



*Szymon Dębicki*

# **Submikroskopowe rearanżacje chromosomowe, jako przyczyna niepełnosprawności intelektualnej**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
pod kierunkiem: **Prof. dr hab. Macieja Krawczyńskiego**

Praca dofinansowana z projektu Unii Europejskiej CHERISH nr 223692  
oraz z projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach  
uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”,  
Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego  
przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Poznań, 2012

*Serdeczne podziękowania składam  
Panu Profesorowi Maciejowi Krawczyńskiemu  
za pomoc w trakcie realizacji pracy.*

*Serdecznie dziękuję  
Pani Profesor Annie Latos-Bieleńskiej  
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej.*

*Dziękuję dr Magdalenie Badurze-Stronce  
oraz dr Bartłomiejowi Budnemu  
za pomoc w realizacji części badań.*

# Spis treści

1	Wstęp	4
1.1	Niepełnosprawność intelektualna – uwagi ogólne	4
1.2	Klasyfikacja niepełnosprawności intelektualnej	4
1.3	Etiologia niepełnosprawności intelektualnej	5
1.3.1	Genetyczne przyczyny niepełnosprawności intelektualnej	6
1.3.1.1	Aberracje liczbowe chromosomów	6
1.3.1.2	Aberracje strukturalne chromosomów	8
1.3.1.3	Submikroskopowe aberracje chromosomowe	10
1.3.1.4	Mutacje w genach sprzężonych z chromosomem X (XLMR; ang. <i>X-linked Mental Retardation</i> )	15
1.3.1.5	NI uwarunkowana autosomalnie	22
1.4	Nowoczesne techniki cytogenetyki molekularnej w diagnostyce NI	25
1.5	Algorytm postępowania diagnostycznego u pacjentów z NI	31
2	Cele pracy	33
3	Pacjenci, metody i materiały	34
3.1	Charakterystyka grupy badanej	34
3.2	Metody badawcze	35
3.2.1	Badania kliniczne	35
3.2.2	Materiał biologiczny do badań	35
3.2.3	Badania kariotypu	36
3.2.4	Przygotowanie DNA do badań molekularnych	36
3.2.4.1	Izolacja genomowego DNA	36
3.2.4.2	Ocena jakościowa i ilościowa DNA po izolacji	37
3.2.5	Badania MLPA	37
3.2.6	Badania metodą SNP-array oraz aCGH	38
3.2.6.1	Badania metodą SNP-array	39
3.2.6.2	Badania metodą aCGH	43
3.2.7	Badania liczby kopii regionu genomowego metodą qPCR	45
3.3	Materiały	48
3.3.1	Odczynniki	48
3.3.2	Internetowe programy komputerowe i bazy danych	49
4	Wyniki	50
4.1	Wyniki badania MLPA	50
4.1.1	Podsumowanie wyników badania MLPA	54
4.2	Wyniki badania SNP-array oraz aCGH	55
4.2.1	Podsumowanie wyników badań aCGH i SNP-array	72
4.3	Podsumowanie wyników	72
5	Dyskusja	80
5.1	Badania MLPA	80
5.2	Badania SNP-array/aCGH	85
6	Wnioski	102
7	Streszczenie	103
8	Summary	104
9	Spis skrótów	105
10	Spis tabel	108
11	Spis rycin	109
12	Piśmiennictwo	111

# 1 Wstęp

## 1.1 *Niepełnosprawność intelektualna – uwagi ogólne*

Niepełnosprawność intelektualna (NI) dotyczy blisko 3% populacji i stanowi poważny problem medyczny i społeczny. Częstość jej występowania wśród dzieci do lat 16 waha się od 2 do 4%, a wśród osób dorosłych od 1 do 2% [121,162,173]. Termin niepełnosprawność intelektualna nie jest diagnozą, lecz objawem. Nie informuje o etiologii, rokowaniu czy specyficznym leczeniu. Odnosi się do stanu klinicznego i dotyczy funkcjonowania intelektualnego oraz społecznego. W piśmiennictwie stosowane są także terminy: „upośledzenie umysłowe”, „oligofrenia”, „niedorozwój umysłowy”. Niepełnosprawność intelektualna stanowi bardzo heterogenną grupę zaburzeń i niestety w wielu przypadkach (20–50%) jej etiologia pozostaje nieznana. Z uwagi na różnorodne uwarunkowania, obraz kliniczny, dynamikę przebiegu oraz rokowanie, istnieje wiele definicji niepełnosprawności intelektualnej. Według Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego (DSM-IV) NI to „istotnie niższe od przeciętnego funkcjonowanie intelektualne (IQ poniżej 70), ujawniające się poniżej 18. roku życia, współwystępujące z istotnym ograniczeniem w zakresie dwóch lub więcej spośród następujących zdolności przystosowawczych: porozumiewania się, samoobsługi, trybu życia domowego, kontaktów społecznych, korzystania z dóbr społeczno-kulturowych, kierowania sobą, troski o zdrowie i bezpieczeństwo, zdolności szkolnych oraz sposobu organizowania wolnego czasu i pracy.”

