delecijos ir duplikacijos.



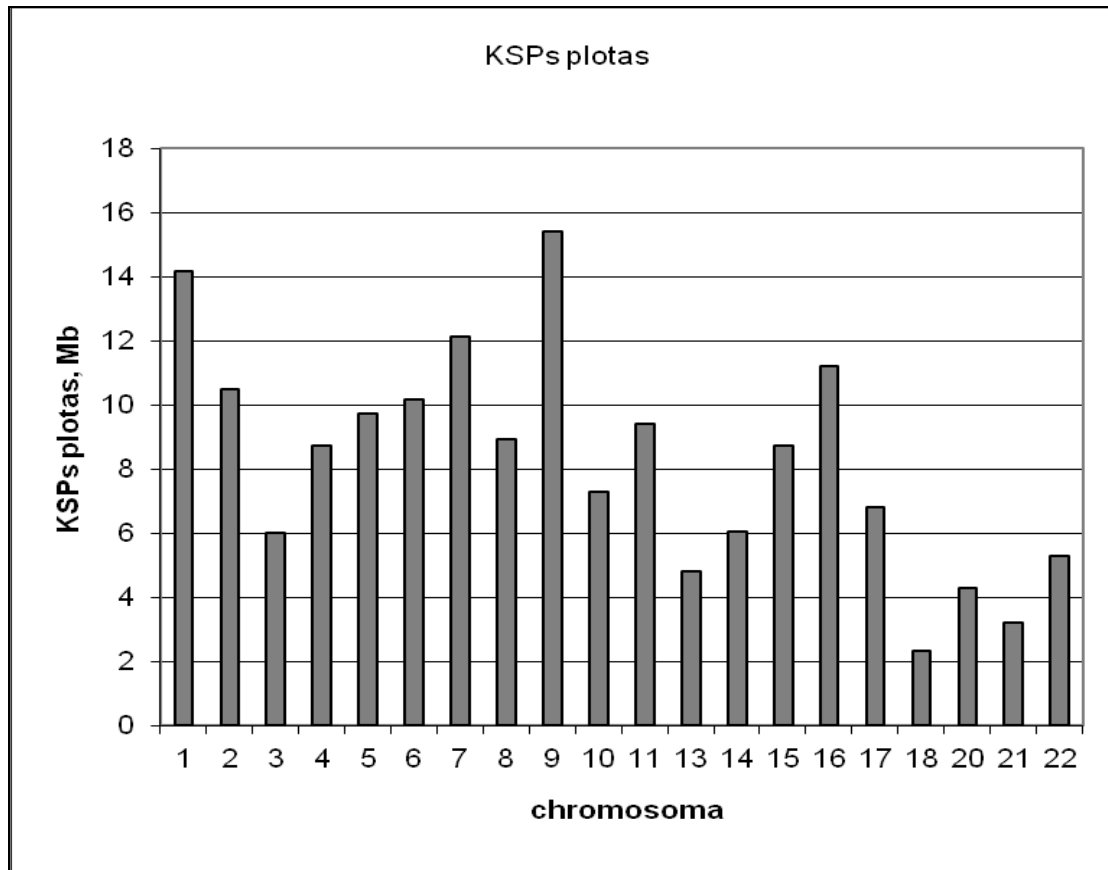
4.2 paveikslas. KSPR dydžio skirstiniai. KSPR dydžiui didėjant, jų dažnis mažėja.

Vertinant KSPR pasiskirstymą tarp autosomų, pastebima, kad KSPR skaičius chromosomose tiesiogiai koreliuoja su chromosomos dydžiu (4.3 pav.), tačiau didžiausias bendras KSPR regionų ilgis yra 9-oje chromosomoje (4.4 pav.). Remiantis KSPR pasiskirstymu tarp autosomų, nustatyta, kad 9-a ir 16-a chromosomos yra variabiliausios (4.5 pav.). Manoma, kad tai yra susiję su dideliu heterochromatino kiekiu 9-oje ir 16-oje chromosomose bei segmentinių duplikacijų, kurios lemia didesnių KSP formavimąsi, dažnumu šiose chromosomose.

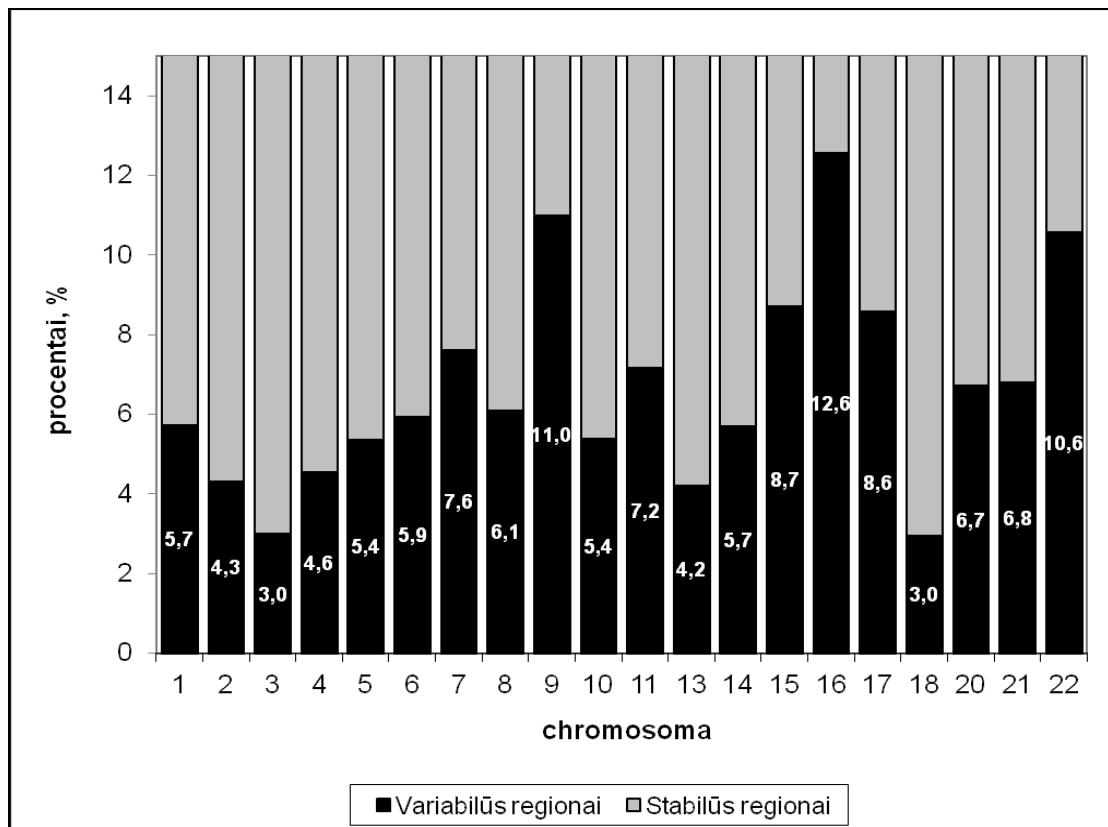


4.3 paveikslas. KSPR skaičius autosomose.





4.4 paveikslas. Bendras KSPR ilgis autosomose.



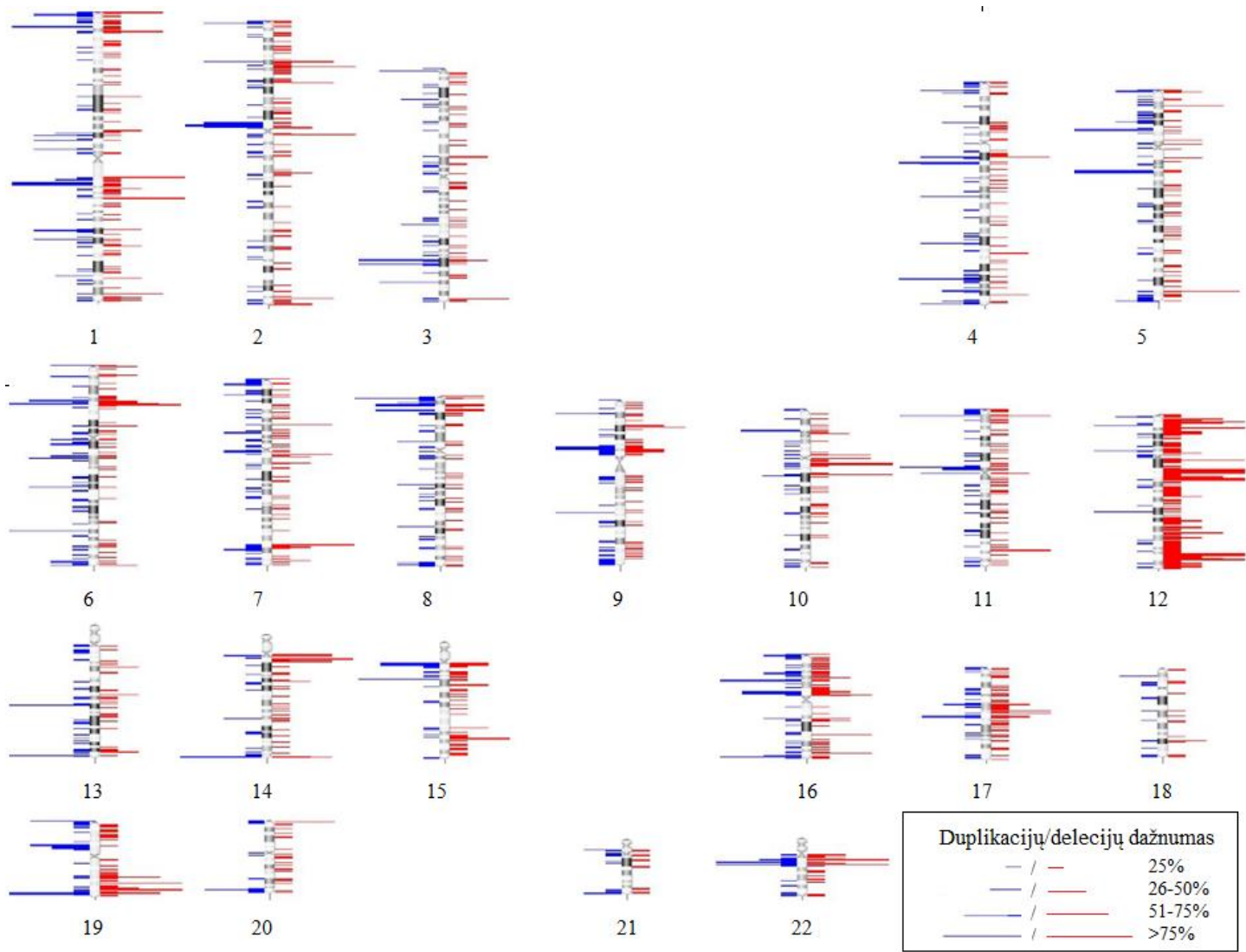
4.5 paveikslas. Santykis tarp variabilių ir stabilių regionų skirtingose autosomose.

Dauguma nustatytų KSPR (84,9 %, 910/1072) yra dažni, todėl nekyla abejonų dėl to, kad jie nėra kliniškai reikšmingi. Sveikų asmenų populiacijoje dažni KSPR paprastai yra kliniškai nereikšmingi struktūriniai genomo variantai.

Darbo metu tiriamoje kontrolinėje grupėje 92,7 % nustatytų KSPR (995/1072) sutampa su kliniškai nereikšmingais polimorfiniais variantais, skelbiamais tarptautinėje duomenų bazėje *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Analizuojant žinomus chromosomų struktūros variantus (t. y. KSPR, kurie bent ¾ dalimi sutampa su ankstesnių tyrimų metu nustatytais KSP), nustatyta, kad delecijos yra dažnesnės nei duplikacijos nepriklausomai nuo regiono dydžio. Priešingai, duplikacijos yra dažnesnės nei delecijos žinomų, bet Lietuvos populiacijoje retų KSPR grupėje, kai KSPR dydis yra >250 kb. Įdomu tai, kad tarp dažnų KSPR nustatyti 4 specifiniai Lietuvos populiacijai KSP regionai: 4q21.21, 14q24.1, 8q24.21 ir 7p21.3.

8,5 % (85/995) žinomų genomo variantų yra reti tirtoje kontrolinėje Lietuvos populiacijoje. Taip pat tirtoje kontrolinėje grupėje nustatyti 67 nauji (tarptautinėse duomenų bazėse ir literatūroje neskelbti) reti KSPR.

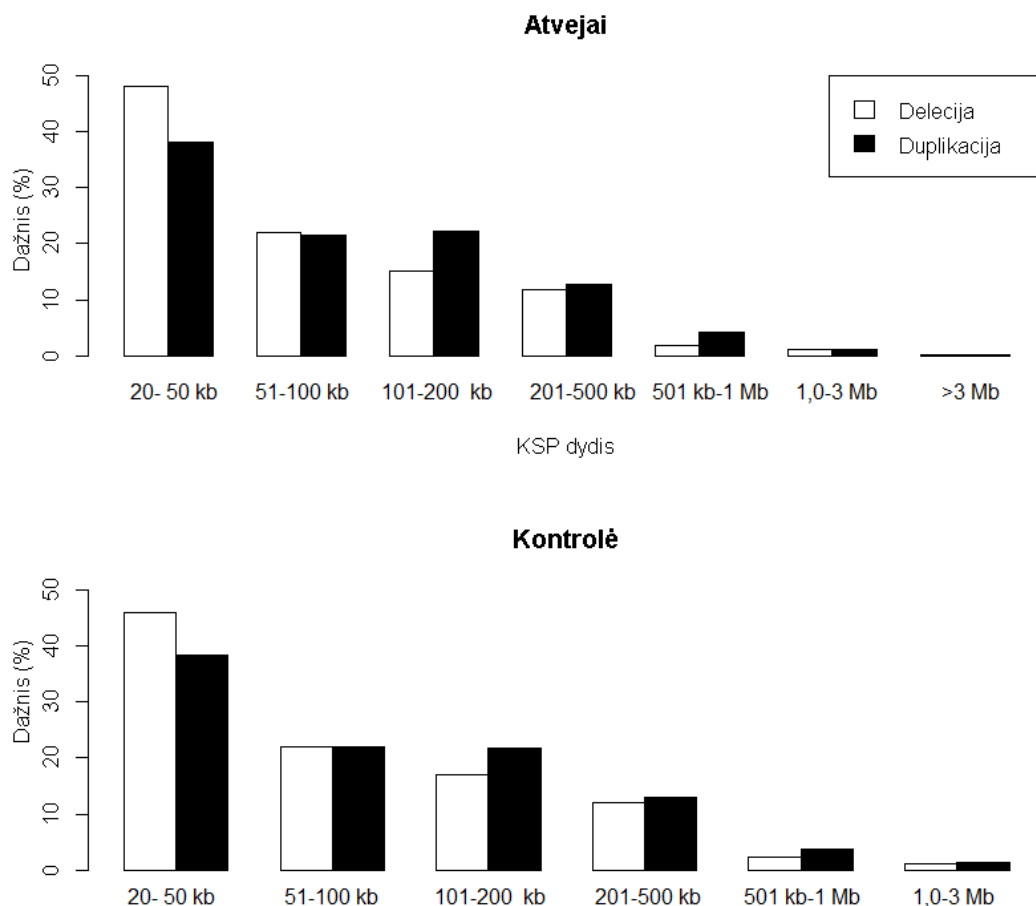
Šio tyrimo metu gauti duomenys apie Lietuvos populiacijai būdingų KSPR įvairovę bei dažnį papildė mūsų žinias apie Lietuvos populiacijos genomo struktūrą (4.6 pav.). Tyrimo rezultatai yra naudingi vertinant žmogaus genomo variavimą ir sąsają su ligomis. Kontrolinėje grupėje nustatyti KSPR ne tik reikšmingi šio tyrimo metu nustatytų chromosomų struktūros pokyčių tiriamųjų, turinčių INN, patogeniškumo vertinimui, bet bus pritaikyti ir kitiems diagnostiniams vLGH tyrimams – nustatytiems KSP interpretuoti, mikrolustų dizainui kurti.



4.6 paveikslas. KSP genolapis. KSPR pasiskirstymas tarp autosomų. Raudona spalva pažymėtos delecijos, mėlyna – duplikacijos. Brūkšnelio ilgis atitinka KSPR pokyčių regione dažnumą. Dažniausi KSPR yra 1-os, 2-os, 9-os, 11-os, ir 22-os chromosomų pericentromeriniuose chromosomų regionuose

## 4.2. KSP PALYGINIMAS TIRIAMŪJŲ, TURINČIŲ INN, IR KONTROLINĖJE GRUPĖSE

vLGH metodu, naudojant 400 K mikrolustą, ištirti 225 asmenų genomai (75 tiriamieji, turintys INN, ir jų tėvai – 150 asmenų su normaliu IQ). Nustatyti 48437 didesni nei 20 kb KSP (delecijos (N=25524; 52,7 %), duplikacijos (N=22913; 47,3 %)). Pagal ilgį KSP suskirstyti į intervalus: 20-50 kb, 51–100 kb, 101–200 kb, 201–500 kb, 501 kb–1 Mb, 1,0–3 Mb, >3 Mb. Chromosominių pokyčių dažnių skirstiniai statistiškai reikšmingai skiriasi tiriamųjų, turinčių INN (p=4,42E-46), ir kontrolinėje (p=8,67E-69) grupėse. 4.7 paveiksle pateiktas asmenų, turinčių INN (atvejų), ir kontrolinėje grupėse nustatytų delecijų ir duplikacijų santykiniai dažniai, priklausantys nuo KSP dydžio.

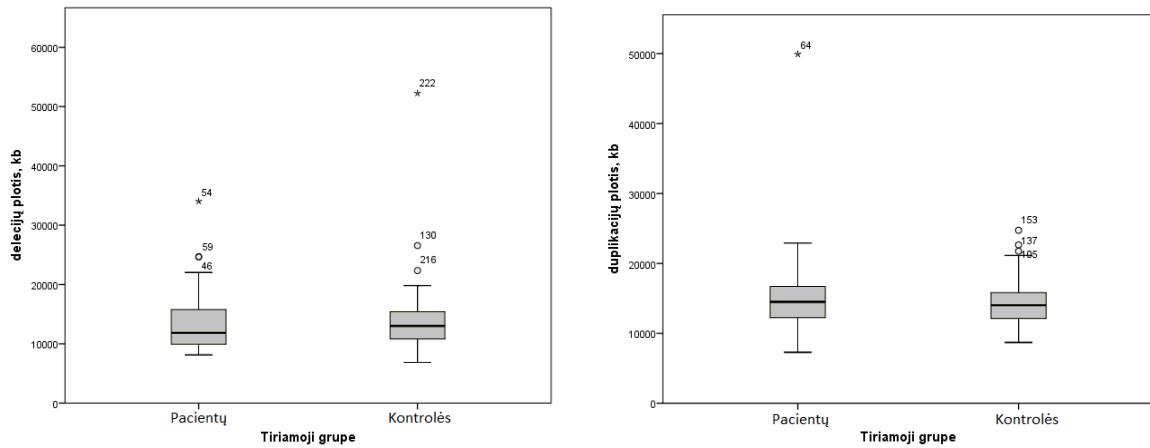


4.7 paveikslas. Santykiniai delecijų ir duplikacijų dažnių skirstiniai tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėse.

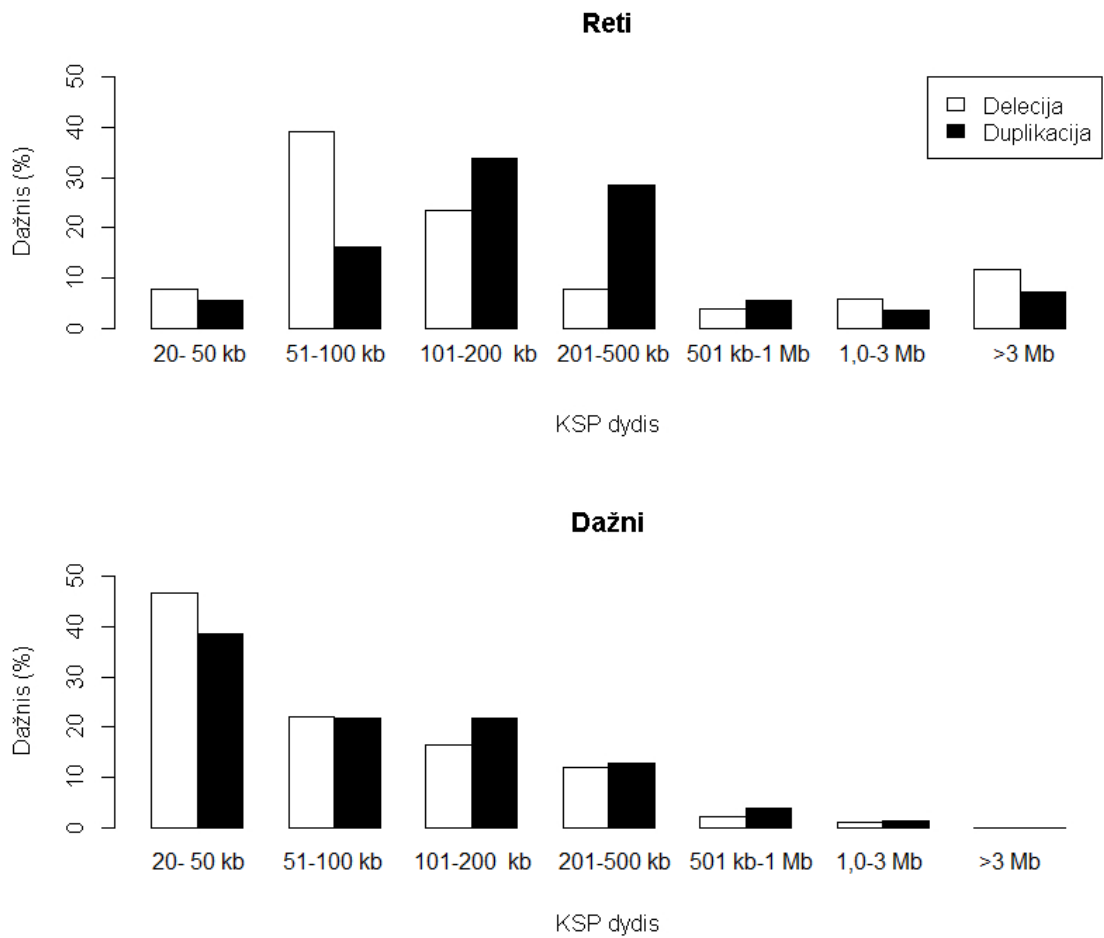
Akivaizdu, kad didžiąją dalį (~2/3) KSP sudaro <100 kb delecijos ir duplikacijos, iš kurių dažnesnės yra delecijos. Panašų KSP pasiskirstymą iliustruoja ir anksčiau atliktų populiacinių KSP studijų rezultatai (Kato *et al.*, 2010; Redon *et al.*, 2010).