## 1.2 *Klasyfikacja niepełnosprawności intelektualnej*

Istnieje wiele klasyfikacji stopnia NI. Ogólny poziom funkcjonowania intelektualnego jest najczęściej oceniany za pomocą ilorazu inteligencji (IQ; ang. *intelligence quotient*) określanego przy zastosowaniu standaryzowanych testów inteligencji np. skali inteligencji Wechslera [147,173], przyjmując wartość IQ=100, jako przeciętny poziom inteligencji, który uzyskano uśredniając wyniki testowe grupy osób reprezentujących całą populację (w tym samym wieku) [142]. Podziału niepełnosprawności intelektualnej dokonuje się na podstawie liczby odchyień

standardowych od średniej [21]. Stosując powyższe kryterium Światowa Organizacja Zdrowia (WHO; ang. *World Health Organization*) w 1968 roku podzieliła niepełnosprawność intelektualną na poniższe kategorie (Tab. 1), przy czym NI graniczna jest często traktowana jako dolny zakres normy.

Tab.1. Klasyfikacja NI według WHO

Stopień NI	Wskaźnik IQ
graniczna	85-70
lekka	69-50
umiarkowana	49-35
znaczna	34-20
głęboka	<20

Przy takim podziale, zdecydowana większość (90%) przypadków NI to stopień lekki (IQ  $\geq$  50). Osoby te są zdolne do samodzielnego funkcjonowania w społeczeństwie i pracy. Jedynie 10% stanowią pacjenci z NI umiarkowanego i znacznego stopnia (IQ < 50) [162]. U osób dorosłych z powyższymi stopniami NI rozwój psychiczny odpowiada poziomowi 9. i 6. roku życia. Wysoka heterogenność przyczyn sprawia, że etiologia głębokiego stopnia NI (rozwój dorosłego człowieka na poziomie 3. roku życia lub niższym) pozostaje niewyjaśniona w 20-50% przypadków [159,160]. Szacunkowy odsetek NI o nieustalonej przyczynie zwiększa się nawet do 75-80% w grupie pacjentów z lekką i graniczną NI [51].

Niepełnosprawność intelektualną można także podzielić na dwie główne kategorie - zespołową (ang. *syndromic ID*), gdy towarzyszą jej cechy dysmorficzne lub wady narządów wewnętrznych, oraz izolowaną (ang. *non-syndromic ID* lub *non-specific ID*), gdy jedynym objawem jest niepełnosprawność intelektualna [31].

### **1.3 Etiologia niepełnosprawności intelektualnej**

Istnieje ogromna ilość znanych przyczyn NI, ale trzeba wspomnieć, że nie zawsze są one znane. W normalnych warunkach intelekt człowieka jest kształtowany poprzez współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych. Czynniki uszkodzające płód powodujące NI mogą działać w okresie pre-, peri- oraz postnatalnym. Do czynników uszkodzających płód w łonie matki należą: promieniowanie jonizujące, niedotlenienie,

urazy mechaniczne, działanie niektórych leków, zatrucia, zaburzenia hormonalne matki, infekcje, awitaminoza, zaburzenia krążenia czy silne urazy psychiczne matki. NI może być także wynikiem uszkodzenia płodu w czasie akcji porodowej. Najczęściej mówi się o urazie okołoporodowym, którego konsekwencją jest tzw. krwotok wewnątrzczaszkowy i niedotlenienie mózgu. Częstym następstwem tego zdarzenia jest porażenie mózgowie. Podaje się, że od 50 do 70% dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym wykazuje NI. Należy również pamiętać o czynnikach zaburzających rozwój dziecka w życiu pozapłodowym. Spośród wielu chorób, urazów i zatruc mogących być przyczyną NI, najczęściej wymienia się: zapalenie opon mózgowych i mózgu, choroby wirusowe (np. świnka, odra, różyczka, ospa wietrzna), zatrucia metalami ciężkimi, lekami oraz urazy głowy. Wymienione czynniki występują powszechnie, jednak nie w każdym przypadku powodują powstanie NI. Skutki ich działania zależą między innymi od wrażliwości organizmu dziecka, przebiegu choroby i stosowanego leczenia.

Genetyczne przyczyny NI odpowiadają za 60% przypadków o znanej etiologii. Przy poprawie opieki przed- i okołoporodowej czynniki genetyczne nabierają coraz większego znaczenia [174].

### **1.3.1 Genetyczne przyczyny niepełnosprawności intelektualnej**

Genetycznie uwarunkowana niepełnosprawność intelektualna ma swoje podłoże w wielu różnorodnych zmianach materiału genetycznego, przede wszystkim liczby lub struktury chromosomów, takich jak aneuploidie (np. zespół Downa), zespołach mikrodelecji (np. zespół Pradera-Willi'ego), rearanżacjach subtelomerowych oraz chorobach jednogenowych [161].

#### **1.3.1.1 Aberracje liczbowe chromosomów**

Liczbowe aberracje chromosomowe obejmują największe zmiany materiału genetycznego. Zmianie ulega liczba całych chromosomów. Wiele aberracji chromosomowych związanych z NI wynika z obecności dodatkowego chromosomu (trisomie, np. zespół Edwardsa). Do trisomii najczęściej prowadzi "nierozdzielność" chromosomów (ang. *non-disjunction*) podczas podziału mejotycznego. Najczęstszym zespołem wynikającym ze zmiany liczby chromosomów jest zespół Downa. Szacuje się,

że częstość występowania tej choroby wynosi 1:650–1000 żywych urodzeń [121]. U około 3-4% pacjentów występuje nie zrównoważona translokacja robertsonowska chromosomu 21, zaś u 1-2% trisomia w układzie mozaikowym. Stosunkowo rzadką przyczyną zespołu Downa jest duplikacja części chromosomu 21, obejmująca tzw. region krytyczny (21q21.3-q22). Zespół Downa cechuje się licznymi cechami dysmorfii takimi jak: spłaszczona potylicyca lub małogłowie, spłaszczona nasada nosa, skośnie i szeroko rozstawione szpary powiekowe, nisko osadzone, małe małżowiny uszne oraz powiększony język z bruzdami. U noworodków z zespołem Downa występuje również obniżone napięcie mięśniowe. Większość chorych wykazuje NI od lekkiego (IQ 50–70) do umiarkowanego (IQ 35–50) stopnia [121]. Obecnie wiadomo, że zdolności intelektualne i rozwój społeczny osób z zespołem Downa w dużej mierze mogą być kształtowane przez warunki środowiskowe, a wczesna pomoc pedagogiczna w wychowywaniu dzieci z zespołem Downa w istotny sposób wpływa na ich rozwój [104]. Wykazano zależność między wiekiem matki a częstością występowania zespołu Downa u dzieci. Wśród matek w wieku 20–24 lat ryzyko wystąpienia zespołu Downa u dziecka wynosi 1:1490, w wieku 40 lat 1:60, a u matek po 49 roku życia 1:11 urodzonych dzieci ma zespół Downa. Mimo to, 80% dzieci z zespołem Downa rodzą matki poniżej 35. roku życia, co związane jest z najwyższą płodnością w tej grupie wiekowej [173].

Oprócz zespołu Downa do najczęstszych aneuploidii autosomów należą: zespół Edwardsa i Patau'a. Częstość występowania zespołu Edwardsa szacowana jest na 1:8000 urodzeń. Około 95% płodów z trisomią 18 ulega samoistnemu poronieniu. Około 30% żywo urodzonych dzieci z zespołem Edwardsa umiera w pierwszym miesiącu życia, tylko 10% przeżywa 1 rok. Częstość występowania zespołu Edwardsa wzrasta z wiekiem matki, podobnie jak w przypadku zespołu Downa. Zespół Edwardsa cztery razy częściej występuje u dziewczynek niż chłopców [147].

Trisomia chromosomów 13 pary w zespole Patau'a również spowodowana jest nierozdzielnością chromosomów podczas I lub II podziału mejotycznego u jednego z rodziców. Wiąże się z dużym ryzykiem poronienia lub urodzenia martwego dziecka. Około 70% dzieci z zespołem Patau'a umiera w ciągu pierwszego półrocza życia, do pierwszego roku życia umiera kolejnych 10% chorych, a przypadki przeżycia chorego do późnego dzieciństwa są niezwykle rzadkie [109,174].