Statistiškai reikšmingų skirtumų, lyginant kontrolinės grupės ir asmenų, turinčių INN, KSP, nenustatyta. Vidutinis KSP (>20 kb) skaičius asmenų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėje yra panašus, atitinkamai – 217/asmeniui ir 216/asmeniui ( $p=0,375$ , CI=95 %). Delecijų ir duplikacijų dažnumas varijuoja priklausomai nuo dydžio. Delecijos yra dažnesnės ( $p=0,016$ , CI=95 %) nei duplikacijos kontrolinėje ir tiriamųjų, turinčių INN, grupėse, atitinkamai sudaro 53,1 % ir 51,9 % visų KSP, tačiau didesnę žmogaus genomo dalį sudaro duplikacijos. Vidutiniškai duplikacijos užima  $15201 \pm 5131$  kb ir  $14248 \pm 2919$  kb atitinkamai atvejų ir kontrolinėje grupėje, o delecijos –  $13273 \pm 4088$  kb ir  $13481 \pm 4408$  kb. Tai paaiškinama tuo, kad duplikacijos dydžio charakteristikos – vidutinis dydis ir mediana – yra didesnės nei delecijos. Asmenų, turinčių INN, grupėje vidutinis duplikacijos *vs* delecijos dydis – 146,8 *vs* 119,3 kb, mediana – 72,5 *vs* 52,1 kb. Kontrolinėje grupėje vidutinis duplikacijos *vs* delecijos dydis – 141,9 *vs* 117,3 kb, mediana – 71,8 *vs* 57,1 kb.

Vidutinis delecijų ir duplikacijų dydis ir genų skaičius yra panašūs (4.1 lentelė), tačiau delecijų ir duplikacijų užimama genomo dalis labiau varijuoja tiriamųjų, turinčių INN, grupėje nei kontrolėje grupėje (4.8 paveikslas). Tiriamųjų, turinčių INN, genome delecijos užima 0,31–0,50 % (10–16 Mb), duplikacijos – 0,39–0,53 % (12,5–17 Mb) žmogaus genomo. Kontrolinės grupės asmenų genome bendras delecijų ilgis sudaro 0,31–0,46 % (11–15 Mb), duplikacijų – 0,37–0,51 % (12–16,5 Mb) žmogaus genomo.



4.8 paveikslas. A. Bendras delecijų ilgio variavimas tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinės grupės asmenų genuose. B. Bendras duplikacijų ilgio variavimas tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinės grupės asmenų genuose.



4.9 paveikslas. Retų ir dažnų KSP pasiskirstymas pagal dydį.

4.1 lentelė. Delecijų ir duplikacijų palyginimas tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėse.

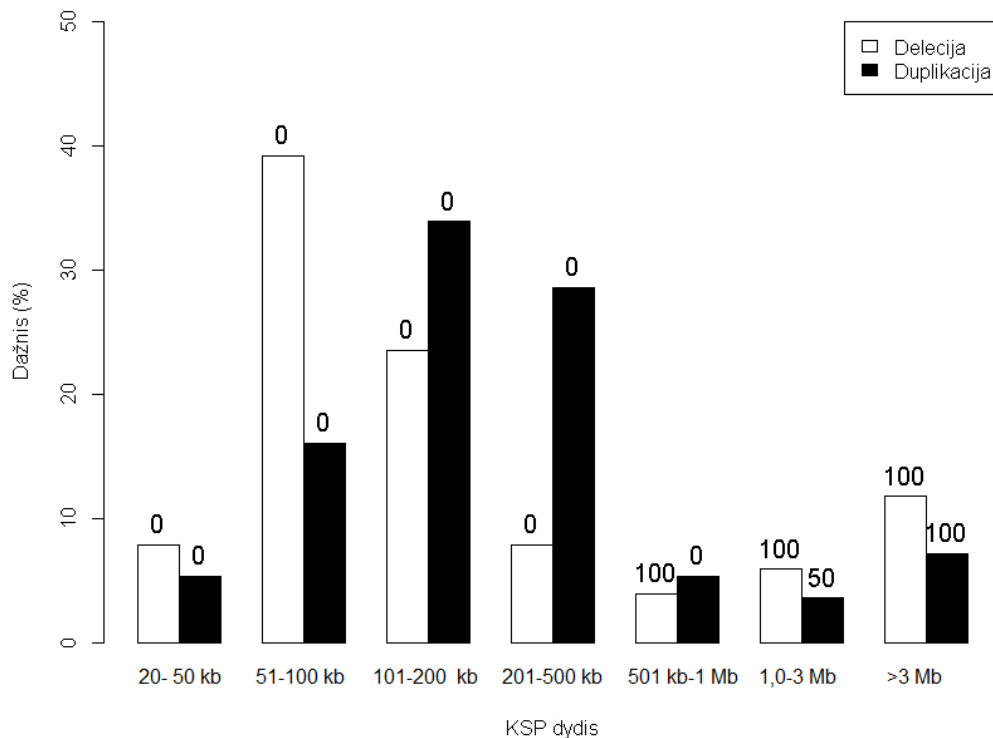
	Visi KSP			Reti KSP		
	Pacientas	Kontrolė	p-reikšmė	Pacientas	Kontrolė	p-reikšmė
Vidutinis delecijos dydis, kb	119	117	0.14	2001	110	0.08
Vidutinis duplikacijos dydis, kb	147	141	0.75	2203	267	0.017
Vidutinis genų, kurių dozė sumažėjo, skaičius	3,94	4,09	0.19	34,56	1,92	0.05
Vidutinis genų, kurių dozė padidėjo, skaičius	2,95	2,98	0.74	40,10	5,89	0.012

Pagal KSP persidengimą su tarptautinėse duomenų bazėse esančiomis kliniškai nereikšmingomis delecijomis ar duplikacijomis bei dažnį tiriamoje populiacijoje nustatyti pokyčiai suskirstyti į dvi grupes: dažnus (48330) ir retus (107). Retiems KSP priskirti pokyčiai, kurių nėra duomenų bazėse ir kurių dažnis tiriamoje populiacijoje <1 %. Kiekvienas asmuo – tiek sveikas, tiek sergantis – turi šimtus KSP, kurių dauguma yra dažni ir kliniškai nereikšmingi, todėl dažni KSP pagal pokytį, dydį bei genų skaičių nesiskiria sergančiųjų ir sveikų asmenų grupėse. Šiuo atveju tiriamoje asmenų, turinčių INN, grupėje dažni KSP sudaro 99,7 %, o kontrolinėje – 99,8 %. Retų ir dažnų delecijų/duplikacijų santykiniai dažniai pagal dydį pavaizduoti 4.9 paveiksle. Reti ir dažni KSP statistiškai reikšmingai skiriasi pagal dydį ( $p=0.009$ , CI=95 %).

Labiausiai tikėtina, kad reti KSP gali turėti įtakos tiriamojo fenotipui. Lyginant tiriamųjų, turinčių INN, retuosius KSP su kontrolinės grupės retaisiais KSP, nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p=0.002$ , CI=95 %) (detaliau 4.3 poskyryje).

### 4.3. RETI KSP

400 K mikrolustu tirtoje asmenų, turinčių INN, grupėje (N=75) nustatyti 48 reti KSP, kurių ilgis įvairuoja nuo 27 kb iki 18,418 Mb. Vidutinis chromosominio pokyčio dydis – 2,089 Mb, mediana – 192 kb. Iš 48-ių retų kopijų skaičiaus pokyčių 27 yra delecijos, 21 – duplikacija. Delecijų ilgis įvairuoja nuo 27 kb iki 13,947 Mb (mediana – 198 kb), duplikacijų – nuo 63 kb iki 18,418 Mb (mediana – 158 kb). Retų delecijų ir duplikacijų pasiskirstymas pagal dydį pateiktas stulpeline diagrama (žr. 4.10 paveikslą). Vidutinis delecijos ir duplikacijos ilgis yra panašus – atitinkamai 2,001 Mb ir 2,203 Mb ( $p=0,863$ ).



4.10 paveikslas. Retų KSP dažnių skirstiniai pagal dydį. Skaičius virš stulpelių rodo, kokia dalis retų KSP priskirta patogeniniams pokyčiams.

Kontrolinėje grupėje (N=150) nustatyti 59 reti KSP. Retų chromosominių pokyčių dydis įvairuoja nuo 36 kb iki 1,4 Mb. Vidutinis chromosominio pokyčio dydis – 203 kb, mediana – 124 kb. Iš 59-ių retų kopijų skaičiaus pokyčių 24 yra delecijos, 35 – duplikacijos. Delecijų ilgis įvairuoja nuo 36 kb iki 276 kb (mediana – 88 kb), duplikacijų – nuo 37 kb iki 1,372 Mb (mediana – 154 kb). Vidutinis delecijos ir duplikacijos ilgis statistiškai



reikšmingai skiriasi: vidutinis delecijos ilgis – 110 kb, duplikacijų – 267 kb ( $p=0,003$ ).

Vidutinis retų KSP ilgis tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėse (atitinkamai 2,089 Mb ir 203 kb) statistiškai reikšmingai skiriasi ( $p=0,002$ , CI=95 %). Taip pat statistiškai reikšmingai skiriasi ir genų, kurių dozė pakinta dėl KSP, skaičius ( $p=0,01$ , CI=95 %). Tiriamųjų, turinčių INN, grupėje KSP vidutiniškai apima 37 genus, o kontrolinėje grupėje retas KSP vidutiniškai apima 4 genus.

Palyginus vidutinį retų KSP ilgį, atsižvelgiant į pokyčio tipą asmenų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėse, nustatyta, kad vidutinis duplikacijų ilgis tiriamųjų, turinčių INN, ir kontrolinėje grupėse statistiškai reikšmingai nesiskiria ( $p=0,071$ , CI=95 %), o vidutinis delecijų ilgis statistiškai reikšmingai skiriasi ( $p=0,008$ , CI=95 %). Tai patvirtina kitų autorių iškeltą hipotezę, kad retos delecijos yra dažniau patogeninės nei duplikacijos. Retos duplikacijos dažniau būna kliniškai nereikšmingos.

Tiriamųjų, turinčių INN, grupėje ( $N=100$ ), kuri buvo tirta naudojant 105 K mikrolustą, nustatyti 36 reti, sveikųjų populiacijai nebūdingi KSP – 16 delecijų ir 20 duplikacijų. Vidutinis chromosominio pokyčio dydis – 923 kb, mediana – 438 kb. Delecijų ilgis įvairuoja nuo 335 kb iki 3,913 Mb (mediana – 1210 kb), duplikacijų – nuo 99 kb iki 17,519 Mb (mediana – 332 kb).

84 reti tiriamųjų, turinčių INN, grupėje nustatyti reti KSP buvo tvirtinami, kitu metodu, ir nustatoma pokyčio kilmė. Nustatyti 28 *de novo* (16 delecijos ir 12 duplikacijos) ir 56 paveldėti (16 delecijų ir 40 duplikacijų) chromosomų struktūros pokyčiai.

Remiantis pagrindiniais KSP patogeniškumo vertinimo kriterijais – pokyčio tipu, dydžiu, kilme, į pokytį patenkančių (kai kuriais atvejais ir šalia esančių dozei jautrių) genų funkcijos ir raiškos literatūrine analize bei segregacijos analize (paveldėtų retų KSP atveju), 30/84 retų pacientų grupėje nustatytų KSP priskirti patogeniniams chromosomų struktūros pokyčiams (4.2 lentelė), 4 – neaiškios klinikinės reikšmės pokyčiams, 50 – retiems polimorfiniams variantams.

4.2 lentelė. Patogeniniai KSP.

Tiriamąjo kodas	vLGH rezultatas, hg18	Dydis Mb	Stipriausi genai kandidatai/pastaba	vLGH lustas
LT-11-1	arr 22q13.31q13.3(45,834,903-49,529,400)x1 <i>dn</i>	3.8	<i>SHANK3</i>	400K
LT-43-1	arr 22q11.2(117,018,751-19,795,282)x1 <i>dn</i>	2.8	<i>TBX, COMT, PRODH1</i>	400K
LT-69-1	arr 15q11.2q13.1(22,293,861-26,890,764)x1 <i>dn</i>	4.6	<i>UBE3A</i>	400K
LIT-29-1	arr 16p11.2(29,563,985-30,106,254)x1 <i>mat</i>	0.6	<i>MAPK3, TBX6 ect.</i>	105K
LIT-156-1	arr 16p11.2(29,563,985-30,106,254)x1 <i>dn</i>	0.6	<i>MAPK3, TBX6 ect.</i>	105K
LIT-30-1	arr 5p14.3p14.1(23,025,478-26,938,536)x1 <i>dn</i>	3.9	<i>CTNND2</i>	105K
LIT-227-1	arr 2q37.3(239,525,614-242,717,216)x1 <i>dn</i>	3.2	<i>HDAC4</i>	105K
LIT-19-1	arr 16p13.3(2,589,524-3,911,387)x3 <i>dn</i>	1.3	<i>CREBBP</i>	105K
LIT-138-1	arr 2q24.2q24.3(162,118,995- 164,461,141)x1 <i>dn</i>	2.3	<i>SLC4A10, KCNH7</i>	105K
LIT-117-1	arr 4q21.22(83,373,844-84,097.897)x1 <i>dn</i>	0.7	<i>HNRPDL ir HNRNP</i>	105K
LIT-216-1	arr 5q14.3(86,456,211-89,104,733)x1 <i>dn</i>	2.7	<i>MEF2C</i>	105K
LIT-123-1	arr 7q35q36.1(146,392,196-149,441,454)x1 <i>dn</i>	3.1	<i>CNTNAP2</i>	105K
LIT-150-1	arr 7p22.1(5,337,072-6,316,915)x3 <i>dn</i>	1.0	<i>ACTB</i>	105K
LIT-147-1	arr 2p22.1p16.1(40,059,584-57,546,352)x3 <i>dn</i>	17.5	Daug genų	105K
LIT-136-1	arr 2p16.1p14.1(58,656,378- 68,790,747)x3 <i>dn</i>	10.2	<i>CRIP1a, OTX1</i>	105K
LIT-25-1	arr 4q28.3(137,417,138-138,947,393)x1 <i>mat</i>	1.5	<i>PCDH18</i>	105K
LT-34-1	arr 2q34(212,505,294-213,463,152)x1 <i>dn</i>	1.0	<i>ErbB4</i>	400K
LT-70-1	arr 16q22.3 (70,919,282-71,645,680)x1 <i>dn</i>	0.7	<i>ZFH3</i>	400K
LIT-54-1	arr 5q35.3 (176,728,738-176,992,730)x3. <i>dn</i>	0.3	<i>NSD1</i>	105 K
LT-49-1	arr 1p36.11(26,714,062-27,728,654)x1 <i>dn</i>	1.0	<i>ARID1A, PIGV, GPR3, FCN3</i>	400K
LT-68-1	arr 5p15.33p15.31(0-8,157,370)x1, 12q24.21q24.33(113,931,344-132,349,534)x3 <i>dn</i>	8.2 18.4	Nesubalansuota translokacija	400K
LT-59-1	arr 8p23.3p23.1 (0-7,036,726)x1, 15q26.1q26.3(90,515,060-100,338,915)x3 <i>dn</i>	7.0 9.9	Nesubalansuota translokacija	400K
LT-63-1	arr 11q23.3q25(120.505.418-134.452.384)x1 <i>dn</i>	13.9	Nesubalansuota translokacija	400K
LT-67-1	arr 4p16.3(0-4,194,871)x1, arr 11p15.5p145.4(0- 3,357,154)x3 <i>dn</i>	4.1 3.4	Nesubalansuota translokacija	400K
LT-36-1	arr 21q22.2q22.3(39,774,417-41,817,957)x3 21q22.3(41,817,957-46,944,323)x1 <i>dn</i>	2.0 5.0	<i>TRPM2, TSPEAR, PCNT, DIP2A ir S100</i>	400K
LT-38-1	arr 15q22.21q24.1(62,383,648-71,456,752)x3 <i>dn</i>	9.0	Daug genų	400K

Dauguma (29/30) kliniškai reikšmingų KSP yra didesni nei 500 kb. Tai patvirtina iškeltą hipotezę, kad patogeniniai KSP yra didesni nei 500 kb.

## **Patogeniniai chromosomų struktūros pokyčiai – žinomi sindromai**

7 iš 84 retų KSP sutampa su žinomų mikrodelecinių/mikrodublikacinių sindromų – *Angelman* (OMIM #176270/105830), *DiGeorge* (OMIM#188400), *Phelan-McDermid* (OMIM#606232), *Jakobsen* (OMIM#147791), 2q37 monosomijos ir 16p11.2 delecijos – kritinėmis sritimis. Remiantis KSP sutapimu su kritinėmis žinomų mikrodelecinių sindromų sritimis ir tipiniu atitinkamam sindromui klinikiu pasireiškimu bei pokyčių *de novo* kilme, del15q11.2, del22q11.2, del22q13.31, del11q23.3qter, del2q37.2qter, del16p11.2 interpretuojami kaip patogeniniai, lemiantys žinomus sindromus.

Daugumą žinomų sindromų lemia delecijos/dublikacijos, kurios susidaro dėl NAHR tarp *LCRs*, todėl nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai, nustatomi tiriamiesiems, kuriems įtariamas *Angelman*, *DiGeorge* ar 16p11.2 monosomijos sindromas, yra panašaus dydžio. Nežymūs skirtumai gali būti tik dėl skirtingos mikrolusto skiriamosios gebos.

Analizuojant klinikinius požymius ir chromosominius pokyčius, nustatytus tiriamuosiemis su *Phelan-McDermid*, *Jakobsen*, 2q37 monosomijos sindromu, pastebima, kad šiuos žinomus sindromus lemia skirtingo dydžio delecijos ar netgi skirtingi chromosominių persitvarkymų tipai. Pavyzdžiui, *Phelan-McDermid* sindromą lemia 100 kb–9 Mb dydžio delecijos, žiedinės chromosomos ar translokacijos (Dhar *et al.*, 2010).

### **LT-69-1, arr[hg18] 15q11.2q13.1(22,293,861-26,890,764)x1 dn**

vLGH (400K) metodu tiriant 11 mėn. berniuko DNR dėl vėluojančios psichomotorinės raidos, mikrocefalijos bei dismorfinių veido bruožų, 15-os chromosomos ilgajame petyje, 15q11.2 srityje (žr. priede A paveikslą) nustatyta intersticinė 4,6 Mb dydžio delecija, lemianti kliniškai atpažįstamą *PraderWilli/Angelman* mikrodelecinį sindromą. Ankstyvą *Angelman* sindromo diagnozę patvirtino SLŽA tyrimo rezultatas. Kadangi *Angelman* sindromo diagnostikai ypač svarbūs klinikiniai požymiai – kalbinės raidos atsilikimas, marionetės eiseną, ataksija, elgesio ypatumai (nemotyvuotas juokas,

hiperaktyvumas) – išryškėja vėlesniame amžiuje, toks ankstyvas diagnozės išaiškinimas padėjo išvengti papildomų tyrimų ir anksti buvo pateiktos rekomendacijos vaiko gydymui, ugdymui, gydytojų-specialistų sekimui ir prognozė šeimai.

**LT-43-1 arr[hg18] 22q11.21(17,018,751-19,795,282)x1 dn**

vLGH (400K) metodu nustatyta *de novo* 2,7 Mb dydžio intersticinė 22q11.21 srities delecija (žr. priede B paveikslą), apimanti kritinę *DiGeorge* sindromui sritį. 22q11.2 srities delecija, lemianti *DiGeorge* sindromą, yra viena dažniausių chromosominių ligų, jos dažnis populiacijoje yra apie 1/4000 naujagimių. Tokį didelį paplitimą lemia aplink kritinę sindromui sritį esantys LCRs, tarp kurių vyksta NAHR.

22q11.2 delecija paprastai lemia širdies ydas, imuninės sistemos nepakankamumą, elgesio sutrikimus, dismorfinius veido požymius. Iš visų 28 kritinėje *DiGeorge* sindromui srityje esančių genų stipriausias genas kandidatas yra *TBX1*. *TBX1* koduoja transkripcijos veiksni, kuris reguliuoja vystymosi procesus. Šio geno funkcijos yra geriausiai ištyrinėtos pelėse. *Tbx1* haplonepakankamumas pelėse dažniausiai lemia kraujagyslių defektus. Homozigotinės *Tbx1* delecijos pelėse lemia kitus *DiGeorge* sindromui specifinius požymius: skyd liaukės sutrikimus, širdies anomalijas ir kai kuriuos kaukolės bei skeleto defektus. Su elgesio sutrikimais yra siejami kiti *DiGeorge* sindromo kritinėje srityje esantys genai – *COMT*, *PRODH* (Paylor, 2001). Taškinės *PRODH* geno mutacijos yra siejamos su šizofrenija (Willis *et al.*, 2008). Tyrimuose su pelėmis nustatyta, kad *Dgcr8* haplonepakankamumas lemia miRNR biogenezės sutrikimą, kuris siejamas su elgesio sutrikimu (Stark *et al.*, 2008). miRNR paprastai dalyvauja genų raiškos reguliavime.

**LT-11-1, arr[hg18] 22q13.31q13.3(45834903-49529400)x1 dn**

vLGH (400K) metodu tiriant 2 m. berniuko DNR dėl psichomotorinės ir kalbinės raidos atsilikimo bei elgesio problemų, nustatyta *de novo* 3,8 Mb dydžio terminalinė 22q13.31qter srities delecija (žr. priede C paveikslą). Terminalinės 22-os chromosomos delecijos yra antrasis pagal dažnumą

subtelomerinis nesubalansuotumas po 1p36 delecijos. 22q13.3 delecijos sindromą, dar žinomą kaip *Phelan-McDermid* sindromą, lemia įvairaus dydžio delecijos 22-os chromosomos ilgojo peties terminalinėje dalyje. Iki šiol literatūroje aprašyta daugiau nei 100 *Phelan-McDermid* sindromo, kurį lemiančių delecijų dydžiai varijuoja nuo 100 kb iki 9 Mb, atvejų (Dhar *et al.*, 2010). Ankstyvame amžiuje *Phelan-McDermid* sindromo diferencinė diagnostika yra sudėtinga, nes specifiniai klinikiniai požymiai išryškėja vėliau. *Phelan-McDermid* sindromas dažniausiai diferencijuojamas su sutrikimais, kuriems būdinga hipotonija naujagimystėje, raidos atsilikimas, ypač kalbos raidos atsilikimas, autistinis elgesys, pvz., *Prader-Willi/Angelman* sindromais, autizmo spektro sutrikimais, cerebriniu paralyžiumi, velokardiofacialiniu, *Williams*, trichorinofalanginiu, *Smith-Magenis*, *Sotos* ir kt. sindromais (Phelan, 2008).

Kritinis genas, kurio haplonepakankamumas lemia neurologinius *Phelan-McDermid* sindromui būdingus simptomus, yra *SHANK3*. Tą patvirtina struktūriniai *SHANK3* geno persitvarkymai, nustatyti asmenims su panašia į *Phelan-McDermid* sindromo klinika, bei *SHANK3* funkciniai tyrimai. Berniukui su tipine *Phelan-McDermid* sindromui klinika buvo nustatyta *de novo* reciprokinė subalansuota translokacija –  $t(12;22)(q24.1;q13.3)$ , nutraukianti *SHANK3* geno seką ties 21-u egzonu (Bonaglia *et al.*, 2001). Be to, yra aprašytos dalies *SHANK3* geno delecijos asmenims su vidutine INN, kalbos raidos sutrikimu ir autizmo požymiais (Durand *et al.*, 2007). *SHANK3* geno svarbią biologinę funkciją įrodo šio geno raiškos tyrimai pelėse (Roussignol *et al.*, 2005). Didžiausia *Shank3* raiška vyksta smegenų žievėje, smegenėlėse ir hipokampe. Genas koduoja baltymą, svarbų jaudinančių neuronų postsinapsinio tankio stabilumui. Todėl *Shank3* geno haplonepakankamumas, esant 22q13 delecijai, gali susilpninti dendritinių ataugų formavimąsi ir netgi lemti sinapsių degradaciją, o tai pasireiškia kognityvinių ir motorinių funkcijų sutrikimu.

**LT-63-1 arr[hg18] 11q23.3q25(120,505,418-134,452,384)x1**

vLGH (400K) metodu nustatyta 13,9 Mb dydžio subtelomerinė 11-os chromosomos ilgojo peties delecija (del11q23.3qter) (žr. priede D paveikslą) berniukui su stebimu raidos atsilikimu, trombocitopenija, kurtumu ir dismorfiniiais požymiais, tokiais kaip makrocefalija, trumpas kaklas, hipertelorizmas, žvairumas, epikantas, įstriži žemyn vokų plyšiai, plati nosies nugarėlė, V-formos lūpos, plona viršutinė lūpa, žemai prisitvirtinusios deformuotos ausys, retrognatija, brachidaktilija, trumpa stora pėda, II ir III kojos piršto odos sindaktilija, kapšelio deformacija. Nustatyta delecija lemia žinomą *Jacobsen* sindromą.

Delecijai patvirtinti ir jos kilmei nustatyti pasirinktas FISH metodas patikslino vLGH tyrimo rezultatus. Atlikus FISH tyrimą tėvams, nustatyta, kad motina yra subalansuotos translokacijos tarp 11q23.3ter ir 13-os chromosomos satelitų nešiojoja. Taigi, terminalinę 11q23qter deleciją lėmė iš motinos paveldėta translokuota 11-a chromosoma. Gauti tyrimų rezultatai leido patikslinti šeimos prognozę palikuonims. *De novo* delecijos atveju pasikartojimo šeimoje rizika būtų bendrapopuliacinė (iki 1 %), o šiuo atveju tikimybė paveldėti pakitusią 11-ą chromosomą su ilgojo peties delecija yra apie 25 %.

**LIT-227-1 arr[hg18] 2q37.3 (239,525,614-242,717,216)x1 dn**

vLGH (105K) metodu nustatyta 3,0 Mb dydžio subtelomerinė 2-os chromosomos ilgojo peties delecija (del2q37.3-qter) (žr. priede E paveikslą) mergaitei su psichomotorinės raidos atsilikimu, epilepsija, stereotipiniais judesiais, hipotelorizmu, siaura viršutine lūpa, hipertrichoze nugaros srityje ir pirštų anomalijomis. Nustatyta delecija lemia žinomą *Brachydactyly mental retardation* sindromą (OMIM#600430), kuriam būdingi nespecifiniai požymiai: INN, raidos atsilikimas, elgesio problemos, miego sutrikimas, nutukimas, kaukolės-veido ir kaulinės sistemos anomalijos, bendri *Smith-Magenis* (OMIM#182290), *Prader-Willi* (OMIM#176270), *Angelman*

(MIM#105830) ir *fragile-X* (OMIM#300624) sindromams. Dažniausi klinikiniai simptomai yra elgesio problemos ir galūnių anomalijos, kitų fenotipinių požymių pasireiškimas priklauso nuo delecijos dydžio ir kitų KSP genome.

Visai neseniai, tiriant pacientus, kuriems įtariamas *Smith-Magenis* sindromas, buvo nustatyta kritinė 200 kb dydžio sritis (2q37.3), apimanti *HDAC4* geną, kurio haplonepakankamumas lemia INN, brachidaktiliją ir dismorfinius požymius: apvalų veidą, galias akis, ploną viršutinę lūpą (Williams *et al.*, 2010). *HDAC4* koduoja histono deacetilazę, kuri reguliuoja genus, svarbius skeleto, raumenų, CNS ir širdies vystymuisi. *HDAC4*, kaip geną kandidatą, kurio haplonepakankamumas lemia INN ir galūnių anomalijas, patvirtina šio geno *de novo* mutacijos, nustatytos asmenims su kognityvinių funkcijų sutrikimu ir brachidaktilija. Vidugeninė *HDAC4* delecija, galimai sutrikdanti normalų sukirpimą, ir vidugeninė *HDAC4* insercija, lemianti rėmelio poslinkio mutaciją – *stop* kodono susidarymą. Homozigotinės *Hdac4* geno mutacijos lemia sunkias kaulinės sistemos anomalijas. Williams *et al.* (2010) atliktas *HDAC4* raiškos tyrimas asmenų, turinčių *HDAC4* deleciją arba mutaciją šiame gene, kraujyje parodė, kad *HDAC4* haplonepakankamumas lemia sumažėjusią *RAII* raišką, būdingą *Smith-Magenis* sindromui.

**LIT-29-1 arr[hg18] 16p11.2 (29,563,985-30,106,254)x1 mat**

**LIT-216-1 arr[hg18] 16p11.2 (29,563,985-30,106,254)x1 dn**

Intersticinės 16p11.2 srities delecijos (priede F paveikslas) yra vienos dažniausių pasikartojančių KSP, kurių klinikinės pasekmės labai varijuoja. Išsami *de novo* ir paveldėtos delecijų analizė aprašyta Ciuladaite *et al.* (2011) straipsnyje.

**LIT-19-1 arr[hg18] 16p13.3 (2,589,524-3,911,387)x3 dn**

Mergaitei su lengva INN, grubiais veido bruožais bei galūnių (pirštų) anomalijomis vLGH (105K) metodu nustatyta *de novo* 1,3 Mb dydžio intersticinė 16p13.3 srities duplikacija, apimanti kritinę *Rubinstein-Taybi* sindromui (OMIM#180849) sritį (žr. priede G paveikslą). 16p13.3 duplikacija

lemia atpažįstamą sindromą, kuriam būdinga įvairaus laipsnio INN, kalbos sutrikimas, normalus augimas, grubūs veido bruožai: siauros akys, ptozė, ilgas filtrai, žemai prisitvirtinusios ausys, bei galūnių anomalijos. Literatūroje aprašytų bei *DECIPHER* duomenų bazėse paskelbtų 16p13.3 duplikacijų dydis varijuoja nuo 240 kb iki 12 Mb, dauguma jų yra terminalinės. Demeer *et al.* (2013) aprašytas mažiausios (240 kb) intersticinės 16p13.3 duplikacijos atvejis (arr16p13.3(3,714,913-3,945,522)x3dn, hg18) susiaurino kritinę šiam sindromui sritį iki 230 kb dydžio. Kritinė sritis, apimanti vienintelį geną *CREBBP*, patvirtina anksčiau iškeltą hipotezę, kad *CREBBP* genas yra dozei jautrus. *CREBBP* haplonepakankamumas, lemiantis *Rubinstein-Taybi* sindromą, pažeidžia tas pačias organų sistemas kaip ir per didelė šio geno raiška. *CREBBP* koduoja histonų aciltransferazę, atliekančią transkripcijos aktyvatoriaus funkciją. *CREBBP* reikšmę kaulinės sistemos vystymuisi įrodo eksperimentai su pelėmis. Pelėse, neturinčiose normalaus *Crbbp* alelio (Tanaka *et al.*, 2007), ir pelėse, viename iš dviejų *Crbbp* alelių turinčiose mutaciją, kuri lemia sutrumpėjusio baltymo sintezę (Oike *et al.*, 1999), buvo stebimos skeleto anomalijos. Tai įrodo, kad *CREBBP* yra dozei jautrus, pasikeitęs šio geno produkto kiekis sutrikdo kaulinės sistemos vystymąsi. Be to, *crbbp* sutrumpėjimas lemia pelių ilgalaikės atminties sutrikimą (Oike *et al.*, 1999).

### **Nauji patogeniniai KSP**

Per pastaruosius kelerius metus, INN diagnostikai pradėjus taikyti molekulinio kariotipavimo metodus, aprašyta daug naujų mikrodelecinių ir mikroduplikacinių sindromų. Kiekvienas naujas sindromas atskleidžia tam tikros genomo srities reikšmę fenotipui, padeda nustatyti genus kandidatus INN ir kai kuriais atvejais netgi padeda išaiškinti naujus KSP patogeniškumo mechanizmus.

Kiekvienas iš nustatytų naujų kliniškai reikšmingų chromosominių pokyčių yra unikalus, tik iš dalies sutampantis su anksčiau aprašytais atvejais. Analizuojant šalia trūkio taškų esančias DNR sekas, nebuvo rasta LCR. Tikėtina, kad naujų patogeninių pokyčių susidarymą lėmė ne NAHR, bet kiti



mechanizmai – SSA, *MMBIR/FoSTeS* ar *RS*. Tandeminių duplikacijų atsiradimas gali būti susijęs su *RS*, o sudėtingų chromosominių persitvarkymų – su *MMBIR/FoSTeS*. Tačiau tai yra tik hipotezės, norint tiksliai nustatyti mechanizmą, lėmusį pokytį, reikėtų sekvenuoti aplink trūkio taškus esančias sekas.

**LIT-138-1 arr[hg18] 2q24.2q24.3(162,118,995-164,461,141)x1 dn**

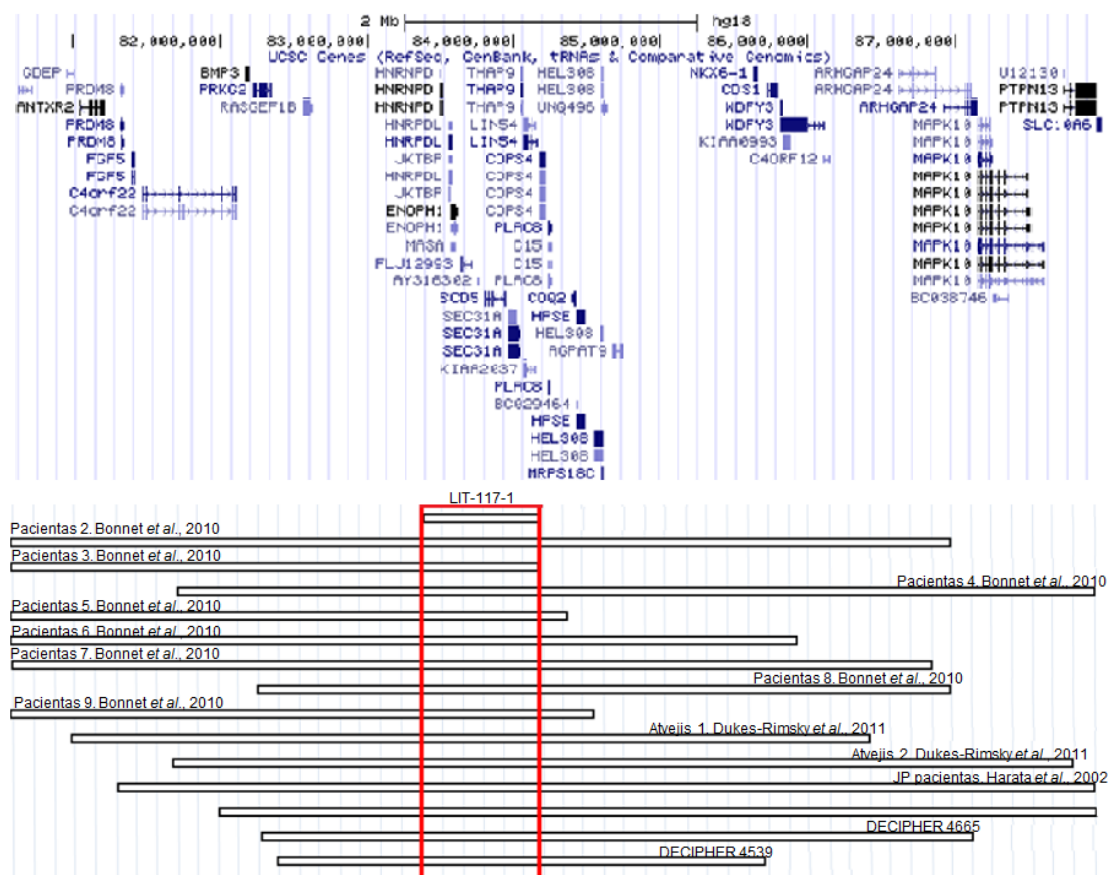
Berniukui, turinčiam INN ir hipotoniją, vLGH (105K) metodu nustatyta *de novo* 2,3 Mb dydžio intersticinė delecija 2q24.2-q24.3 regione, apimanti 9 genus: *SLC4A10*, *DPP4*, *GCG*, *FAP*, *IFIH1*, *GCA*, *KCNH7*, *FIGN* (žr. priede H paveikslą). Remiantis žinoma šių genų funkcija ir raiškos pobūdžiu, stipriausi genai kandidatai INN ir hipotonijai, stebimiems tiriamajam (LIT-138-1), yra *SLC4A10*, *KCNH7*. *SLC4A10* koduoja į natrio bikarbonatų nešiklį panašų baltymą. Stipriausia šio geno raiška vyksta CNS (Jacobs *et al.*, 2008). *SLC4A10* geno jautrumą dozei ir svarbą CNS įrodo Gurnett *et al.* (2008) aprašytas subalansuotos translokacijos atvejis – t(2;13)(q24;q31). Mergaitei su vidutine INN, progresuojančiu kognityvinių funkcijų sutrikimu ir epilepsija buvo nustatyta subalansuota translokacija, nutraukianti *SLC4A10* geno seką tarp 2 ir 3 egzono. Kiekybinis raiškos tyrimas kraujyje parodė 48 % sumažėjusį *SLC4A10* mRNA transkriptų kiekį. Be to, yra aprašytos ir kitų natrio bikarbonatų nešiklių šeimai priklausančių genų mutacijos, siejamos su INN (Igarashi *et al.*, 2001). *KCNH7* genas priklauso kalio jonų kanalų šeimai. Šio grupės genai dalyvauja neuronų sužadinyje, neurotransmiterių išmetime, širdies susitraukimo dažnių reguliavime, insulino sekrecijoje. Papa *et al.* (2003) atlikti kalio jonų kanalus koduojančių genų raiškos tyrimai parodė, kad *KCNH7* reiškiasi skirtinguose CNS regionuose, todėl gali skirtingai reguliuoti neuronų, dalyvaujančių keliuose tinkluose, sujaudinimą .

**LIT-117-1 arr[hg18] 4q21.22(83,373,844-84,097.897)x1 dn**

vLGH (105K) metodu nustatyta 724 kb dydžio *de novo* intersticinė 4q21.22 srities delecija (žr.priede I paveikslą) dalinai persidengia su naujai aprašytu kliniškai atpažįstamu mikrodeleciniu 4q21 sindromu. Šiam 4q21.22

mikrodeleciniam sindromui būdingi charakteringi požymiai: mažas ūgis, hipotonija kūdikystėje, nutukimas, prognatija, nedidelės plaštakos ir pėdos, skersinė raukšlė delne, brachidaktilija stebimi ir tiriamajai (LIT-117-1).

Bonnet *et al.* (2010) atlikę 4q21 delecijų genotipo-fenotipo analizę apibrėžė 1.37 Mb dydžio kritinį regioną, apimantį 5 genus – *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL* ir *ENOPH1*. Įvertinę molekulinę ir biologinę šių genų funkcinę svarbą bei raiškos pobūdį, autoriai išskyrė – *PRKG2*, *RASGEF1B* kaip stipriausius genus kandidatus, lemiančius sunkią INN, kalbos raidos bei augimo atsilikimą.



4.11 paveikslas. Kritinis regionas 4q21 mikrodeleciniam sindromui (apibrėžtas raudonu stačiakampiu. Atlikus delecijų 4q21 regione genotipo-fenotipo koreliaciją, nustatytas kritinis šiam sindromui regionas (chr4:83273844 – 84066553, hg18).

Probandei (LIT-117-1) nustatyta 724 kb delecija 4q21 srityje tik dalinai persidengia su Bonnet *et al.* identifikuota kritine sritimi ir neapima, šių autorių nuomone, stipriausių genų kandidatų (*PRKG2*, *RASGEF1B*) (4.11 pav.).

Tiriamajai (LIT-117-1) nustatyta 724 kb delecija 4q21 srityje apibrėžia naują kritinį regioną (chr4:83273844 – 84066553, hg18) (4.11 pav.), bendrą visiems iki šiol paskelbtiems 4q21 sritį apimančių delecijų atvejams, su bendrais šiam sindromui klinikiniais požymiais – hipotonija kūdikystėje, atsiliekančiu augimu, mažomis plaštakomis ir specifiniais dismorfiniais požymiais. Su šia naujai apibrėžta kritine sritimi nepersidengia tik vienintelis *DECIPHER 1571* atvejis, kuriam nėra būdingi pagrindiniai 4q21 sindromui požymiai. Taigi, 4q21 sindromui kritinė sritis yra tarp 83273844 bp ir 84066553 bp. Stipriausi genai kandidatai, esantys šioje genetinėje srityje yra *HNRPDL* ir *HNRNP*. Šie genai reguliuoja ląstelių ciklą, transkripciją ir mRNR stabilumą. Reikalingi gyvūnų modeliai, įrodantys šių genų haplonepakankamumą, lemiantį minėtam sindromui būdingą kliniką.

**LIT-123-1 arr[hg18] 7q35q36.1(146,392,196-149,441,454)x1 dn**

vLGH (105K) metodu nustatyta 3,1 Mb dydžio *de novo* intersticinė 7q35-q36.1 srities delecija (žr. priede K paveikslą) berniukui, turinčiam vidutinę INN, su dismorfiniais požymiais: makrocefalija, žemai prisitvirtinusiomis atlėpusiomis ausimis, siaurais akių plyšiais, stora apatine lūpa.

10cM dydžio regionas siejams su kalbos atsilikimu. Neparametrinės sankibos analizės metodu tiriant 152 šeimas, nustatytas 10 cM dydžio regionas, esantis 7q35 srityje, siejamas su autizmu. Šios genetinės srities sąsają su kalbos raidos sutrikimu bei autizmu patvirtina ir citogenetinių tyrimų rezultatai. Įvairaus dydžio 7q35-36.1 delecijos nustatytos asmenims su kalbos raidos sutrikimu ir elgesio problemomis (Bisgaard *et al.*, 2006; Rosi *et al.*, 2008; Coselli *et al.*, 2008; Sehested *et al.*, 2010). Pool *et al.* (2010) aprašė *de novo* subalansuotą chromosominį persitvarkymą – inversiją, nutraukiančią *CNTNAP2* geno seką, nustatytą berniukui su kalbos raidos sutrikimu ir autizmu.