Obok aneuploidii autosomów wyróżniamy także zmiany liczby chromosomów płciowych, które zazwyczaj mają łagodniejszy przebieg. Wśród nich należy wymienić przede wszystkim zespół Klinefeltera oraz trisomię X. Mężczyźni z zespołem Klinefeltera

posiadają dodatkowy chromosom X. Aberracja występuje przeciętnie u 1:500 noworodków płci męskiej [113]. Zespół Klinefeltera rzadko rozpoznawany jest w wieku dziecięcym, gdyż zwykle nie ma w tym okresie charakterystycznych cech. Występować może jedynie łagodne opóźnienie rozwoju i pewnego stopnia niedojrzałość. U starszych chłopców obserwuje się małe, twarde jądra. Mężczyźni cechują się zwykle słabym umięśnieniem i delikatną budową ciała, z długimi kończynami i krótkim tułowiem.

Trisomia X polega na obecności dodatkowego chromosomu X u kobiet. Aberracja ta występuje z częstością około 1:1000 żywych urodzeń. Trisomii X towarzyszy najczęściej wysoki wzrost, trudności w nauce, obniżona inteligencja, a w niektórych przypadkach lekka NI [151].

### **1.3.1.2 Aberracje strukturalne chromosomów**

Aberracje strukturalne powstają na skutek pęknięć chromosomów, a następnie nieprawidłowego łączenia się ich fragmentów. Strukturalne aberracje chromosomowe mogą zachodzić spontanicznie lub pod wpływem czynników mutagennych (np. promieniowania jonizującego, ultrafioletowego czy też wysokiej temperatury). Aberracje strukturalne chromosomów dzielimy na:

- delecje – polegające na utracie fragmentu chromosomu,
- duplikacje - polegające na podwojeniu fragmentu chromosomu,
- inwersje - polegające na odwróceniu fragmentu chromosomu o 180 stopni,
- translokacje - polegające na przeniesieniu fragmentów między niehomologicznymi chromosomami,
- chromosomy pierścieniowe – powstające, gdy ramiona chromosomu łączą się, tworząc pierścień - zazwyczaj towarzyszy temu delecja dystalnych fragmentów chromosomu.

Najczęstszymi aberracjami strukturalnymi chromosomów u pacjentów z NI są translokacje niezrównoważone, prowadzące do delecji lub duplikacji fragmentów chromosomów. Zrównoważone aberracje strukturalne chromosomów występują z częstością 1:2000 żywych urodzeń [164]. Zazwyczaj nie manifestują się one nieprawidłowym fenotypem, jednak w około 6% przypadków stwierdzana jest niepełnosprawność intelektualna [109]. Sugeruje się jednak, że pacjenci ci mogą posiadać dodatkowe mikrodelecje lub mikroduplikacje, nie wykryte w rutynowym badaniu



kariotypu, co tłumaczyłoby NI [24]. Aberracje strukturalne występują w dwóch dobrze znanych zespołach związanych z NI: zespole krzyku kota oraz w zespole Wolfa-Hirschhorna.

Zespół krzyku kota (CDC; fr. *cri-du-chat*) spowodowany jest delecją krótkiego ramienia chromosomu 5. Wielkość delecji może być różna, od 5p15.2 do całego krótkiego ramienia. Większość delecji powstaje *de novo*. Przypuszcza się, że do genów, których delecja wpływa na fenotyp zespołu krzyku kota należą położone na krótkim ramieniu chromosomu 5 geny kodujące białka biorące udział w rozwoju mózgu - semaforyna F i delta-katenina, a także gen kodujący telomerazę [43,101,139]. Częstość występowania zespołu ocenia się na 1:20000-50000 żywych urodzeń [95]. Oprócz niepełnosprawności intelektualnej (od stopnia lekkiego do głębokiego), na fenotyp pacjentów z zespołem krzyku kota składają się, w okresie noworodkowym: charakterystyczny płacz dziecka przypominający miauczenie kota, mała masa urodzeniowa, niechęć do ssania, słabe przybieranie na wadze, wiotkość mięśni, utrudnione oddychanie. Osoby dotknięte zespołem krzyku kota często są nadpobudliwe, agresywne, łatwo je wyprowadzić z równowagi. Mają one także skłonność do samookaleczeń.