**LT-49-1 arr[hg18] 1p36.11(26,714,062-27,728,654)x1 dn**

vLGH (400K) metodu nustatyta *de novo* intersticinė 1p36.11 srities delecija (žr. priede L paveikslą) mergaitei su klinika, būdinga 1p36.11

mikrodeleciniam sindromui. Nors klinika panaši į 1p36 sindromą, tačiau tiriamajai (LT-49-1) nustatyta delecija nepersidengia su kritinėmis 1p36 sindromui delecijomis.

1p36 regionas pasižymi dideliu genų tankiu bei didele delecijų įvairove. Skiriamos distalinės ir proksimalinės 1p36 srities delecijos, kurių dydis labai varijuoja. Dažniausios yra distalinės (tipinės) 1p36 delecijos, esančios iki 10 Mb atstumu nuo 1p telomeros (1p36.23-pter).

Įdomu tai, kad distalinės ir proksimalinės 1p36 srities delecijoms būdingi bendri klinikiniai požymiai: raidos atsilikimas, klausos sutrikimas, įgimtos širdies ydos, hipotonija ir dismorfiniai požymiai, tokie kaip mikrocefalija, plati nosies nugarėlė, deformuotos ausys. Pagrindiniai klasikinių distalinių ir atipinių proksimalinių 1p36 delecijų klinikinių požymių skirtumai yra antakių forma (distalinės 1p36 sindromui būdingi tiesūs antakiai, o proksimalinei 1p36 delecijai – lenkti antakiai). Be to, proksimalinei 1p36 delecijai būdinga galūnių anomalijos, maitinimosi sunkumai, plaukuotumas. Yra išskirti 2 galimai kritiniai 1p36 fenotipui regionai, vienas jų yra 1,7–1,9 Mb (Rosenfeld *et al.*, 2010), kitas – 9,0–11,3 Mb (Kang *et al.*, 2007).

Nepaisant bendrų klinikinių požymių, tiriamajai (LT-49-1) nustatyta intersticinė 1p36.11 srities delecija nepersidengia nei su vienu iš šių kritinių regionų ir iki šiol nėra žinomas vienintelis genas kandidatas, kurio haplonepakankamumas lemtų šiam sindromui būdingus klinikinius požymius. Atsižvelgiant į tai, kad skirtingos, netgi nepersidengiančios 1p36 srities delecijos lemia labai panašią kliniką, tikėtina, kad klinikinius požymius lemia ne vieno geno pokytis, o pakitusi kelių genų raiška dėl padėties efekto. Raiška gali pakisti dėl pasikeitusios chromatino kondensacijos, pvz., šalia euchromatininės srities esančių genų raiška gali sumažėti jiems esant prie heterochromatininės srities. Be to, dėl delecijos gali būti prarastos arba nutrauktos transkripcijos vienetai prisijungimui svarbios reguliacinės sekos arba įvykus delecijai šalia atsidūrę genai gali konkuruoti dėl tos pačios reguliacinės sekos.

Vienas iš stipriausių genų kandidatų, galimai lemiančių tiriamosios (LT-49-1) klinikinius požymius, yra *ARIDIA*. Šio geno produktas yra chromatino permodeliavimo komplekso komponentas, svarbus genų transkripcijos procese. *ARIDIA* geno mutacijos lemia autosominiu dominantiniu būdu paveldimą INN (OMIM#614607). Tsurusaki *et al.* (2012) aprašė tris pacientus su INN ir dauginėmis raidos anomalijomis, kuriems buvo įtariamas *Coffin Siris* sindromas (OMIM#135900). Jiems buvo nustatytos ir aprašytos *ARIDIA* geno mutacijos. Dauguma minėtam sindromui būdingų požymių – INN, *corpus callosum* agenezė, širdies yda, ilgos blakstienos, ausų anomalijos, maitinimosi problemos kūdikystėje – būdingi ir tiriamajai (LT-49-1). Šio geno haplonepakankamumas gali lemti minėtus klinikinius požymius ne tiesiogiai, o reguliuodamas kitų genų raišką. Tikėtina, kad *ARIDIA* sumažėjusi raiška lemia 1p36 sindromo kritinėje srityje esančių genų nepakankamą raišką.

Kitas galimas genas kandidatas, kurio haplonepakankamumas gali lemti tiriamajai (LT-49-1) stebimą INN, klausos sutrikimą ir dismorfinius požymius, yra *PIGV* genas. Šis genas koduoja manoziltransferazę, kuri dalyvauja glikozilfosfatidilinozitolio (GFI) sintezėje, prijungdama prie jo manozės liekaną. GFI yra glikolipidas, kuris prijungia įvairius baltymus prie ląstelės paviršiaus (Kang *et al.*, 2005). Žinoma daugiau nei 100 žmogaus organizmo baltymų, pradedant fermentais ir baigiant adhezijos molekulėmis, kurių apykaitoje dalyvauja GFI (Krawitz *et al.*, 2010). *PIGV*, genų mutacijos sukelia hiperfosfatazijos su INN sindromą (OMIM#239300). Iki šiol yra aprašyta mažiausiai 14 pacientų su šio geno mutacija (Thompson *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2010). Šiam sindromui būdingi klinikiniai požymiai: INN, vėluojanti kalbos raida arba visiškai kalbos nebuvimas, kurtumas, kraujyje padidėjęs šarminės fosfatazės aktyvumas ir dismorfiniai požymiai, tokie kaip hipertelorizmas, ilgi vokų plyšiai, plati nosies nugarėlė ir nosies galiukas, palapinės formos burna, trumpi galiniai pirštikauliai. Nors tiriamoji (LT-49-1) turi požymių, būdingų šiam sindromui, tokių kaip INN, kalbos nebuvimas, neurosensorinis kurtumas, plati nosies nugarėlė, tačiau šarminės fosfatazės aktyvumas, kuris yra padidėjęs visų pacientų, turinčių hiperfosfatazijos su INN

sindromą, kraujyje, yra normalus. Duomenų apie *PIGV* geno mutacijų pasekmes yra nepakankamai. Iki šiol aprašytos tik *missens* tipo mutacijos galbūt dėl to, kad kitokio tipo mutacijos yra nesuderinamos su gyvybe. Eksperimentai su pelių modeliais pabrėžia GFI svarbą normaliam organizmo vystymuisi ir funkcionavimui. GFI biosintezės reakcijų sutrikdymas lemia embriono žūtį (Nozaki *et al.*, 1999). Didžiausia *PIGV* geno raiška vyksta sėklidėse ir įvairiose smegenų struktūrose, todėl manoma, kad jo haplonepakankamumas gali sutrikdyti nervų sistemos funkciją ir lemti INN.

*GPR3* ir *FCN3* genų raiškos ar funkcijos nepakankamumas taip pat gali lemti dalį klinikinių požymių. *GPR3* genas koduoja su G baltymu susijusį receptorių. Pagrindinė šio geno raiška vyksta smegenyse ir lytinėse liaukose. Šio receptoriaus aktyvacija lemia cAMF, kuris reguliuoja daugelį neuronų funkcijų: ląstelės išgyvenamumą, diferenciaciją, neuritų augimą, aksonų formavimąsi ir regeneraciją. Tanaka *et al.* (2007) nustatė, kad sustabdžius *gpr3* raišką žiurkėms reikšmingai sumažėja neuritų augimas smegenėlių neuronuose. Tačiau duomenų apie žmonių *GPR3* haplonepakankamumą nėra. *FCN3* koduoja fikoliną-3, kuris dalyvauja aktyvinant komplemento sistemą kaip atpažinimo molekulė. Šio geno mutacijos lemia imunodeficitą (OMIM#613860). Muthe-Fog *et al.* (2009) aprašė homozigotinę šio geno mutaciją, lemiančią pasikartojančias infekcijas ir smegenų abscesus. Apie šio geno kliniškai reikšmingą haplonepakankamumą duomenų nėra. Galbūt tiriamoji (LT-49-1) turi mutaciją likusiame alelyje. Tokiu atveju vieno *FCN3* alelio delecija ir mutacija likusiame alelyje lemtų recesyvę būklę, susijusią su imonodeficitu.

#### LIT-54-1 arr[hg18] 5q35.3(176,728,738-176,992,730)x3 dn

vLGH metodu nustatyta intersticinė *de novo* 264 kb dydžio 5q35.3 srities duplikacija (žr. priede M paveikslą) tiriamajai (LIT-50-1) su *Sotos* sindromui būdingu fenotipu. Mokslinėje literatūroje paskelbti keturi klinikiniai 5q35.3 srities duplikacijos atvejai (Chen *et al.*, 2006; Kirchhoff *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2010). Visiems jiems būdingas specifinis fenotipas – mikrocefalija, žemas

ūgis ir psichomotorinės raidos atsilikimas. Minėtų duplikacijų atvejais atkreipiamas dėmesys į *NSDI* geną, kurio haplonepakankamumas lemia *Sotos* sindromą. Taigi, *NSDI* yra dozei jautrus genas. *NSDI* dozės perteklius galimai susijęs su atvirksčiu *Sotos* sindromui fenotipu – mikrocefalija ir žemu ūgiu.

Tiriamajai (LIT-50-1) nustatyta duplikacija, priešingai nei iki šiol žinomi 5q35.3 srities duplikacijų atvejai, neapima *NSDI* geno ir lemia pagreitėjusio augimo kliniką, būdingą *Sotos* sindromui. *Sotos* sindromą lemia *NSDI* geno haplonepakankamumas dėl taškinių šio geno mutacijų arba delecijų (Douglas *et al.*, 2003; Douglas *et al.*, 2005), todėl tikėtina, kad tiriamajai (LIT-50-1) nustatyta 5q35.3 srities duplikacija, esanti 69 kb atstumu prieš *NSDI*, gali nutraukti *NSDI* geno raiškai svarbias reguliacines sekas arba sutrikdyti geno raišką dėl pozicijos efekto.

Išsamus šio atvejo klinikinis aprašymas ir pokyčio analizė, įrodanti, kad, vertinant kopijų skaičiaus pokyčių patogeniškumą, nepakanka atsižvelgti į pokyčio tipą, dydį ir genus, į tai, kurių kopijų skaičius pakinta, o svarbu įvertinti ir šalia esančių, ypač dozei jautrių genų molekulinę ir biologinę funkciją, raiškos pobūdį – tai aprašyta Kasnauskiene *et al.* (2011) straipsnyje.

**LT-36-1 arr[hg18] 21q22.3(41,817,957-46,944,323)x1 dn, 21q22.2q22.3 (39,774,417-41,817,957)x3 dn**

14 m. berniukui dėl kalbos raidos atsilikimo, neadekvačių emocijų (juoko protrūkių) ir keleto fenotipo ypatumų – asteninio kūno sudėjimo, dermatoglifikos pokyčių bei pėdų pirštų arachnodaktilijos – buvo atliktas vLGH tyrimas (400K). Nustatytas kliniškai reikšmingas sudėtingas *de novo* chromosominis persitvarkymas – 5,1 Mb terminalinė delecija 21q22.3-qter ir intersticinė 2,1 Mb 21q22.2-q22.3 duplikacija (žr. priede N paveikslą). Delecija patvirtinta subtelomeriniu FISH metodu, duplikacija – TL-PGR metodu.

*De novo* terminalinė 21q22.3-qter delecija apima daugiau kaip 100 genų, tarp jų *TRPM2*, *TSPEAR*, *PCNT*, *DIP2A* ir *S100*, kurių funkcijos netekimas gali būti siejamas su kalbos raidos arba emocijų kaita. Atliekant tyrimus su

pelėmis, nustatyta, kad regiono, atitinkančio (homologinę) žmogaus 22q22.3 sritį, delecija lemia kognityvinių funkcijų sutrikimus (Yu *et al.*, 2010). Šioje genetinėje srityje esantys *TRPM2* ir *TSPEAR* yra genai kandidatai bipoliams afekciniams sutrikimams (McQuillin *et al.*, 2006). Sankibos analize nustatytas ryšys tarp *TRPM2* ir bipolių efektinių sutrikimų (Kato, 2007). *TRPM2* koduoja kalcio jonų kanalų receptorių ir yra susijęs su oksidacinio streso indukuota ląstelių žūtimi bei uždegiminiais procesais. *TSPEAR* koduoja 21-os chromosomos atviro skaitymo rėmelio 29 peptidą, turintį su epilepsija susijusį pasikartojimą. Su kalbos raidos sutrikimu susijusią sritį susiaurino Poelmans *et al.* (2009). Jie aprašė kalbos sutrikimo ir 176 kb dydžio delecijos šeimoje atvejį (Poelmans *et al.*, 2009). Ši aprašyta delecija apima keturis genus: *PCNT*, *DIP2A*, *S100B* ir *PRMT2*. Atsižvelgiant į šių genų raiškos pobūdį bei funkciją, manoma, kad *PCNT*, *DIP2A*, *S100B* haplonepakankamumas lemia kalbos sutrikimą (dislekciją). *PCNT* koduoja pericentrinę, kuris plačiai ekspresuojamas centrosomose ir yra svarbus normaliam centrosomų ir citoskeleto funkcionavimui, ląstelių ciklo progresijai (Takahashi *et al.*, 2003). Pericentrinas jungiasi prie šizofrenijos atveju sutrikdomo (*DISC1*) baltymo (Miyoshi *et al.*, 2004), todėl manoma, kad *PCNT* yra genas kandidatas smegenų funkcijos sutrikimams. *DIP2A* koduoja baltymą, kuris dalyvauja glutamato receptoriaus veikimo kelyje ir yra svarbus sinapsių plastiškumo reguliavimui. *S100B* koduoja kalcį prisijungiantį baltymą ir turi parakrininį ir autokrininį efektą neuronų ir glijos ląstelėms. Didžiausia *DIP2A* ir *S100B* genų raiška vyksta smegenyse, ypač hipokampe (Yu *et al.*, 2001; Rothermundt *et al.*, 2003).

*De novo* intersticinė 21q22.2-q22.3 duplikacija apima 26 genus. Tarp duplikuotų genų yra dozei jautrūs *PCP4* ir *DSCAM* genai, kurių raiška ir funkcijos geriausiai ištyrinėtos pelėse. *Pcp4* raiška vyksta pomitotinėse ektodermos ir neuroectodermos ląstelėse pelės embriogenezės metu (Reymond *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003). *PCP4* moduliuoja kalmodulino aktyvumą, aktyvuodamas kalcio sąveiką su kalmodulinu per rūgštinį IQ motyvą, taigi reguliuoja  $Ca^{2+}$ -CaM taikinių aktyvumą, ypač daugiafunkcės proteinkinazės



CaMKII, kuri yra svarbi neuronų diferenciacijai ir neuronų plastiškumui. *PCP4* geno dozės padidėjimo reikšmę neuronų diferenciacijai pademonstravo Mouton-Liger *et al.* (2011) atlikdami eksperimentus su pelėmis. Transgeninėse pelėse, turinčiose papildomą *pcp4* geno kopiją, buvo stebima padidėjusi šio geno raiška, kuri lėmė padidėjusį proteinkinazės CaMKII aktyvumą bei ankstyvą neuronų diferenciaciją (Mouton-Liger *et al.*, 2011). *DSCAM*, kuris yra kritiniame Dauno sindromui regione, raiška vyksta centrinėje ir periferinėje nervų sistemoje. *DSCAM* koduojamos nervų sistemos adhezijos molekulės yra svarbios sinapsių plastiškumui, aksonų valdymui, todėl manoma, kad padidėjusi *DSCAM* raiška lemia ne tik Dauno sindromui būdingus struktūrinius pokyčius smegenyse, bet ir mokymosi bei atminties sutrikimus suaugusiems (Barlow *et al.*, 2002).

**LIT-38-1 arr[hg18] 15q22.21q24.1(62,383,648-71,456,752)x3 dn**

vLGH (400K) metodu nustatyta *de novo* intersticinė 15q22.21-24.1 duplikacija (žr. priede O paveikslą) tiriamajai (LT-38-1) su dauginiais raidos defektais, įgimta širdies yda, grubiais veido bruožais ir nutukimu. Duplikacija patvirtinta FISH metodu. Kadangi duplikacija yra 9,1 Mb dydžio, apimanti 145 genus, sunku išskirti geną kandidatą, kurio dozės pokytis būtų susijęs su tiriamosios klinika. Be to, kliniškai reikšmingas gali būti ne tik duplikuotų genų raiškos padidėjimas, bet ir šalia duplikacijos esančių genų raiškos pasikeitimas dėl padėties efekto. Manoma, kad dauginius raidos defektus, širdies ydą ir grubius veido bruožus lėmė ne vieno geno pokytis, bet bendras daugelio genų raiškos pasikeitimas. Nors duplikacijos paprastai yra ne tokios kliniškai reikšmingos, šis intersticinės duplikacijos atvejis neabejotinai yra patogeninis, atsižvelgiant į duplikacijos dydį ir *de novo* pokyčio kilmę.

**LIT-136-1 arr[hg18] 2p16.1p14.1 (58,656,378- 68,790,747)x3 dn**

vLGH (1050K) metodu nustatyta *de novo* intersticinė 10,1 Mb dydžio 2p14.1-p16.1 srities duplikacija (žr. priede P paveikslą) tiriamajam su INN, elgesio problemomis – hiperaktyvumu, per dideliu apetitu, pasikartojančiomis kvėpavimo takų infekcijomis, epilepsija bei dismorfiniais požymiais.

Intersticinės 2-os chromosomos duplikacijos yra retos. Aprašyta tik keletas duplikacijų, persidengiančių su 2p14-p16.1 sritimi (Yunis *et al.*, 1979; Fryns *et al.*, 1989; Guilherme *et al.*, 2009); dauguma jų identifiikuotos rutiniu G dažymo metodu, be detalaus molekulinio aprašymo. DECIPHER duomenų bazėje pateikti tik 3 intersticinių 2p14-2p16.1 srities duplikacijų atvejai: 248649, 249336, 249738. Dar retesnės yra intersticinės 2-os chromosomos delecijos, todėl manoma, kad dauguma šioje genetinėje srityje esančių genų yra dozei jautrūs. Sudėtinga vertinti fenotipo-genotipo koreliaciją, nes intersticinių duplikacijų patogeniškumą gali lemti ne tik per didelė genų dozė, bet ir kiti mechanizmai – padėties efektas, geno ar jo reguliacinių sekų nutraukimas įsiterpimo vietoje.

Tiriamajam (LIT-136) nustatytos 10,13 MB dydžio patogeniškumas nekelia abejonių dėl pokyčio dydžio ir *de novo* kilmės. Nustatyta duplikacija apima 47 genus. Daugumos jų raiška vyksta CNS, todėl gali būti svarbūs smegenų vystymuisi. Remiantis biologine duplikuotų genų funkcija, atrinkti du stipriausi genai kandidatai – *CRIP1a* ir *OTX1*, kurių dozės pasikeitimas galėjo būti svarbus INN patogenezei. *CRIP1a* koduoja su kanabinoidų receptoriais sąveikaujantį baltymą, kuris yra svarbus sinapsių plastiškumui, skausmo nejutimui, apetitui ir neuronų apsaugai (Niehaus *et al.*, 2007), todėl padidėjusi šio geno raiška gali būti susijusi su nevaldomu apetitu, hiperaktyvumu bei INN. *OTX1* koduoja transkripcijos veiksnio, kuris dalyvauja smegenų ir jutiminių organų vystymesi, domeną. *OTX1* yra svarbus tarpinių ir vidurinių smegenų bei smegenėlių vystymuisi ir gilesnių kortikoidinių sluoksnių neuronų diferenciacijai (Larsen *et al.*, 2010).

Įdomu tai, kad tiriamajam (LIT-136) stebima akantozė, nutukimas bei dažnos kvėpavimo takų infekcijos būdinga *Alstrom* sindromui (OMIM#203800), kuri lemia *ALMS1*, esančio 2p13 srityje, mutacijos. Manoma, kad 10,1 Mb dydžio 2p14-p16.1 duplikacijos patogeniškumą lemia ne tik padidėjusi genų dozė, bet ir kiti mechanizmai – padėties efektas arba įsiterpimo vietoje esančio geno ar jo reguliacinių sekų nutraukimas. Didelės duplikacijos gali pakeisti chromatinio kondensacijos laipsnį ir turėti įtakos šalia

esančių genų raiškai. Be to, nustatyta duplikacija gali būti ne tandeminė, o įsiterpusi į *ALMS1* geną. Šioms hipotezėms patikrinti reikalingi papildomi tyrimai – *ALMS1* raiškos tyrimas. Nustačius sumažėjusią *ALMS1* geno raišką, įdomu būtų išsiaiškinti, kas tai lėmė – galbūt duplikuoto fragmento įsiterpimas į *ALMS1* geną. Į šį klausimą galėtų padėti atsakyti NGS tyrimas.

#### **LIT-147-1 arr[hg18] 2p22.1p16.1(40,059,584-57,546,352)x3 dn**

vLGH (1050K) metodu nustatyta *de novo* intersticinė 17,5 Mb dydžio 2p22.1-p16.1 srities duplikacija (žr. priede R paveikslą) tiriamajai su vidutine INN, elgesio ir emocijų sutrikimu, prieširdžių pertvaros defektu, makrocefalija, aukšta ir iškilia kakta, hipertolerizmu (Kasnauskiene *et al.*, 2012).

#### **Nesubalansuoti reciprokiniai persitvarkymai**

Nesubalansuotos translokacijos, lemiančios embriono/vaisiaus žūtį arba daugines raidos anomalijas bei raidos sutrikimus gyvagimiams dėl chromosomų terminalinių delecijų ir duplikacijų, dažniausiai yra paveldėtos iš subalansuotą chromosominį persitvarkymą turinčio vieno iš tėvų. Retais atvejais nesubalansuotos translokacijos yra *de novo*, susiformuojančios gametogenezės metu veikiant chromosomų stabilumą trikdantiems genetiniams, epigenetiniams ar aplinkos veiksniams. Smulkių, rutininio kariotipavimo G dažymo metodu nenustatomas nesubalansuotas translokacijas, ypač paveldėtas, nustatyti yra labai svarbu vertinant ligos pasikartojimo šeimoje riziką. Jeigu vienas iš tėvų yra subalansuotos translokacijos nešiotojas, genetinės ligos pasikartojimo šeimoje rizika yra žymiai didesnė nei *de novo* ar intersticinio pokyčio atveju. Nesubalansuotų gametų susidarymas priklauso nuo chromosomų, translokuotų segmentų ir „šeimininko“ centrinių segmentų dydžio, dažniausių chiazmų formavimosi vietų. Gyvagimio su dauginais raidos defektais rizika vertinama kiekvienu translokacijos atveju individualiai, atsižvelgiant į geneologiją ir šeimos anamnezę, translokuotų fragmentų dydį, translokacijoje dalyvaujančias chromosomas.

Šio tyrimo metu vLGH metodu nustatyti keturi nesusiję nesubalansuotų translokacijų atvejai. Atlikus subtelomerinį FISH tyrimą/kariotipo tyrimą, nustatyta translokacijų kilmė – trys paveldėti atvejai ir vienas *de novo* atvejis.

**59-1 arr[hg18] 8p23.3p23.1(0-7,036,726)x1, 15q26.1q26.3(90,472,251-100,338,915)x3 dn**

vLGH (400K) tyrimas atliktas 2 metų mergaitei dėl vėluojančios psichomotorinės raidos ir dismorfinių veido bruožų. Nustatyta terminalinė 8p23.2-pter srities duplikacija bei terminalinė 15q26.1-qter srities delecija (žr. priede S paveikslą), todėl įtarta nesubalansuota translokacija. FISH tyrimas patvirtino nesubalansuotą translokaciją tarp 8-os chromosomos trumpojo peties ir 15-os chromosomos ilgojo peties. Atlikus subtelomerinį FISH tyrimą tėvams, nustatyta *de novo* pokyčio kilmė, nes nei vienas iš tėvų nėra subalansuotos translokacijos nešiotojas. Taigi, analogiško chromosomų struktūros persitvarkymo pasikartojimo šeimoje rizika yra bendrapopuliacinė (<1 %).

**67-1 arr[hg18] 4p16.3(0-4,194,871)x1, 11p15.4p15.5(0-3,357,154)x3**

vLGH (400K) tyrimas atliktas 19 metų pacientei dėl INN, dauginių raidos defektų, elgesio problemų ir dismorfinių požymių: mikrocefalijos, hipertelorizmo, kairės akies abiejų vokų kolobomos, trumpo filtro, mikrogenijos, žemo ūgio, stuburo ir plaštakos pirštų deformacijų. Nustatyta terminalinė 4p16.3-pter srities delecija ir terminalinė 11p15.4-pter srities duplikacija (žr. priede T paveikslą). Įvertinus vLGH rezultatus, įtarta nesubalansuota translokacija, todėl atliktas subtelomerinis FISH tyrimas tėvams. Nustatyta, kad tiriamosios (LT-67-1) tėvas yra subalansuotos translokacijos nešiotojas. Įvertinus ligos pasikartojimo šeimoje riziką, pasiūlyta prenatalinė diagnostika kito nėštumo atveju.

Subalansuota translokacija tarp 4-os ir 11-os chromosomų trumpųjų pečių yra viena iš dažniausiai nustatomų subalansuotų reciprokinių translokacijų bendroje populiacijoje. Tiriamoji (LT-67-1) iš tėvo paveldėjo tik vieną iš

dviejų pakitusių chromosomų, tai lėmė 4-os chromosomos trumpojo peties terminalinę deleciją, lemiančią *Wolf-Hirschhorn* (OMIM#194190) sindromą, ir tėvinės kilmės 11-os chromosomos trumpojo peties terminalinę duplikaciją, lemiančią *Silver–Russell* sindromą (OMIM#180860). Minėtiems sindromams būdinga priešinga klinika. *Wolf-Hirschhorn* sindromui būdingas augimo atsilikimas, INN ir specifiniai dismorfiniai požymiai, o *Silver–Russell* sindromui – greitas augimas, santykinė makrocefalija, INN ir specifiniai veido bruožai. Nesubalansuotos translokacijos, apimančios skirtingų sindromų kritines sritis, atveju būdingas kompleksinis fenotipas, kuris nėra tipinis nei vienam iš minėtų sindromų, todėl genetinė diagnozė remiantis klinikiniais požymiais yra sudėtinga.

**68-1 arr[hg18] 5p15.33p15.31(0-8,157,370)x1, 12q24.21q24.33 (113,931,344-132,349,534)x3**

vLGH tyrimo metu nustatyta 5-os chromosomos trumpojo peties terminalinė delecija ir 12-os chromosomos ilgojo peties terminalinė duplikacija (žr. priede U paveikslą) berniukui, turinčiam INN ir dismorfinių požymių: aukštą kaktą, ryškius antakių lankus, akių hipertelorizmą, trumpą filtrą, mažą apatinį žandikaulį, bei smegenų struktūros pokyčių – didžiosios smegenų jungties hipoplaziją.

vLGH tyrimo metu nustatyta 5-os chromosomos trumpojo peties terminalinė delecija ir 12-os chromosomos ilgojo peties terminalinė duplikacija bei šeiminės anamnezės duomenys (sibėsė diagnozė, negyvagimis sibsas) leido įtarti, kad vienas iš tėvų yra subalansuotos translokacijos nešiotojas. Atlikus kariotipo tyrimą tėvams patvirtinta, kad probando motina yra subalansuotos reciprokinės translokacijos tarp 5-os chromosomos trumpojo peties terminalinės dalies ir 12-os chromosomos ilgojo peties terminalinės dalies nešiotija. Išsamesnė šio atvejo analizė pateikta straipsnyje (Ciuladaite *et al.*, 2012).

Paveldėtos nesubalansuotos translokacijos atvejais (LT-63-1) aprašytas skyrelyje – „Patogeniniai chromosomų struktūros pokyčiai, patvirtinantys žinomų sindromų diagnozę“ (žr. 63 psl.).

### **INN genai kandidatai**

vLGH technologija pagreitino ne tik gretutinių genų sindromų, bet ir monogeninių ligų nustatymą. Pastaraisiais metais paskelbti tik vieną geną apimančių mikrodelecijų/mikroduplicacijų atvejai siejami su INN, autizmu, šizofrenija ir kitais sutrikimais (Walsh *et al.*, 2008; Mikhail *et al.*, 2011). Tokie atvejai ypač reikšmingi tiksliai fenotipo-genotipo koreliacijos analizei. Šio mokslinio tyrimo metu monogeniniai chromosominiai pokyčiai nustatyti trims tiriamiesiems (LT-34-1, LT-70-1, LIT-25-1). Tai 2q34, 16q22.3 ir 4q28.3 sričių mikrodelecijos, atitinkamai 0,96 Mb, 0,73 Mb ir 1,5 Mb dydžio.

Normali kognityvinė funkcija ir elgesys priklauso nuo glaudžių neuronų homeostazės kontrolės mechanizmų, todėl neuronų homeostazei svarbių genų dozės pokyčiai gali sutrikdyti neuroninius tinklus, normalią smegenų raidą ir lemti įvairius elgesio ir neurologinio sutrikimo fenotipus. Funkciškai dauguma šių genų gali būti priskirti vienai iš penkių kategorijų: neuronų transkripcijos veiksniai, sinapsių formavimosi ir išlaikymo, baltymų ubikvitinimo, chromatino remodeliavimo ir neurotransmisijos procesuose dalyvaujančius baltymus koduojantiems genams. Taigi, kognityvinius sutrikimus gali lemti beveik bet kuriame ląstelėje vykstančiame biologiniame procese dalyvaujančių baltymų koduojančių genų dozės pokyčiai.

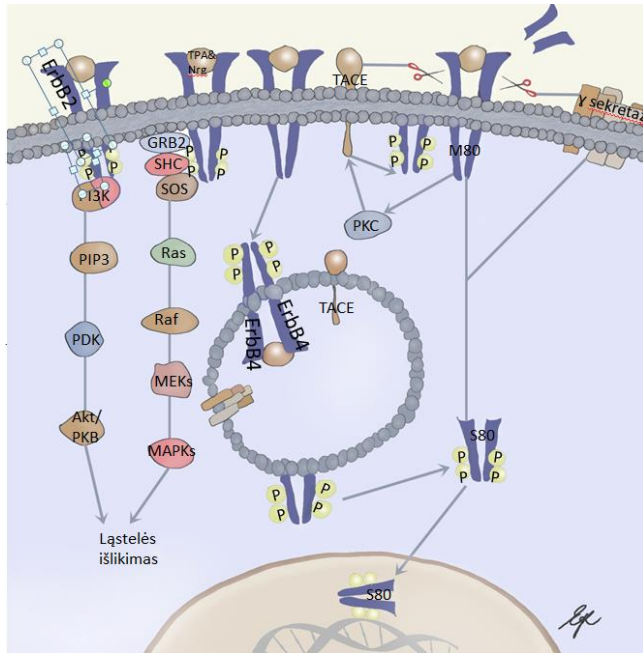
Kartu su mokslo ir technologijų pažanga spartėja ir genų kandidatų nustatymas. Ypač reikšmingi genų kandidatų INN nustatymui mažesni nei 500 kb patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai, apimantys tik vieną geną arba dalį geno, kuris yra svarbus CNS raidai ar funkcionavimui.

***ERBB4*** (angl. *v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4*) – tirozinkinazės receptorius, epidermio augimo faktoriaus receptorius.

Tiriamajam (LT-34-1) su vidutine INN ir elgesio problemomis nustatyta 0,96 Mb intersticinė 2q34 srities delecija (žr. paveikslą V), apimanti vieną geną

– *ErbB4*. *ERBB4* yra neuroregulinių receptorių. Reguliuoja širdies, CNS ir pieno liaukų vystymąsi, genų transkripciją, ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, migraciją ir apoptozę. Embrioninio vystymosi laikotarpiu svarbus normaliai širdies raumenų diferenciacijai ir kardiomiocitų proliferacijai po gimimo, normaliam CNS vystimuisi, ypač nervinio vamzdelio ląstelių migracijai ir aksonų valdymui. *ErbB4* geno koduojamo baltymo – receptoriaus svarbą embrioninio vystymosi laikotarpiu įrodo eksperimentai su pelėmis. *erbB4*-/*erbB4*- nokautiniai pelių embrionai žuvo embriogenezės laikotarpiu dėl nesėkmingo miokardo vystymosi, o vieno *erbB4* alelio inaktyvavimas lemia neurologinius sutrikimus – motorinės raidos sutrikimą bei mokymosi sunkumus. Neuroregulinių receptoriaus *ErbB4* veikimo kelias pavaizduotas 4.11 paveiksle.

Walsh *et al.* (2008) aprašė distalinės *ERBB4* geno dalies (19–27 egzono) 399 kb deleciją, kuri buvo nustatyta šizofrenija sergančiam pacientui. Atlikti tyrimai parodė, kad pakitusio geno raiška vyksta. Susidaręs pakitęs trumpesnis baltymas neturi dalies viduląstelinio kinazės domeno, todėl iki galo neatlieka savo funkcijos. Tikėtina, kad pakitęs baltymas lemia šizofreniją dėl neuronų migracijos ir sinapsių neurotransmisijos sutrikimų (Woo *et al.*, 2007). Taigi, klinikinės pasekmės šiek tiek lengvesnės nei visišką geno haplonepakankamumą.



4.12 paveikslas. *ErbB4* veikimo mechanizmas. Prisijungus ligandui prie išorinio ligando prisijungimo domeno, inicijuojama receptoriaus dimerizacija ir autofosforilinimas, kuriuos atlieka viduląstelinis kinazės domenas. Receptorius tampa aktyvus. Po aktyvacijos vyksta citoplazminių substratų fosforilinimas ir prasideda signalinė kaskada, kuri valdo genų raišką, citoskeleto persitvarkymus, anti-apoptozę ir skatina ląstelių proliferaciją.

Vienas svarbiausių ir geriausiai ištyrinėtų ErbB4 ligandų yra neuregulinas 1 (NRG1). NRG1–ErbB4 signalinis kelias yra svarbus daugumai neurobiologinių procesų: neurogenezei, migracijai, sinapsių plastiškumui, neuronų ir ganglijų diferenciacijai. VNPs tyrimai rodo NRG1 ir ErbB4 asociaciją su šizofrenija. Nustčius mutacijas *ErbB4* koduojančioje dalyje, įrodyta *ErbB4* haplonepakankamumo fenotipinės pasekmės žmonėms.

Backx *et al.* (2009) aprašė *de novo* subalansuotos translokacijos (t(2;6)(q34;p25.3)), nutraukiančios *ErbB4* geno seką, klinikinį atvejį (11 metų mergaitei su ankstyva miotonine encefalopatija ir sunkiu psichomotorinės raidos atsilikimu). Trūkio taškas 2-oje chromosomoje, nutraukdamas *ErbB4* geno seką tarp 1 ir 2 egzonų, lemia *ErbB4* haplonepakankamumą.

Tiriamajam (LT-34-1) nustatyta 2q34 srities delecija, apimanti *ErbB4* geno 1–3 egzonus, siejama su *ErbB4* haplonepakankamumu, kuris lemia psichomotorinės raidos atsilikimą.



**ZFHX3** (angl. *zinc finger homeobox 3*) – transkripcijos veiksnys

16q22.3 delecija (žr. priede W paveikslą) apima vieną geną – *ZFHX3*, kurio koduojamas baltymas atlieka transkripcijos slopintojo funkciją. Prisijungdamas prie AT turtingų sekų, *zfh3* blokuoja AFP geno stiprintuvą. Reguliuoja mioblastų diferenciaciją prisijungdamas prie MYF6 promotoriaus ir represoriaus AT turtingų sekų. *ZFHX3* reguliuoja genų, kurie koduoja ląstelių adhezijos molekules – III tipo protokolageną, integriną ir fibroblastų augimo faktoriaus receptorių, raišką (Kim *et al.*, 2010). *ZFHX3* raiška vyksta smegenyse embrioniniu laikotarpiu (Jung *et al.*, 2005). Kim *et al.* (2010) pademonstravo, kad *ZFHX3* ir *PDGFRB* raiška yra stipriai susijusios: slopinant *ZFHX3* raišką, sumažėja ir *PDGFRB* raiška. Neuronai yra labai jautrūs oksidaciniam stresui dėl juose labai intensyviai vykstančių metabolinių procesų ir mažo antioksidacinių fermentų aktyvumo. *pdgfrb* apsaugo neuronus nuo oksidacinio streso aktyvuodamas ATM, kuris aktyvuoja autofagocitozę (tai apsaugo neuronus Purkje ląsteles nuo praradusių funkciją organelių (mitochondrijų)) (Ishii *et al.*, 2006). Be to, yra nustatytas *ZFHX3* variantas, lemiantis polinkį *Kawasaki* ligai su padidėjusia aneurizmos išsiplėtimo rizika (Burgner *et al.*, 2009). Taip pat yra nustatytas *ZFHX3* variantas, siejamas su prieširdžių virpėjimo ir išeminio insulto polinkiu (Benjamin *et al.*, 2009; Gudbjartsson *et al.*, 2009).

Taigi, INN gali lemti beveik bet kuriame ląstelėje vysktančiame biologiniame procese dalyvaujančių baltymų funkcijos praradimas dėl pasikeitusios genų dozės ar padėties efekto. Kiekvieno komponento biologinės sąveikos ryšių tinkluose nagrinėjimas ir supratimas leidžia numanyti kitų, galimai su INN susijusių, genų funkcinę svarbą.

Nėra paprasta įrodyti, kad identifikuotų specifinių genų mutacijos iš tiesų lemia INN. Vienam pacientui su INN nustatyta geno delecija nebūtinai yra įrodymas, kad šis genas susijęs su kognityviniais sutrikimais. Tik pakartotinai aptikus persidengiančius patogeninius sekos pokyčius skirtinguose

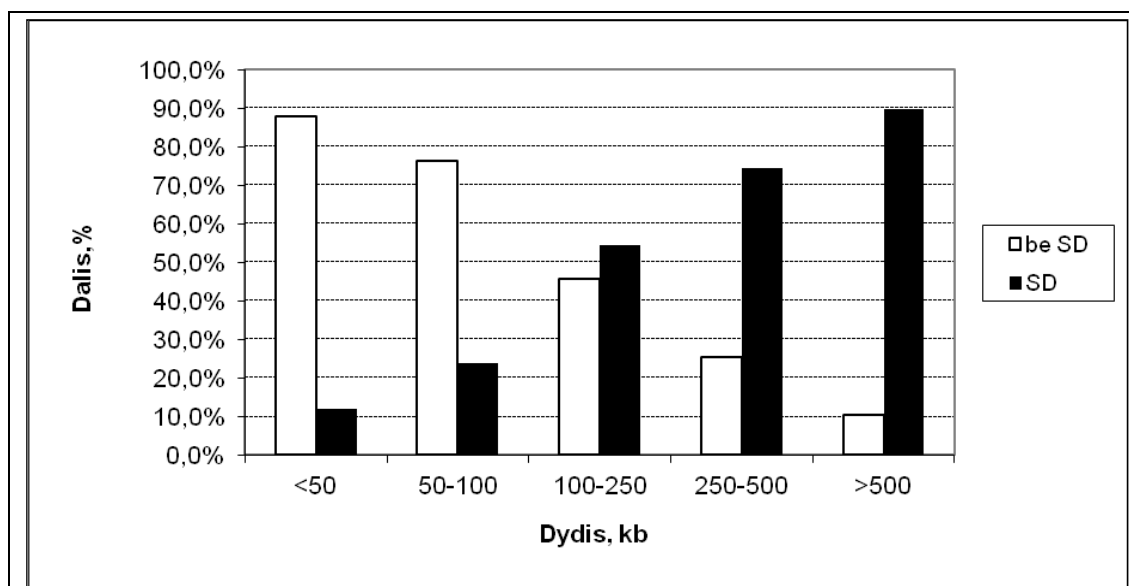
pacientuose su INN ir neradus tokių pokyčių didelėje kontrolinėje grupėje, genas gali būti patikimai susietas su INN fenotipu (Tarpey *et al.*, 2009).

#### **4.4. KSP FORMAVIMOSI MECHANIZMAI**

Chromosomų struktūros persitvarkymams vykti turi įtakos genomo architektūrinės ypatybės. Dažnai pasikartojančių KSP susidarymą lemia NAHR, kurios substratas yra segmentinės duplikacijos (SD). Vertinant SD buvimą arba nebuvimą KSP regione, nustatyta, kad 33,6 % KSPR yra susiję su segmentinėmis duplikacijomis.

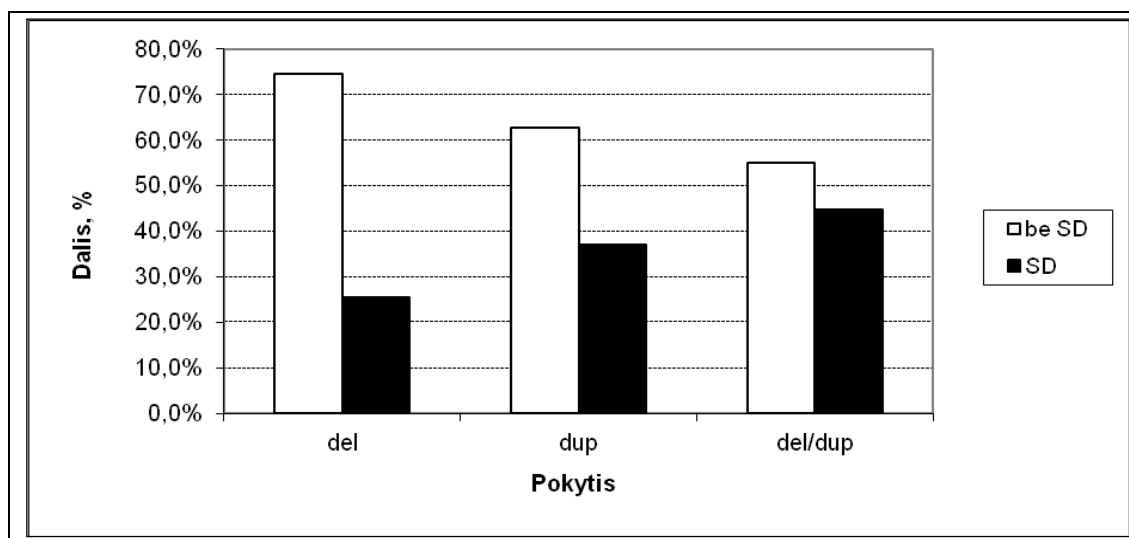
Toks stiprus ryšys tarp segmentinių duplikacijų ir KSPR yra todėl, kad dauguma chromosomų struktūros persitvarkymų žmogaus genome vyksta dėl neteisingos rekombinacijos tarp ilgų pasikartojančių DNR sekų. Be to, manoma, kad ne visos segmentinės duplikacijos yra anotuotos. Gali būti, kad kai kurie KSP iš tikrųjų yra SD (Redon *et al.*, 2006). Pastebėta, kad segmentinių duplikacijų buvimas priklauso nuo KSPR dydžio ir pokyčio tipo.

Dauguma didesnių nei 500 kb KSPR (61/68, 89,7 %) persidengia su segmentinėmis duplikacijomis. O tik 53/443 (12 %) mažesnių nei 50 kb KSPR apima segmentines duplikacijas (žr. 4.12 paveikslą). Šie duomenys patvirtina, kad dauguma >500 kb chromosomų struktūros persitvarkymų susidaro vykstant NAHR. Panašūs duomenys gauti Redon *et al.* (2006). Jų duomenimis, iki 80 % >500 kb KSP ir mažiau nei 20 % <100 kb KSP persidengia su segmentinėmis duplikacijomis.