Zespół Wolfa-Hirschhorna (WHS; ang. *Wolf-Hirschhorn Syndrome*) jest zespołem spowodowanym delecją ramion krótkich chromosomu 4, obejmującą co najmniej region krytyczny 4p16.3 (geny *WHSC1* oraz *WHSC1*). Rozmiar delecji u poszczególnych pacjentów może się różnić, dlatego też zespół ten może być również klasyfikowany jako zespół mikrodelecji. NI wykazuje zwykle stopień głęboki. Częstość zespołu szacuje się na około 1:20000-50000 urodzeń, przy czym występuje on częściej u dziewczynek [14,94]. Do typowych objawów należą: małogłowie, wypukła gładzista czoła, łukowaty przebieg linii brwi, szeroko rozstawione i płytko osadzone gałki oczne, szczelina tęczęwki, szerokie szpary powiekowe, często skierowane skośnie w dół, wysunięta i szeroka nasada nosa, długi grzbiet nosa, krótka rynienka podnosowa, niedorozwój szczęki, wąska szpara ust z wywiniętą wargą górną i dolną, czasem rozszczep wargi i/lub podniebienia oraz nisko osadzone małżowiny uszne z małym płatkami [15].

### 1.3.1.3 Submikroskopowe aberracje chromosomowe

#### Zespoły mikrodelecyjne

Oprócz klasycznych aberracji chromosomowych, przyczyną NI mogą być także submikroskopowe zmiany genomowe, których wielkość jest mniejsza od rozdzielczości standardowego badania kariotypu. Są one częstą przyczyną zaburzeń fenotypowych stwierdzanych u osób, u których rutynowe badanie wykazało prawidłowy lub zrównoważony kariotyp. Submikroskopowe aberracje chromosomowe (znacznie częściej delecje niż duplikacje) stwierdzane u pacjentów z NI, powodują powstanie tzw. zespołów mikrodelecyjnych, zwanych też zespołami przyległych genów (ang. *contiguous gene syndrome*) [163]. Diagnostyka aberracji submikroskopowych opiera się na technikach cytogenetyki molekularnej takich jak: FISH, MLPA czy wreszcie array-CGH lub SNP-array. Spośród wielu znanych zespołów mikrodelecyjnych, poniżej przedstawiono najbardziej znane z nich, związane z występowaniem NI.

#### Zespół DiGeorge'a (DGS; ang. *DiGeorge Syndrome*)

Przyczyną zespołu DiGeorge'a jest mikrodelecja krytycznego regionu 22q11.2 (MDGCR1; ang. *Minimal DiGeorge Critical Region 1*) w obrębie długiego ramienia chromosomu 22, obejmująca około 3 Mb [130]. W obrębie regionu krytycznego zidentyfikowano około trzydziestu genów kodujących czynniki odpowiedzialne za rozwój i migrację komórek grzebienia nerwowego (m.in.: geny *TBX1*, *COMT*, *PRODH*, *HIRA*) [170,171]. Delecja regionu 22q11.2 jest najczęstszym zespołem mikrodelecyjnym u człowieka i występuje z częstością 1:4000–5000 urodzeń [59]. Większość dzieci z mikrodelecją 22q11.2, osiągająca wiek szkolny ma problemy neuropsychologiczne, socjologiczne i trudności w nauce spowodowane zaburzeniami myślenia abstrakcyjnego, rozumienia, czytania i liczenia, a NI ma najczęściej stopień lekki [107]. Mikrodelecje w regionie chromosomowym 22q11.2 są związane z około z 30-krotnym wzrostem ryzyka zachorowania na schizofrenię i często wykrywa się je u pacjentów cierpiących na tę chorobę [35]. Opisano ponad 180 cech wchodzących w skład zespołu DiGeorge'a [42,57,58,144,167]. Do najważniejszych z nich należą:

- wrodzona wada serca (dotycząca zwłaszcza podziału stożka i pnia tętniczego),
- hipoplazja lub dysfunkcja grasicy i gruczołów przytarczycznych,
- zaburzenia immunologiczne,

- dysmorfia twarzy,
- rozszczep podniebienia,
- wrodzone wady nerek,
- niepełnosprawność intelektualna,
- zwiększone ryzyko zachorowania na choroby psychiczne.

### **Zespół Phelan-McDermida (PMS; ang. *Phelan-McDermid Syndrome*)**

Zespół ten spowodowany jest terminalną delecją obejmującą fragment długiego ramienia chromosomu 22 (22q13.3). Opisywano również przypadki mozaicyzmu. Do utraty regionu 22q13.3 dochodzi wskutek delecji, translokacji lub utworzenia chromosomu pierścieniowego [92]. U około 80% osób z zespołem Phelan-McDermida delecja powstaje *de novo* [79]. Chore dzieci charakteryzują się znacznym opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego, brakiem lub opóźnieniem rozwoju mowy oraz zachowaniami autystycznymi, co jest związane z delecją genu *SHANK3* w regionie 22q13.3 [168]. Badania nad aberracjami regionów subtelomerowych wskazują delecję 22q13.3 jako drugą co do częstości (po delecji 1p36) terminalną delecję prowadzącą do NI [67,124]. Na fenotyp zespołu Phelan-McDermida składają się:

- hipotonia mięśniowa w okresie noworodkowym,
- opóźnienie rozwoju psychomotorycznego,
- opóźnienie lub całkowite zahamowanie rozwoju mowy,
- drobne cechy dymorficzne,
- zachowania autystyczne.