4.12 paveikslas. Ryšys tarp KSP dydžio ir segmentinių duplikacijų.

Analizuojant segmentinių duplikacijų buvimą ir atsižvelgiant į KSP tipą, pastebėta, kad segmentinės duplikacijos yra dažnesnės tarp KSPR, kuriuose vyksta delecijos ir duplikacijos (žr. 4.13 paveikslą). Su segmentinėmis duplikacijomis persidengia 25,4 % (129/507) KSPR, kuriuose vyksta tik delecijos, 37,2 % (109/293) KSPR, kuriuose vyksta tik duplikacijos, 44,9 % (122/272) KSPR, kuriuose vyksta delecijos ir duplikacijos. Taip pat pastebima, kad duplikacijos yra labiau susijusios su segmentinėmis duplikacijomis nei delecijos. Tai patvirtina Conrad *et al.* (2010) iškelta hipotezę, kad duplikacijų formavimasis labiau priklauso nuo DNR sekos.



4.13 paveikslas. KSPR, susijusių su segmentinėmis duplikacijomis, dalis, priklausanti nuo pokyčio tipo.

#### 4.5. VLGH METODO DIAGNOSTINĖ NAUDA

Šiame darbe nustatytas molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas neaiškios kilmės INN atveju yra 14,8 %. 26 iš 175 tirtų asmenų, turinčių INN, nustatyti patogeniniai nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai: 16-kai – delecijos, 6-iems – duplikacijos, 4-iems – delecijos ir duplikacijos. Iš viso aptikta 30 patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių, daugiau nei vienas KSP nustatytas 4-iems tiriamiesiems. Patogeninio nesubalansuoto chromosominio struktūros pokyčio dydis varijuoja nuo 264 kb iki 18,5 Mb (mediana – 3,1 Mb).

Šio mokslinio tyrimo metu įvertinta molekulinio kariotipavimo diagnostinė nauda (14,8 %) yra artima kitų mokslinių tyrimų duomenims: juose patogeniniai chromosominiai pokyčiai molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatomi vidutiniškai 5–15 % asmenų, turinčių INN. Atliekant šį tyrimą naudotų dviejų skirtingų mikrolustų – 105K ir 400K – diagnostinis efektyvumas yra panašus. 14 % (14/100) asmenų, turinčių INN, vLGH (105K) metodu buvo nustatyta 14 patogeninių chromosomų struktūros persitvarkymų: 11 delecijų ir 3 duplikacijos, kurių dydis varijavo nuo 264 kb iki 17,5 Mb (mediana – 1,9 Mb). 16 % (12/75) tirtų asmenų, turinčių INN, vLGH metodu (400K) nustatyti patogeniniai nesubalansuoti chromosomų struktūros pokyčiai: 7-iems – delecija, 1-am – duplikacija, 4-iems – delecija ir duplikacija, kurių dydis varijavo nuo 726 kb iki 18,5 Mb (mediana – 4,5 Mb). Dauguma kliniškai reikšmingų pokyčių yra didesni nei 500 kb (96,7 %). Šio tyrimo metu nustatytas mažiausias patogeninis pokytis yra 264 kb. Jis nustatytas naudojant mažesnės skiriamosios gebos mikrolustą (105K). Tikėtina, kad molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas labiau priklauso nuo pacientų atrankos kriterijų nei nuo naudojamo mikrolusto skiriamosios gebos. Tačiau skirtingų tyrėjų rezultatai gana priešaringi. Hochstenbach su bendradarbiais (2011) apžvalgoje pateikiami 50-iems molekulinio kariotipavimo tyrimų rezultatai. Juos atliekant, pacientai, turintys INN ir normalų kariotipą, buvo tiriami vLGH arba VNP-LGH metodais. Šių tyrimų duomenimis, vidutinis diagnostinis molekulinio kariotipavimo efektyvumas – 13,6 %, tačiau intervalas labai platus

(nuo 3,7 iki 50 %). Molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas, pacientus tyrimui parinkus atsitiktinai, buvo mažesnis nei studijų, kuriose tiriamųjų grupės buvo sudarytos pagal atrankos kriterijus. Tačiau, priešingai nei tikėtasi, tyrimų, į kuriuos buvo įtraukti pacientai, turintys sunkesnius klinikinius požymius, diagnostinis efektyvumas buvo mažesnis (11 %), nei tų, kuriuose pacientai buvo atrinkti atsitiktinai, neatsižvelgiant į klinikos sunkumą (14,4 %).

Tai, kad šiame tyrime asmenims, turintiems INN, delecijos atvejų nustatyta daugiau nei duplikacijos patvirtina didesnę delecijų patogeniškumo potencialą. Persitvarkymo pobūdis (delecija ar duplikacija) yra svarbus kriterijus vertinant kopijų skaičiaus pokyčio reikšmę fenotipui. Duplikacijos paprastai pasižymi lengvesniu klinikiu poveikiu dėl to, kad organizmas genų dozės perteklių dažnai toleruoja lengviau nei stoką. Tai rodo ir šio tyrimo metu nustatyti patogeninių delecijų bei duplikacijų dydžio skirtumai – vidutinis delecijų dydis 2,3 karto mažesnis nei duplikacijų.

vLGH tyrimas yra pagrindinis (pirmo pasirinkimo) tyrimas tiriamiesiems su neaiškios kilmės RA ir dismorfiniais požymiais. Lietuvoje pagrindinis metodas, taikomas asmenims su neaiškios kilmės RA ir dismorfiniais požymiais tirti, yra rutininis kariotipo tyrimas G dažymo metodu. Visiems šiame tyrime dalyvavusiems tiriamiesiems, turintiems INN, anksčiau buvo atliktas kariotipo tyrimas. Tiriamajam (LIT-30-1) nustatytas sudėtingo chromosomų struktūros pokyčio atvejis rodo, kad, nustačius kliniškai reikšmingą KSP ir esant fenotipo-genotipo nesuderinamumui, be vLGH tyrimo, būtinas kariotipo tyrimas dėl galimų papildomų subalansuotų translokacijų nustatymo. Tai svarbu tikslesnei diagnostikai ir genetiniam konsultavimui.

Tiriamajam (LIT-30-1) rutininio kariotipo metodu nustatyta *de novo* dviguba subalansuota translokacija 46,XY,t(3;14)(q12;q11.2), t(6;20)(q21;p11.2). Tiriant asmenis su RA ir subalansuotu chromosomų struktūros pokyčiu, nustatyta rutininio kariotipo tyrimo G dažymo metodu, 30-40 % tiriamųjų nustatomi papildomi nesubalansuoti chromosominiai pokyčiai (KSP) (Sismani

*et al.*, 2008; Schluth-Bolard *et al.*, 2009). Tiriamajam (LIT-30-1) buvo atliktas vLGH (105K) tyrimas. Šiuo metodu nustatyta papildoma 3,9 Mb dydžio 5p14.1-p14.3 srities chromosomų struktūros mikrodelecija (žr. priede X paveikslą). Mikrodelecija patvirtinta ir jos *de novo* kilmė nustatyta RL-PGR metodu.

Šios srities delecijos siejamos su *Cri du chat* sindromu, kuriam būdinga INN, panašus į katės kniaukimą verksmas ir specifiniai dismorfiniai požymiai: apvalus veidas, hipertelorizmas, žema ausų kaušelių padėtis, mažas apatinis žandikaulis. Klinikinių požymių spektras ir sunkumas priklauso nuo delecijos dydžio ir lokalizacijos. X. Zhang *et al.* (2005), atlikęs vLGH tyrimą 94 tiriamiesiems su *Cri du chat* sindromu, išskyrė tris chromosominius regionus, atsakingus už tam tikrą *Cri du chat* sindromui būdingų požymių pasireiškimą. Specifinis verksmas siejamas su 1,5 Mb dydžio distaline 5p15.31 sritimi, kalbos raidos atsilikimas – 3,2 Mb 5p15.32-15.33 sritimi, veido dismorfiniai požymiai – 2,4 Mb dydžio 5p15.2-p15.31 sritimi (Zhang *et al.*, 2005). Autorių nuomone, reikšmingiausias – 1,2 Mb dydžio MRI regionas, esantis 5p15.31 srityje. Tiriamiesiems, turintiems 5p15.31 srities delecijas, pasireiškė sunki INN. Proksimaliau MRI regiono esančių MRII ir MRIII regionų delecijos lemia lengvesnius klinikinius požymius (Zhang *et al.*, 2005).

Tiriamajam (LIT-30-1) nustatyta intersticinė delecija 5-os chromosomos trumpajame petyje nėra didelė, persidengia tik su MRIII regionu. Taigi, vadovaujantis ankstesnių tyrimų genotipo-fenotipo koreliacijos duomenimis, esant tokiai delecijai, tikėtina lengva INN. Kadangi (LIT-30-1) būdingas sunkus RA, manoma, kad tiriamojo fenotipą galėjo lemti ne tik 5p14.1-p14.3 srities delecija, bet ir vienas ar daugiau chromosominių trūkio taškų (3, 6, 14 ir 20 chromosomose), susijusių su dviguba subalansuota translokacija: dėl jo/jų galėjo būti nutraukta dozei jautraus geno seka ar reguliacinės jo sekos; arba tai galėjo įvykti dėl padėties efekto. Pasak Warburton *et al.* (1991), RA rizika, esant vienam chromosominiam trūkiui, lygi 3,5 %. Taigi, tiriamajam su dviguba subalansuota translokacija RA rizika didėja iki 14 %. Didėjant chromosominiam kompleksiskumui, didėja ir tikimybė, kad geno sekos

nutraukimas, pozicinis efektas, recesyvi mutacija dėl translokacijos gali lemti sunkias fenotipines anomalijas (Patsalis, 2007). Translokacijos trūkio srityse – 6q21 ir 20p11.2 regionuose – yra daug genų, keletas jų yra siejami su INN, mikrocefalija ir kitais klinikiniais požymiais, tokiais kaip mikroftalmija, ektoaktilija, prognatija. Duomenų, kad 3q12 ir 14q11.2 sritys gali būti susijusios su INN, nepakanka. Vis dėlto, kadangi chromosominių trūkių taškai nebuvo patikslinti NGS metodu, negalima atmesti nedidelės delecijos trūkio srityje arba kitų patogeninių mechanizmų (tarp jų ir geno sekos nutraukimo), galėjusių lemti paciento fenotipą, galimybes.

Nors vLGH metodas yra tikslus didelės skiriamosios gebos metodas, tačiau juo neįmanoma nustatyti visų chromosominių pokyčių patogeniškumą lemiančių mechanizmų. Vienas iš vLGH metodo trūkumų yra tai, kad juo nenustatomi subalansuoti chromosominiai struktūros persitvarkymai, todėl, esant fenotipo-genotipo nesuderinamumui, be vLGH tyrimo, būtinas kariotipo tyrimas dėl galimų papildomų subalansuotų translokacijų nustatymo. Vis dėlto, remiantis šio ir kitų tyrėjų tyrimų rezultatais, vLGH metodas yra efektyviausias citogenetinis metodas nustatyti nesubalansuotiems chromosomų struktūros pokyčiams, kurie yra viena dažniausių (~30%) INN priežasčių. Naudojant didesnės skiriamosios gebos mikrolustus INN tyrimuose, nustatoma daugiau smulkių neaiškios klinikinės reikšmės KSP, tuomet susiduriama su klinikinės reikšmės vertinimo ir interpretavimo problema. Šią problemą padeda išspręsti kontrolinės grupės tyrimas ir jai būdingų KSp nustatymas.

400K mikrolustas gerai tinka smulkiems nesubalansuotiems chromosominiams persitvarkymams nustatyti ir žmogaus genomo variabilumui įvertinti. Nors kliniškai reikšmingi KSP yra šimtų kb dydžio ir gali būti nustatyti naudojant mažesnės skiriamosios gebos mikrolustus, naudojant būtent šį mikrolustą, buvo galima tiksliau įvertinti chromosominio persitvarkymo dydį ir jį įtrauktus genus.

## V. IŠVADOS

1. Šio mokslinio darbo rezultatai įrodo, kad DNR kopijų skaičiaus pokyčiai yra plačiai paplitusios struktūrinės variacijos. Tiriant Lietuvos populiaciją, nustatyta, kad kopijų skaičiaus pokyčiai sudaro 5,1 % žmogaus genomo. 99,8 % KSP yra dažni ir kliniškai nereikšmingi. Populiacijoje dažniausi KSP, sudarantys >75 % visų KSP, yra iki 100 kb dydžio, apima ne daugiau kaip 10 genų.
2. Citogenetiniu požiūriu, dauguma asmenų yra individualūs/išskirtiniai, turintys retų delecijų/duplikacijų. Tik 35,7 % (30/84) retų DNR kopijų skaičiaus pokyčių yra kliniškai reikšmingi. Vertinant KSP patogeniškumą, atsižvelgiama į pokyčio paplitimą bendrojoje populiacijoje, pokyčio dydį, tipą ir kilmę, tačiau svarbiausia yra į pokytį įtrauktų genų, o kai kuriais atvejais ir šalia esančių genų, funkcijos ir raiškos analizė.
3. Nustatyti trys genai kandidatai: tirozinkinazės receptorių koduojantis *ErbB4*, transkripcijos veiksnį koduojantis *ZFHX3* ir ląstelių adhezijos molekulės koduojantis *PCDH18*. Šių genų raiškos pokytis galimai lemia intelektinę negalią. Normali kognityvinė funkcija ir elgesys priklauso nuo glaudžių neuronų homeostazės kontrolės mechanizmų, todėl neuronų homeostazei svarbių genų dozės pokyčiai gali sutrikdyti neuroninius tinklus, normalią smegenų raidą ir lemti įvairius elgesio ir neurologinius sutrikimus.
4. Chromosomų struktūros pokyčių formavimasis priklauso nuo genomo architektūrinių savybių. Didesnių nei 500 kb KSP galuose dažnai yra segmentinės duplikacijos (89,7 % atvejų), kurios lemia nealelinę homologinę rekombinaciją. Tikėtina, kad KSP, kurie nėra susiję su segmentinėmis duplikacijomis, susidaro dėl replikacijos klaidų.
5. Šiame darbe nustatytas molekulinio kariotipavimo efektyvumas INN požiūriu yra 14,8 %. 400K mikrolustas leidžia efektyviai nustatyti smulkius nesubalansuotus chromosominius persitvarkymus ir įvertinti žmogaus genomo variabilumą.



## VI. NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD et al. Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*. 2006 Feb 16;439(7078):851-5.
- Backx L, Ceulemans B, Vermeesch JR, Devriendt K, Van Esch H. Early myoclonic encephalopathy caused by a disruption of the neuregulin-1 receptor *ErbB4*. *Eur J Hum Genet*. 2009 Mar;17(3):378-82.
- Bailey JA, Eichler EE. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nat Rev Genet*. 2006 Jul;7(7):552-64. Epub 2006 Jun 13.
- Barlow GM, Lyons GE, Richardson JA, Sarnat HB, Korenberg JR. DSCAM: an endogenous promoter drives expression in the developing CNS and neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Nov 22;299(1):1-6.
- Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F et al. FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet*. 2005; 48(4):388-396.
- Benjamin EJ, Rice KM, Arking DE, Pfeufer A, van Noord C et al. Variants in *ZFHX3* are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet*. 2009 Aug;41(8):879-81.
- Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, Belmont JW, Patel MS et al. 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Jan;82(1):214-21.
- Bisgaard AM, Rackauskaite G, Thelle T, Kirchhoff M, Bryndorf T. Twins with mental retardation and an interstitial deletion 7q34q36.2 leading to the diagnosis of long QT syndrome. *Am J Med Genet A*. 2006 Mar 15;140(6):644-8.
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C et al. Disruption of the *ProSAP2* gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):261-8.
- Bonnet C, Andrieux J, Béri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O et al. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth

- restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet.* 2010 Jun;47(6):377-84.
- Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D et al. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet.* 2009 Feb;46(2):123-31.
- Buysse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A et al. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet.* 2009 Nov-Dec;52(6):398-403.
- Burgner D, Davila S, Breunis WB, Ng SB, Li Y et al. A genome-wide association study identifies novel and functionally related susceptibility Loci for Kawasaki disease. *PLoS Genet.* 2009 Jan;5(1):e1000319.
- Caselli R, Mencarelli MA, Papa FT, Ariani F, Longo I et al. Delineation of Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 1970; 30: 215–27.
- Chen CP, Lin SP, Lin CC, Chen YJ, Chern SR et al. Molecular cytogenetic analysis of de novo dup(5)(q35.2q35.3) and review of the literature of pure partial trisomy 5q. *Am J Med Genet A.* 2006 Jul 15;140(14):1594-600.
- Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Férec C, Cooper DN. Complex gene rearrangements caused by serial replication slippage. *Hum Mutat.* 2005a Aug;26(2):125-34.
- Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Férec C, Cooper DN. Meta-analysis of gross insertions causing human genetic disease: novel mutational mechanisms and the role of replication slippage. *Hum Mutat.* 2005b Feb;25(2):207-21.
- Chen JM, Cooper DN, Férec C, Kehrer-Sawatzki H, Patrinos GP. Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2010 Aug;20(4):222-33.
- Cody JD, Hale DE. Linking chromosome abnormality and copy number variation. *Am J Med Genet A.* 2011 Mar;155A(3):469-75.

- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010 Apr 1;464(7289):704-12.
- Demeer B, Andrieux J, Receveur A, Morin G, Petit F et al. Duplication 16p13.3 and the CREBBP gene: confirmation of the phenotype. *Eur J Med Genet*. 2013 Jan;56(1):26-31.
- Douglas J, Hanks S, Temple IK, Davies S, Murray A et al. NSD1 mutations are the major cause of Sotos syndrome and occur in some cases of Weaver syndrome but are rare in other overgrowth phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2003; 72:132–143.
- Douglas J, Tatton-Brown K, Coleman K, Guerrero S, Berg J et al. Partial NSD1 deletions cause 5% of Sotos syndrome and are readily identifiable by multiplex ligation dependent probe amplification. *J Med Genet*. 2005; 42:e56.
- Dhar SU, del Gaudio D, German JR, Peters SU, Ou Z et al. . 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J MedGenet A*. 2010 Mar;152A(3):573-81.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P et al. Mutations in the gene encoding the synapticscaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):25-7.
- Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH. A new trisomic syndrome. *Lancet* 1960; 1: 787–90.
- Emanuel BS, Saitta SC. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet*. 2007 Nov;8(11):869-83.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet*. 2003 Nov;73(5):1027-40.
- Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2007 Feb;5(1):7-14.
- Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2

- gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):439-48.
- Flores M, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Domínguez-Vidaña R, Zepeda C et al. Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 10;104(15):6099-106.
- Ford CE, Jones KW, Miller OJ, Mittwoch U, Penrose LS, Ridler M & Shapiro A 1959 The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet* 1 709–710.
- Fryns JP, Kleczkowska A, Kenis H, Decock P, Van den Berghe H. Partial duplication of the short arm of chromosome 2 (dup(2)(p13----p21) associated with mental retardation and an Aarskog-like phenotype. *Ann Genet.* 1989;32(3):174-6.
- Gijsbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A et al. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet* 2009 Nov; 17(11): 1394–402.
- Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L et al. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet.* 2011 Nov;7(11):e1002334.
- Girirajan S, Vlangos CN, Szomju BB, Edelman E, Trevors CD et al. Genotype-phenotype correlation in Smith-Magenis syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum. *Genet Med.* 2006 Jul;8(7):417-27.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 2005 Mar 4;307(5714):1434-40.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 2008 Nov 3;1(1):4.
- Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Walters GB et al. A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):876-8.

- Guilherme R, Guimiot F, Tabet AC, Khung-Savatovsky S, Gauthier E et al. Abnormal muscle development of the diaphragm in a fetus with 2p14-p16 duplication. *Am J Med Genet A*. 2009 Dec;149A(12):2892-7.
- Gurnett CA, Veile R, Zempel J, Blackburn L, Lovett M, Bowcock A. Disruption of sodium bicarbonate transporter SLC4A10 in a patient with complex partial epilepsy and mental retardation. *Arch Neurol*. 2008 Apr;65(4):550-3.
- Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet*. 2009a Jan;5(1):e1000327.
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet*. 2009b Aug;10(8):551-64.
- Hedges DJ, Deininger PL. Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat Res*. 2007 Mar 1;616(1-2):46-59.
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44:113-39.
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* 2009 Jul-Aug; 52(4): 161-9.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004 Sep;36(9):949-51.
- Igarashi T, Inatomi J, Sekine T, Seki G, Shimadzu M et al. Novel nonsense mutation in the Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter gene (SLC4A4) in a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis and bilateral glaucoma. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Apr;12(4):713-8.
- Ishii Y, Oya T, Zheng L, Gao Z, Kawaguchi M et al. Mouse brains deficient in neuronal PDGF receptor-beta develop normally but are vulnerable to injury. *J Neurochem*. 2006 Jul;98(2):588-600.

- Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR et al. FW. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*. 2007 Sep 27;449(7161):478-82.
- Yu AM, McVey M. Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep;38(17):5706-17.
- Yu G, Zerucha T, Ekker M, Rubenstein JL. Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001 Oct 24;130(2):217-30.
- Yu T, Clapcote SJ, Li Z, Liu C, Pao A et al. Deficiencies in the region syntenic to human 21q22.3 cause cognitive deficits in mice. *Mamm Genome*. 2010 Jun;21(5-6):258-67.
- Yunis E, González J, Zuñiga R, Torres de Caballero OM, Mondragon A. Direct duplication 2p14 to 2p23. *Hum Genet*. 1979 Apr 27;48(2):241-4.
- Jacobs S, Ruusuvuori E, Sipilä ST, Haapanen A, Damkier HH et al. Mice with targeted *Slc4a10* gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 8;105(1):311-6.
- Kang JY, Hong Y, Ashida H, Shishioh N, Murakami Y et al. PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem*. 2005 Mar 11;280(10):9489-97.
- Kang SH, Scheffer A, Ou Z, Li J, Scaglia F, Belmont J et al. Identification of proximal 1p36 deletions using array-CGH: a possible new syndrome. *Clin Genet*. 2007 Oct;72(4):329-38.
- Kato M, Kawaguchi T, Ishikawa S, Umeda T, Nakamichi R et al. Population-genetic nature of copy number variations in the human genome. *Hum Mol Genet*. 2010 Mar 1;19(5):761-73.
- Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder and depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2007 Feb;61(1):3-19. Review.
- Kim TS, Kawaguchi M, Suzuki M, Jung CG, Asai K et al. The ZFH3 (ATBF1) transcription factor induces PDGFRB, which activates ATM in the cytoplasm

- to protect cerebellar neurons from oxidative stress. *Dis Model Mech.* 2010 Nov-Dec;3(11-12):752-62.
- Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet.* 2007 Jan-Feb;50(1):33-42.
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM et al. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009 Mar;30(3):283-92.
- Krawitz PM, Schweiger MR, Rödelsperger C, Marcelis C, Kölsch U et al. Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Nat Genet.* 2010 Oct;42(10):827-9.
- Kučinskas V, Sadauskas J, Usonytė J., "Katės kniaukimo" sindromas: 46,XX,Bp-. Sveikatos apsauga 1973; 7: 28–31.
- Lange J, Skaletsky H, van Daalen SK, Embry SL, Korver CM et al. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):855-69.
- Larsen KB, Lutterodt MC, Møllgård K, Møller M. Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *J Histochem Cytochem.* 2010 Jul;58(7):669-78. doi: 10.1369/jhc.2010.955757.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* 2007a Jul;39(7Suppl):S48-54.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell.* 2007b Dec 28;131(7):1235-47.
- Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, et al. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1963;257:3098–102.

- Lejeune J, Turpin R & Gautier M. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med.* 1959 Apr 7-14;143(11-12):256-65.
- Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(3):117-34.
- Liang JS, Shimojima K, Yamamoto T. Application of array-based comparative genome hybridization in children with developmental delay or mental retardation. *Pediatr Neonatol.* 2008 Dec;49(6):213-7.
- Lieber MR, Lu H, Gu J, Schwarz K. Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res.* 2008 Jan;18(1):125-33.
- Lieber MR. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Apr;17(4):393-5.
- Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4;283(1):1-5.
- Llorente B, Smith CE, Symington LS. Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle.* 2008 Apr 1;7(7):859-64.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2008 Feb;82(2):477-88.
- McCarroll SA. Copy number variation and human genome maps. *Nat Genet.* 2010 May;42(5):365-6.
- McQuillin A, Bass NJ, Kalsi G, Lawrence J, Puri V et al. Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3. *Mol Psychiatry.* 2006 Feb;11(2):134-42.
- McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 2008 Nov;24(11):529-38.



- Miyoshi K, Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Katayama T et al. DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 14;317(4):1195-9.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64.
- Mouton-Liger F, Thomas S, Rattenbach R, Magnol L, Larigaldie V et al. PCP4 (PEP19) overexpression induces premature neuronal differentiation associated with Ca(2+) /calmodulin-dependent kinase II- $\delta$  activation in mouse models of Down syndrome. *J Comp Neurol.* 2011 Oct 1;519(14):2779-802.
- Munthe-Fog L, Hummelshøj T, Honoré C, Madsen HO, Permin H, Garred P. Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency. *N Engl J Med.* 2009 Jun 18;360(25):2637-44.
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):30-5.
- Niehaus JL, Liu Y, Wallis KT, Egertová M, Bhartur SG et al. CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. *Mol Pharmacol.* 2007 Dec;72(6):1557-66.
- Nozaki M, Ohishi K, Yamada N, Kinoshita T, Nagy A, Takeda J. Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient embryos revealed by Cre/loxP system. *Lab Invest.* 1999 Mar;79(3):293-9.
- Oike Y, Hata A, Mamiya T, Kaname T, Noda Y et al. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet.* 1999 Mar;8(3):387-96.
- Paylor R, McIlwain KL, McAninch R, Nellis A, Yuva-Paylor LA et al. Mice deleted for the DiGeorge/velocardiofacial syndrome region show abnormal sensorimotor gating and learning and memory impairments. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 1;10(23):2645-50.
- Papa M, Boscia F, Canitano A, Castaldo P, Sellitti S et al. Expression pattern of the ether-a-gogo-related (ERG) K<sup>+</sup> channel-encoding genes ERG1, ERG2, and

- ERG3 in the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 2003 Nov 3;466(1):119-35.
- Patau K, Smith D W, Therman E, Inborn S L & Wagner H P. Multiplecongenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet.* 1960 Apr 9;1(7128):790-3.
- Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L et al. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet.* 2008 Mar;82(3):685-95.
- Pfundt R, Veltman JA. Structural genomic variation in intellectual disability. *Methods Mol Biol.* 2012;838:77-95.
- Phelan MC. Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2008 May 27;3:14.
- Poelmans G, Engelen JJ, Van Lent-Albrechts J, Smeets HJ, Schoenmakers E et al. Identification of novel dyslexia candidate genes through the analysis of a chromosomal deletion. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Jan5;150B(1):140-7.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2006 140:2063-74.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov 23;444(7118):444-54.
- Reymond A, Marigo V, Yaylaoglu MB, Leoni A, Ucla C et al. Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature.* 2002 Dec5;420(6915):582-6.
- Ricard G, Molina J, Chrast J, Gu W, Gheldof N et al. Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models. *PLoS Biol.* 2010 Nov 23;8(11):e1000543.
- Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010 Sep 22;11:161-87.
- Ropers HH. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Jun;18(3):241-50.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, 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. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):180-6.
- Rosenfeld JA, Crolla JA, Tomkins S, Bader P, Morrow B et al. Refinement of causative genes in monosomy 1p36 through clinical and molecular cytogenetic characterization of small interstitial deletions. *Am J Med Genet A.* 2010 Aug;152A(8):1951-9.
- Rossi E, Verri AP, Patricelli MG, Destefani V, Ricca I et al. A 12Mb deletion at 7q33-q35 associated with autism spectrum disorders and primary amenorrhea. *Eur J Med Genet.* 2008 Nov-Dec;51(6):631-8.
- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003 Apr 15;60(6):614-32.
- Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C et al. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci.* 2005 Apr 6;25(14):3560-70.
- Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):182-95.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM *et al.* Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet.* 2009 Sep-Oct;52(5):291-6.
- Seabright M. Human chromosome banding. *Lancet* 1972; 1 (7757): 967.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007 Apr 20;316(5823):445-9.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004 Jul 23;305(5683):525-8.
- Sehested LT, Møller RS, Bache I, Andersen NB, Ullmann R et al. Deletion of 7q34-q36.2 in two siblings with mental retardation, language delay, primary amenorrhea, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* 2010 Dec;152A(12):3115-9.

- Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):1038-42.
- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R57-64.
- Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2003 Feb 11;60(3):367-80.
- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V *et al.* Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet.* 2008 Jul 21;1:15.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 2002 Feb;18(2):74-82.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010;61:437-55.
- Stark KL, Xu B, Bagchi A, Lai WS, Liu H et al. Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet.* 2008 Jun;40(6):751-60.
- Striano P, Coppola A, Paravidino R, Malacarne M, Gimelli S et al. Clinical significance of rare copy number variations in epilepsy: a case-control survey using microarray-based comparative genomic hybridization. *Arch Neurol.* 2012 Mar;69(3):322-30.
- Takahashi S, Ohtsuki T, Yu SY, Tanabe E, Yara K et al. Significant linkage to chromosome 22q for exploratory eye movement dysfunction in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003 Nov 15;123B(1):27-32.
- Tanaka S, Ishii K, Kasai K, Yoon SO, Saeki Y. Neural expression of G-protein-coupled receptors GPR3, GPR6, and GPR12 up-regulates cyclic AMP

- levels and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2007 Apr 6;282(14):10506-15.
- the phenotype associated with 7q36.1q36.2 deletion: long QT syndrome, renal hypoplasia and mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2008 May 1;146A(9):1195-9.
- Thomas S, Thiery E, Aflalo R, Vayssettes C, Verney C, Berthuy I et al. PCP4 is highly expressed in ectoderm and particularly in neuroectoderm derivatives during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns.* 2003 Mar;3(1):93-7.
- Thompson MD, Killoran A, Percy ME, Nezarati M, Cole DE, Hwang PA. Hyperphosphatasia with neurologic deficit: a pyridoxine-responsive seizure disorder? *Pediatr Neurol.* 2006 Apr;34(4):303-7.
- Thompson MD, Nezarati MM, Gillessen-Kaesbach G, Meinecke P, Mendoza-Londono R et al. Hyperphosphatasia with seizures, neurologic deficit, and characteristic facial features: Five new patients with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010 Jul;152A(7):1661-9.
- Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet.* 2011 Aug;80(2):117-26.
- van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet.* 2005 Jan;13(1):6-25.
- Van Naarden Braun K, Autry A, Boyle C. A population-based study of the recurrence of developmental disabilities--Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Surveillance Program, 1991-94. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2005 Jan;19(1):69-79.
- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science.* 2008 Apr 25;320(5875):539-43.
- Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics.* 2005 Dec 13;6:180.

- Wentzel C, Fernström M, Ohrner Y, Annerén G, Thuresson AC. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Eur J Med Genet*. 2008 Nov-Dec;51(6):501-10.
- Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K et al. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2010a Oct 23;376(9750):1401-8.
- Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM, Halal F, Gowans G, et al. Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am J Hum Genet*. 2010 Aug 13;87(2):219-28.
- Willis A, Bender HU, Steel G, Valle D. PRODH variants and risk for schizophrenia. *Amino Acids*. 2008 Nov;35(4):673-9.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009b;10:451-81.
- Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet*. 2009a Jul;41(7):849-53.

**Elektroniniai šaltiniai:**

[http://dgv.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2\\_hg18/](http://dgv.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2_hg18/)

<http://decipher.sanger.ac.uk/>

<http://omim.org/>

<http://www.genecards.org/>

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>

## **PADĖKA**

Ši disertacija buvo rengta VU MF Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje 2009-2013 metais. Molekuliniai citogenetiniai tyrimai vLGH metodu buvo atlikti Kipro neurologijos ir genetikos instituto citogenetikos ir genomikos laboratorijoje 2009-2011 metais.

Nuoširdžiai dėkoju:

Darbo vadovui prof. habil. dr.Vaidučiui Kučinskui už galimybę įgyvendinti mokslinę darbo idėją bei vertingas pastabas ir paskatinimą.

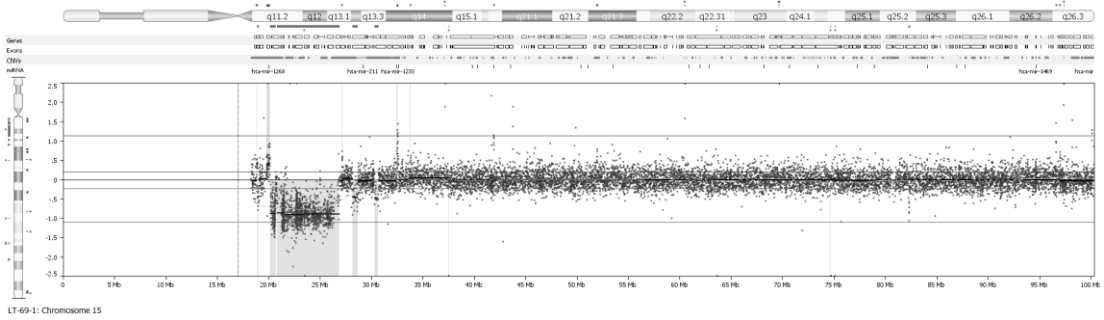
Prof. Philippos C. Patsalis ir jo vadovaujamiems mokslininkams už galimybę atlikti molekulinį kariotipavimą, už pastabas ir pagalbą rengiant mokslines publikacijas.

VU MF Žmogaus ir medicininės genetikos katedros ir VŠĮ VU ligoninės Medicininės genetikos centro darbuotojams už bendradarbiavimą.

doc.dr.Jūratei Kasnauskienei, dr.Vytautui Šliužui už pastabas ir pagalbą, redaguojant mokslinį darbą.

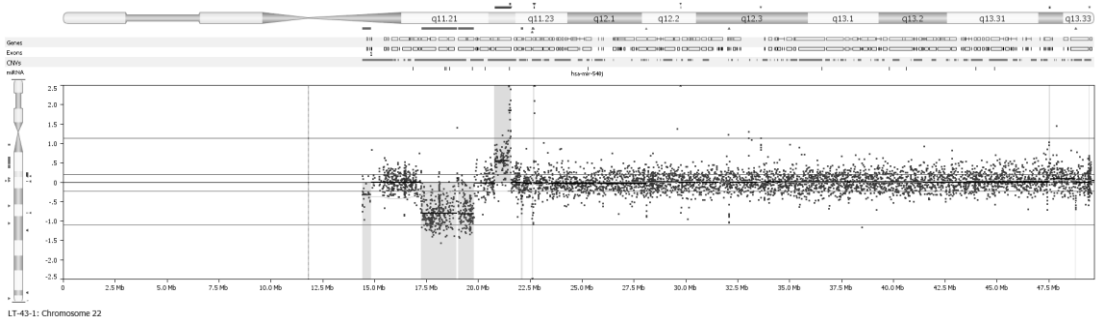
Pacientų šeimoms už sutikimą dalyvauti tyrime.

# PRIEDAS



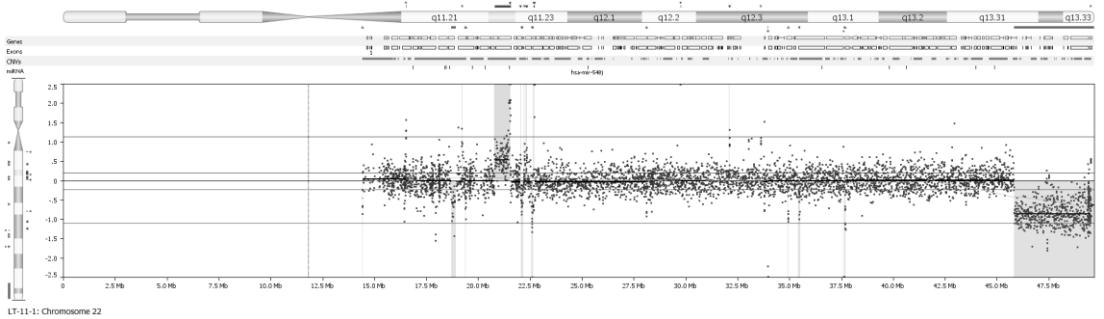
LT-69-1: Chromosome 15

**A. arr[hg18] 15q11.2q13.1(22,293,861-26,890,764)x1 *dn***



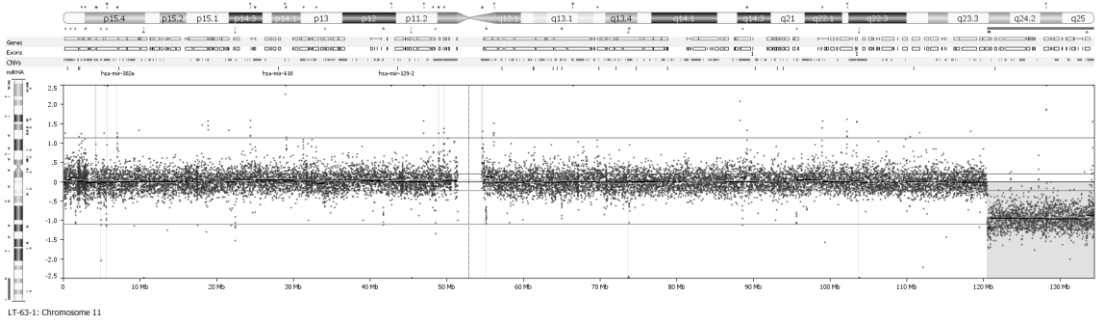
LT-43-1: Chromosome 22

**B. arr[hg18] 22q11.21(17,018,751-19,795,282)x1 *dn***



LT-11-1: Chromosome 22

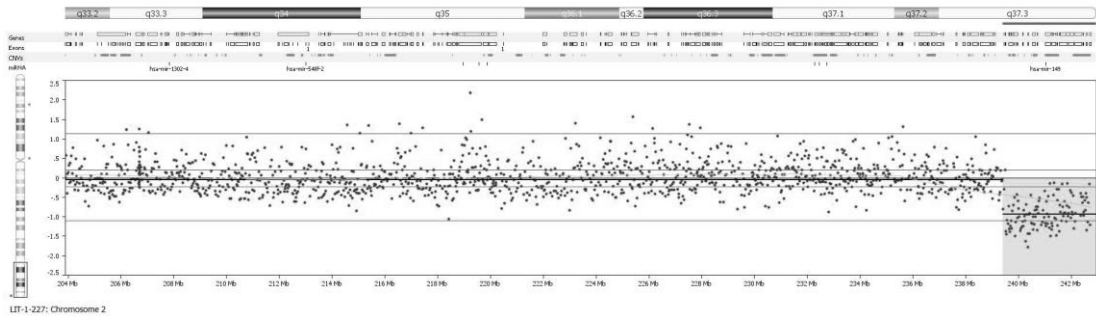
**C. arr[hg18] 22q13.31q13.3(45834903-49529400)x1 *dn***



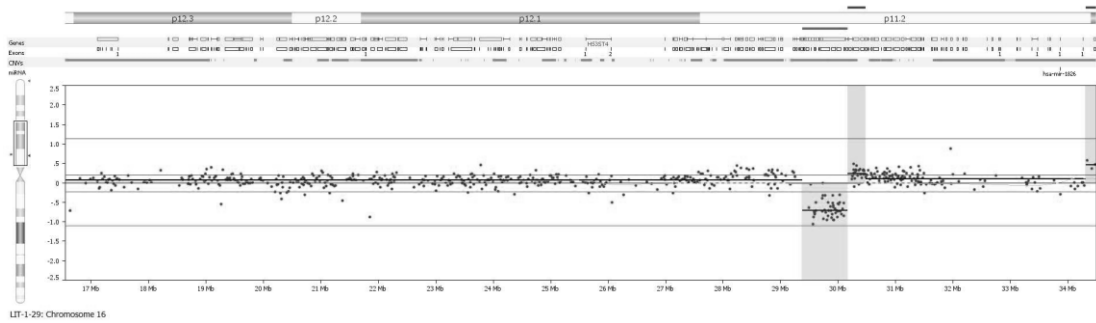
LT-63-1: Chromosome 11

**D. arr[hg18] 11q23.3q25(120,505,418-134,452,384)x1 *mat***

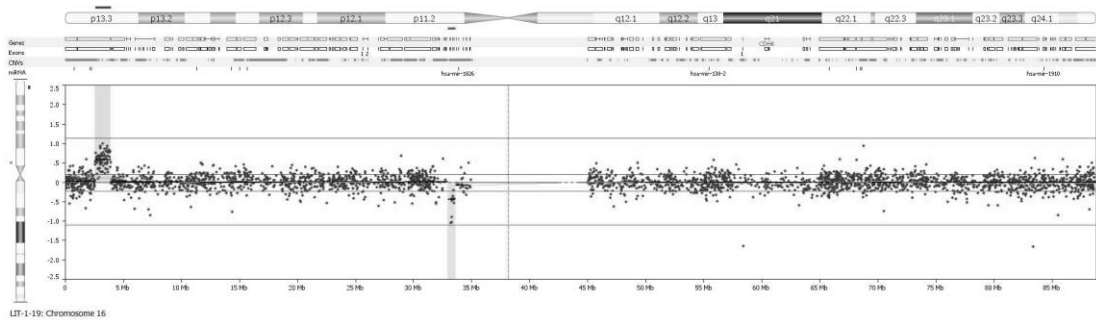




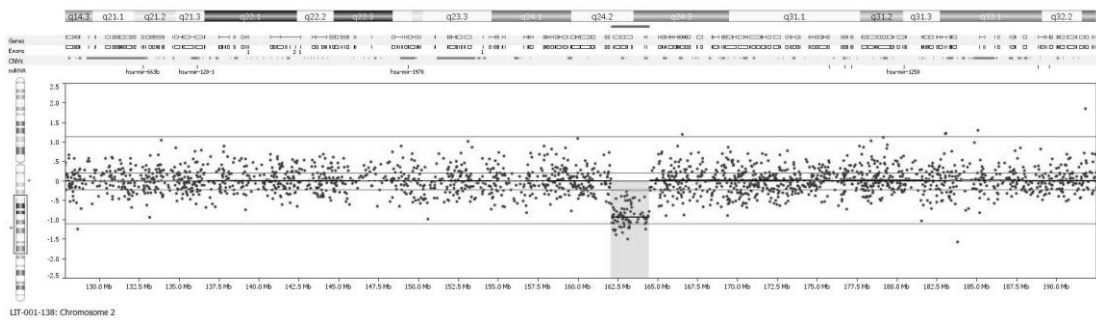
**E. arr[hg18] 2q37.3 (239,525,614-242,717,216)x1 *dn***