### **Zespół delecji 1p36 (ang. *Monosomy 1p36 Syndrome*)**

Zespół delecji 1p36 spowodowany jest dużą delecją obejmującą dystalny odcinek krótkiego ramienia chromosomu 1. Delecja 1p36 jest najczęstszą terminalną delecją u ludzi. Częstość zespołu jest stosunkowo duża, szacuje się że wynosi około 1:5000 urodzeń [134]. Większość małych dzieci z zespołem delecji 1p36 charakteryzuje się opóźnionym rozwojem psychomotorycznym. Duże wady obecne w przypadku delecji 1p36 to:

- rozszczep wargi lub podniebienia,
- wnetrostwo,
- wrodzone wady serca,

- opóźnienie wzrastania,
- hipotonia mięśniowa,
- opóźnienie rozwoju psychomotorycznego.

### **Zespół Williamsa** (WS; ang. *Williams Syndrome*)

Zespół Williamsa spowodowany jest mikrodelecją o wielkości 1,5-1,8 Mb obejmującą fragment chromosomu 7 (7q11.23), zawierający około 28 genów [119]. U 95% pacjentów z zespołem Williamsa stwierdza się delecję genu kodującego elastynę (*ELN*) [46]. Zespół Williamsa występuje z częstością 1:7500 żywych urodzeń [143]. U pacjentów z tym zespołem obserwuje się zaburzenia osobowości i orientacji wzrokowo-przestrzennej. Przyczyną tych defektów jest prawdopodobnie delecja genu *LIMK1*. Gen ten koduje kinazę białkową, która odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek nerwowych i przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych w mózgu [87]. Iloraz inteligencji osób chorych mieści się w szerokich granicach 20-106 [87]. Dzieci z zespołem Williamsa są nadpobudliwe i mają problemy z koncentracją. Posiadają jednak unikalną osobowość: są bardzo przyjacielskie, gadatliwe i z łatwością nawiązują kontakt z otoczeniem. Typowe objawy zespołu Williamsa to:

- charakterystyczny wygląd twarzy, określany jako „twarz elfa”,
- wady sercowo-naczyniowe, zwłaszcza nadzastawkowe zwężenie aorty i/lub tętnicy płucnej,
- opóźnienie rozwoju psychomotorycznego i charakterystyczne postrzeganie rzeczywistości,
- hiperkalcemia niemowlęca.

### **Zespół Smitha-Magenisa** (SMS; ang. *Smith-Magenis Syndrome*)

Zespół Smitha-Magenisa występuje z częstością 1:25000 urodzeń [2] i spowodowany jest delecją regionu 11.2 krótkiego ramienia chromosomu 17 (17p11.2). Najmniejsza delecja dająca pełnoobjawowy SMS ma wielkość 1,5-2 kb [20]. Sądzi się, że duże zróżnicowanie w obrazie klinicznym SMS wiąże się z wielkością utraconego fragmentu chromosomu [120]. Już we wczesnym okresie dzieciństwa zauważa się wyraźne opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Większość dzieci i osób dorosłych z SMS wykazuje umiarkowaną lub znaczną NI (IQ często nie przekracza 50).

Ponad połowa pacjentów z SMS wykazuje zmniejszoną wrażliwość na ból i temperaturę. Na obraz kliniczny zespołu składają się:

- hipotonia mięśniowa w okresie noworodkowym,
- opóźnienie rozwoju psychomotorycznego,
- niechęć do ssania,
- wady tęczówki,
- wady układu kostnego (płaska twarz, chód Chaplina),
- stereotypie ruchowe,
- autoagresja (bicie się, gryzienie palców lub warg).

### **Zespół Millera-Diekera (MDS; ang. *Miller-Dieker Syndrome*)**

Zespół wad wrodzonych spowodowany delecją regionu 13.3 krótkiego ramienia chromosomu 17. Na szczególną uwagę w regionie 17p13.3 zasługują geny: *LIS* oraz *14-3-3-epsilon*. Pierwszy jest odpowiedzialny za gładkomózgowie (ang. *lissencephalia*), natomiast gen *14-3-3-epsilon* prawdopodobnie przyczynia się do wystąpienia cięższej formy zespołu Millera-Diekera [156]. Cechy charakterystyczne zespołu to:

- gładkomózgowie,
- małogłowie,
- wady układu sercowo-naczyniowego,
- wady nerek,
- wady przewodu pokarmowego,
- opóźnienie rozwoju psychomotorycznego,
- cechy dysmorfii twarzy (hipoplazja jej środkowej części, krótki i zadarty nos, mikrognacja).

### **Zespół Rubinsteina-Taybi'ego (RSTS; ang. *Rubinstein-Taybi Syndrome*)**

Występuje z częstością 1:100000-125000 żywych urodzeń [68]. Pacjenci z zespołem Rubinsteina-Taybi'ego wykazują NI w stopniu umiarkowanym. Przyczyną zespołu Rubinsteina-Taybi'ego jest mikrodelecja 16p13.3 lub mutacja w genie *CREBBP*, zlokalizowanym w krótkim ramieniu chromosomu 16 pary. Większość mutacji w RSTS powstaje *de novo* (około 96%), tylko nieznaczny ich odsetek pacjenci dziedziczą po rodzicach [12]. Charakterystyczne cechy zespołu to:

- małowłowie,
- szerokie kciuki i paluchy,
- wrodzone wady serca i układu moczowego,
- hirsutyzm,
- hipoplazja żuchwy,
- gruszkowate guzki na zębach,
- wnętrostwo,
- niepełnosprawność intelektualna.

### **Zespół Pradera-Willi'ego (PWS; ang. *Prader-Willi Syndrome*)**

Zespół Pradera-Willi'ego był pierwszym opisanym u człowieka przykładem zjawiska rodzicielskiego piętna genomowego. Jednak najczęstszą przyczyną zespołu Pradera-Willi'ego jest częściowa delecja długiego ramienia chromosomu 15 (15q11.2-q13), pochodzącego od ojca (70% pacjentów). Obok delecji, innymi mechanizmami prowadzącymi do zespołu Pradera-Willi'ego są: matczyzna disomia jednorodzielska (UPD; ang. *uniparental disomy*), zaburzenia w centrum piętnowania oraz mutacje w genie *SNRPN* [29,78]. Częstość występowania zespołu ocenia się na 1:10000-25000 żywych urodzeń [148]. NI występuje w stopniu umiarkowanym, często z zaburzeniami rozwoju mowy. Ostatnie doniesienia wskazują na występowanie u osób z zespołem Pradera-Willi'ego nieprawidłowych zachowań społecznych podobnych do występujących w autyzmie, który jest diagnozowany u około 25% pacjentów z PWS [41]. Uważa się, że zespół Pradera-Willi'ego jest najczęstszą genetycznie uwarunkowaną przyczyną otyłości [27]. Na fenotyp choroby składają się m.in.:

- otyłość,
- niski wzrost,
- niepełnosprawność intelektualna,
- hipogonadyzm.

### **Zespół Angelmana (AS; ang. *Angelman Syndrome*)**

Zespół Angelmana spowodowany jest zwykle delecją matczynego regionu 15q11.2-q13 (około 70% pacjentów), rzadziej jednorodzielską, ojcowską disomią chromosomu 15 (2% pacjentów), nieprawidłowym piętnowaniem (2-3% pacjentów) lub mutacjami w genie *UBE3A* (25% pacjentów) [84]. Częstość występowania tego zespołu

wynosi średnio 1:10000-20000 żywych urodzeń [166]. Zespołowi Angelmana towarzyszy także głęboka NI i brak rozwoju mowy. U chorych występują zaburzenia ruchowe w postaci drżenia kończyn i ataksji, mogącej się przejawiać nieprawidłowościami chodu takimi jak jego chwiejność czy niezgrabnymi ruchami rąk. Do innych cech charakterystycznych zespołu należą:

- opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, zwłaszcza mowy,
- zaburzenia ruchu i równowagi,
- częsty śmiech bez powodu,
- padaczka.

### **Rearanżacje subtelomerowe**

Jednym z ważniejszych rodzajów niezrównoważonych strukturalnych aberracji chromosomowych, będących przyczyną zaburzeń rozwoju i NI są nieprawidłowości dotyczące subtelomerowych regionów chromosomów. Dotyczą one bardzo małych, końcowych fragmentów chromosomów, dlatego najczęściej nie są wykrywane metodami cytogenetyki klasycznej. W ostatnich latach, dzięki wprowadzeniu nowych technik cytogenetyki molekularnej do rutynowej diagnostyki zauważono, że znaczna część tych zmian wykrywana jest u osób z idiopatyczną NI (u 5-7% pacjentów z NI stwierdza się aberracje subtelomerowe) [40,47]. Część z nich manifestuje się znanym już fenotypem, jak np. delecja 4p (zespół Wolfa-Hirschhorna), delecja 5p (zespół krzyku kota), czy delecja 22q13.3 (zespół Phelan-McDermida), które zostały już wcześniej omówione. Jednak dla większości rearanżacji subtelomerowych charakterystyczny obraz kliniczny pozostaje niewyjaśniony [40].