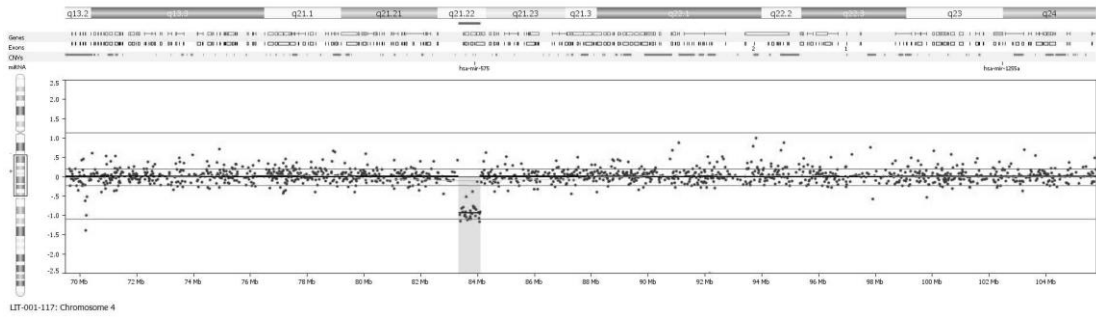
**F. arr[hg18] 16p11.2 (29,563,985-30,106,254)x1 *mat/dn***



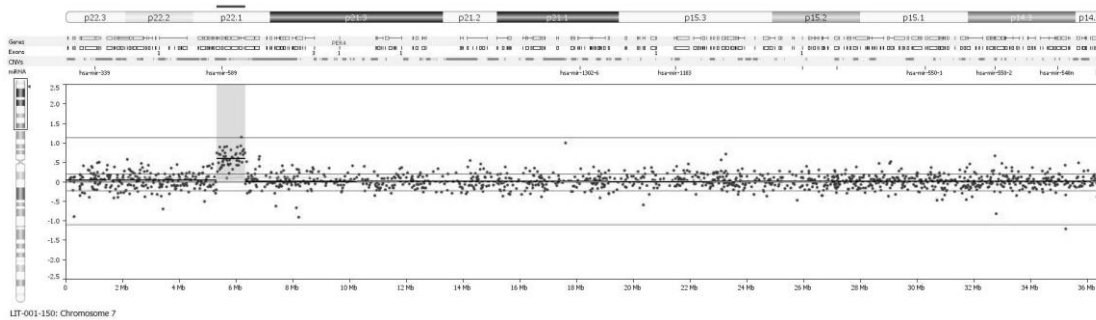
**G. arr[hg18] 16p13.3 (2,589,524-3,911,387)x3 *dn***



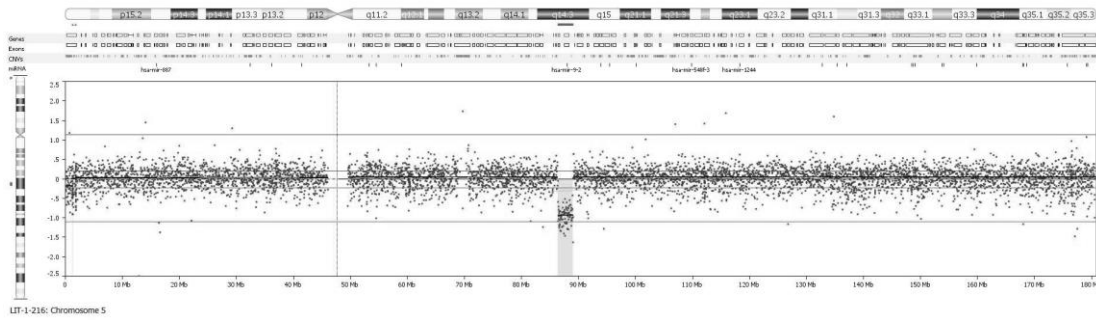
**H. arr[hg18] 2q24.2q24.3(162,118,995-164,461,141)x1 *dn***



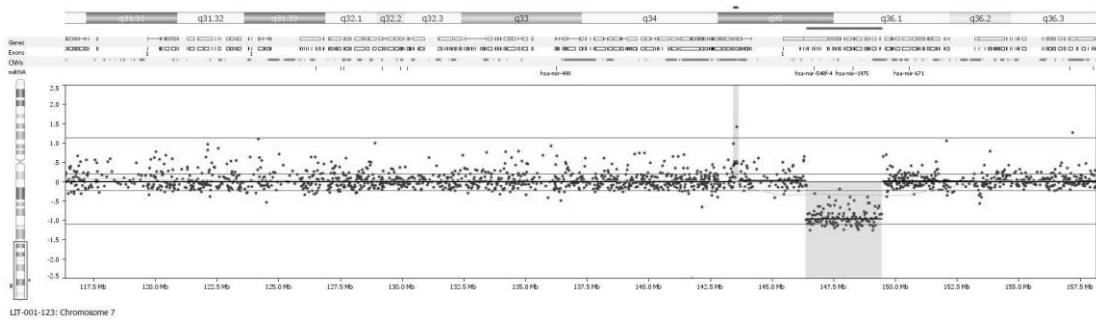
I. arr[hg18] 4q21.2(83,373,844-84,097,897)x1 *dn*



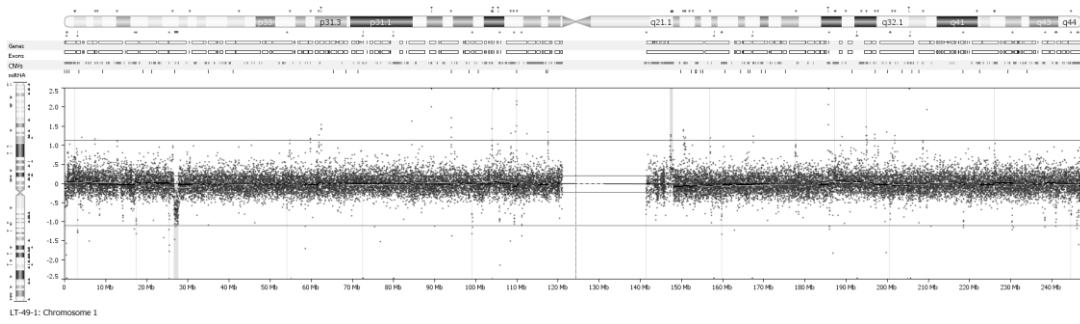
Y. arr[hg18] 7p22.1((5,337,072-6,316,915)x3 *dn*



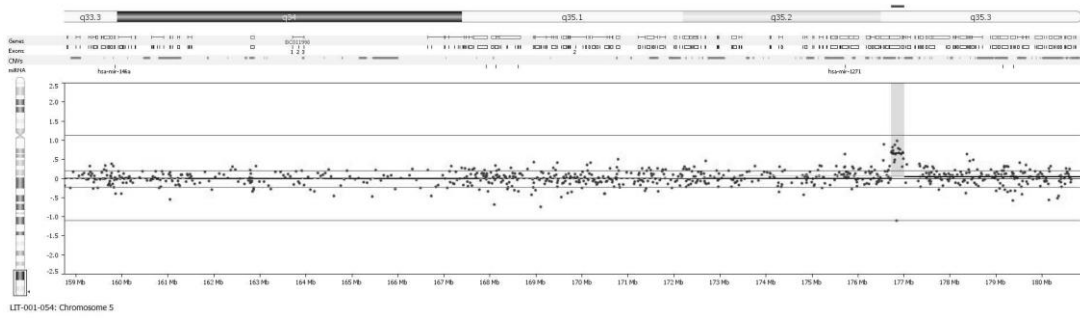
J. arr[hg18] 5q14.3(86,456,211-89,104,733)x1 *dn*



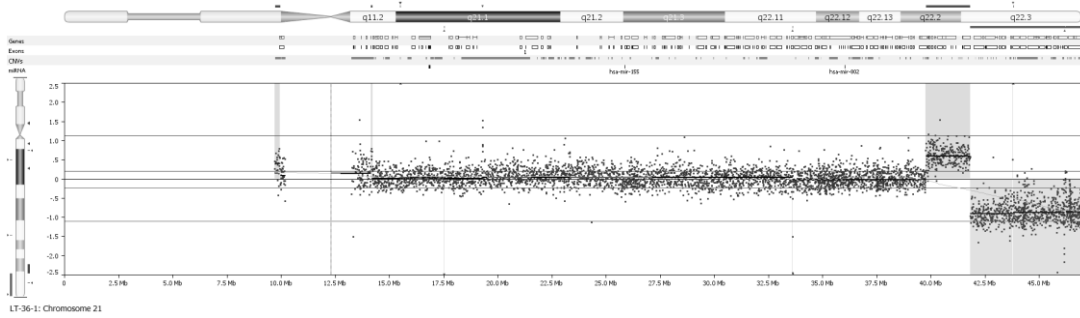
K. arr[hg18] 7q35q36.1(146,392,196-149,441,454)x1 *dn*



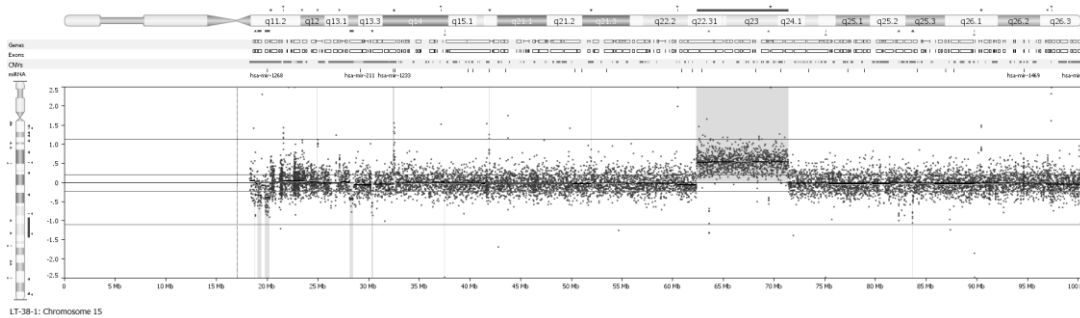
**L. arr[hg18] 1p36.11(26,714,062-27,728,654)x1 *dn***



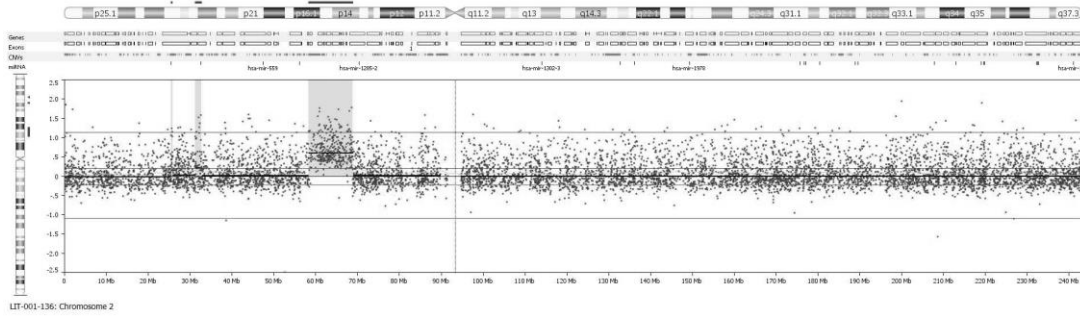
**M. arr[hg18] 5q35.3(176,728,738-176,992,730)x3 *dn***



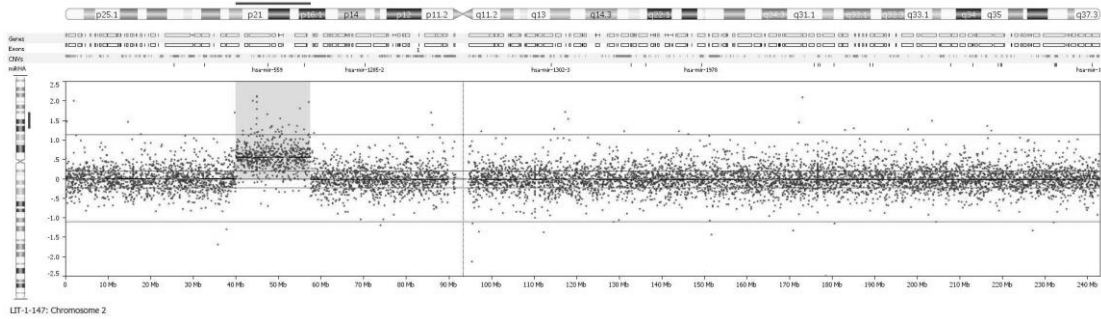
**N. arr[hg18] 21q22.3(41,817,957-46,944,323)x1 *dn*, 21q22.2q22.3(39,774,417-41,817,957)x3 *dn***



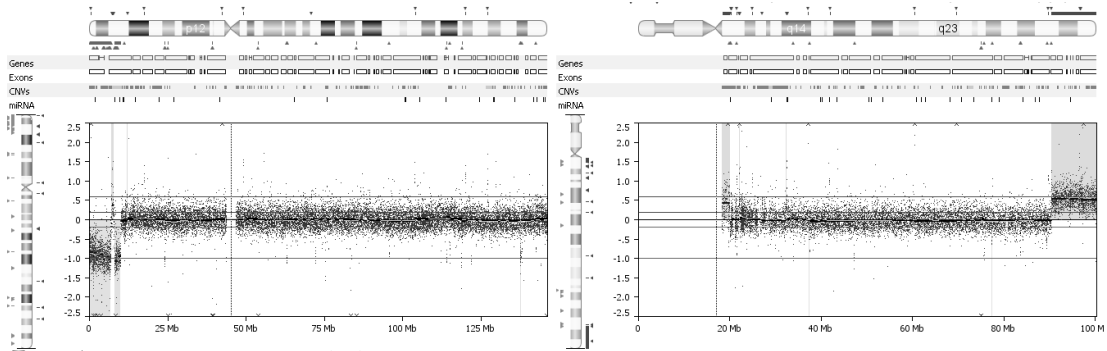
**O. arr[hg18] 15q22.21q24.1(62,383,648-71,456,752)x3 dn**



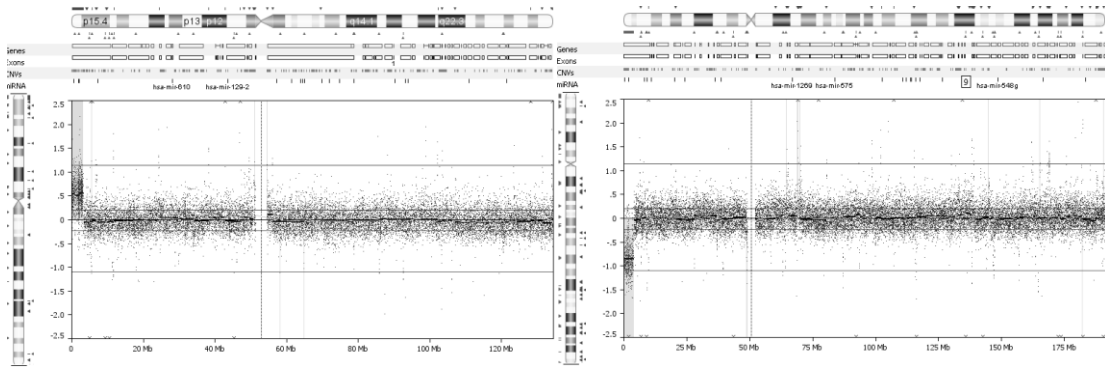
**P. arr[hg18] 2p16.1p14.1 (58,656,378- 68,790,747)x3 dn**



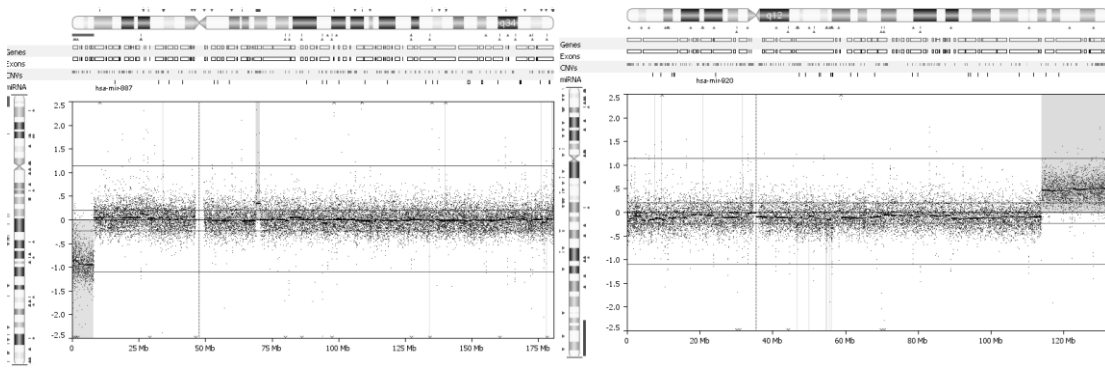
**R. arr[hg18] 2p22.1p16.1(40,059,584-57,546,352)x3 dn**



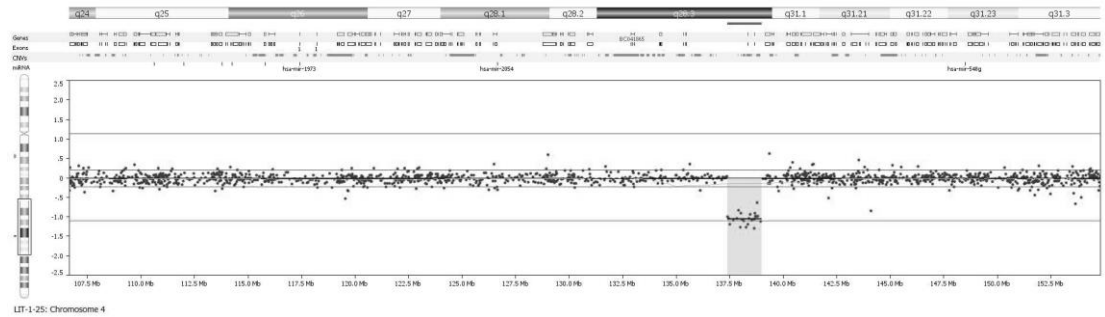
**S. arr[hg18] 8p23.3p23.1(0-7,036,726)x1, 15q26.1q26.3(90,472,251-100,338,915)x3 dn**



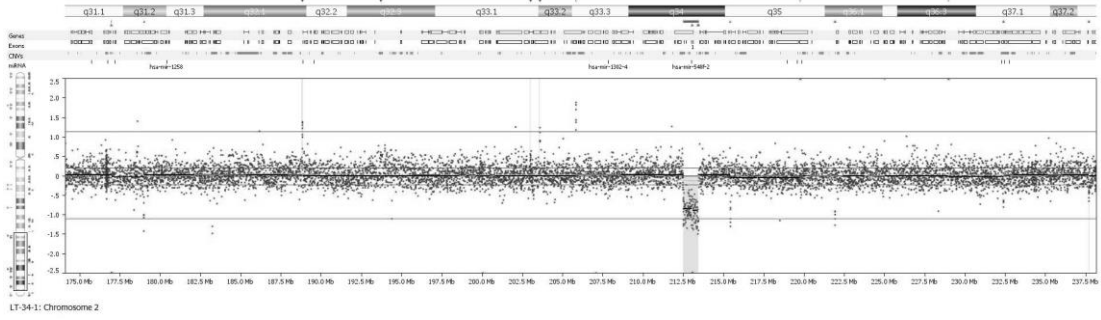
**T. arr[hg18] 4p16.3(0-4,194,871)x1, 11p15.4p15.5(0-3,357,154)x3 *pat***



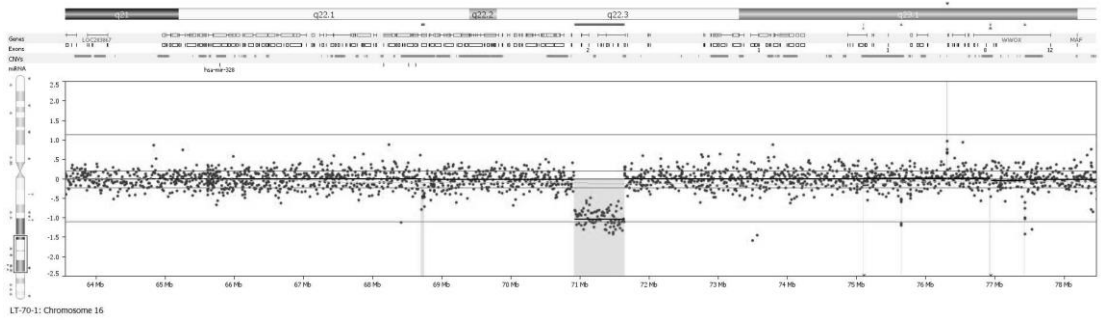
**U. arr[hg18] 5p15.33p15.31(0-8,157,370)x1, 12q24.21q24.33 (113,931,344-132,349,534)x3 *mat***



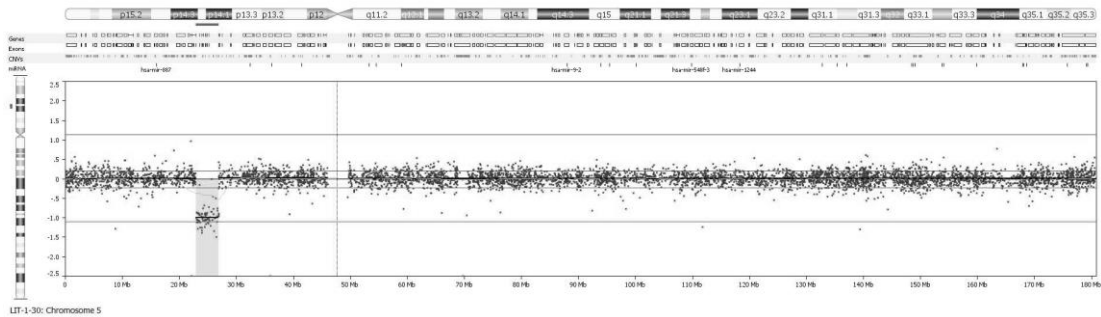
**V. arr[hg18] 4q28.3(137,417,138-138,947,393)x1 *mat***



**Z. arr[hg18] 2q34(212,505,294-213,463,152)x1 *dn***



**W. arr[hg18] 16q22.3 (70,919,282-71,645,680)x1 *dn***



**X. arr[hg18] 5p14.3p14.1(23,025,478-26,938,536)x1 *dn***