#### **1.3.1.4 Mutacje w genach sprzężonych z chromosomem X (XLMR; ang. *X-linked Mental Retardation*)**

W 1938 r. Penrose, brytyjski psychiatra, po raz pierwszy zaobserwował, że NI znacznie częściej dotyczy mężczyzn niż kobiet; według niego, stosunek ten wynosił 3:1. Podobne badania prowadzone przez liczne grupy badawcze w USA, Kanadzie, Australii i Europie potwierdziły tę obserwację, wskazując jednak tylko na większą o 30% liczbę osób płci męskiej wśród osób z NI [116]. Wyjaśnieniem obserwowanej przewagi jest

sprzężenie NI z chromosomem X. Obserwowana, dużo wyższa liczba chorych mężczyzn jest następstwem niemożności kompensacji patogennych mutacji w chromosomie X u hemizygotycznego mężczyzny. W bazie danych OMIM (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*) opisanych jest obecnie 271 chorób sprzężonych z chromosomem X, którym towarzyszy niepełnosprawność intelektualna [73]. Sklasyfikowano i usystematyzowano NI sprzężoną z chromosomem X, a jednostki chorobowe podzielono w zależności od fenotypu na:

- zespołowe (S-XLMR, MRXS; ang. *Syndromic X-linked Mental Retardation*),
- niespecyficzne (NS-XLMR, MRX; ang. *Nonsyndromic X-linked Mental Retardation*),
- zespół łamliwego chromosomu X (FraX; ang. *Fragile X Syndrome*).

Jednakże ogromna liczba genów XLMR oraz znacznie zróżnicowane konsekwencje ich mutacji utrudniają klasyfikację XLMR. Wiele z tych genów jest zaangażowanych w obydwie formy NI (np. geny *ARX*, *MECP2*, *PQBPI*). I tak, mutacje w genie *ARX* są przyczyną S-XLMR w postaci zespołu Westa, zespołu Partingtona, lissencefalii (gładkomózgowia) oraz NS-XLMR, w której jedyny objaw choroby stanowi niepełnosprawność intelektualna. Niektóre postaci wcześniej kwalifikowane jako niespecyficzne, są obecnie zaliczane do postaci specyficznych. Przykładem może być zespół łamliwego chromosomu X (FraX). Początkowo był on uważany za niespecyficzną postać NI, jednak po kompleksowej analizie klinicznej został zakwalifikowany jako postać specyficzna, a obecnie ze względu na wysoką częstość występowania tworzy osobną grupę XLMR [33,85].

Pierwszym z genów związanych z NS-XLMR był *FMR2*, którego mutacje powodują powstanie miejsca łamliwego (FRAXE; ang. *Fragile X Syndrome Type E*) w miejscu Xq28. Następnie zidentyfikowano kolejne geny związane z XLMR: *GDII*, *OPHN1*, *PAK3*, *RSK2*, *IL1RAPL1*, *TM4SF2*, *ARHGEF6*, *MECP2*, *FACL4*, *ARX*. Mutacje w każdym z tych genów są stosunkowo rzadkie, odpowiadają za mniej niż 1% przypadków XLMR. Szacuje się, że monogenowa, sprzężona z chromosomem X niepełnosprawność intelektualna dotyczy 10% mężczyzn z tym zaburzeniem. Obecnie trudno oszacować proporcje zespołowych postaci NI sprzężonych z chromosomem X, lecz na podstawie badań klinicznych mogą one stanowić 30–40% (z uwzględnieniem zespołu FraX). Szacowana na tej podstawie częstość występowania XLMR oceniana jest na 1:1000 mężczyzn [82]. Aktualnie uważa się, że mutacje blisko 100 genów zlokalizowanych w chromosomie X mogą być związane z występowaniem NI [74].



## **Zespół lamliwego chromosomu X (FraX; ang. *Fragile X Syndrome*)**

Jest to najczęstsza dziedziczna przyczyna NI u chłopców i druga co do częstości wśród przyczyn genetycznych (po zespole Downa). Choroba występuje u chłopców z częstością 1:4000, a u dziewczynek z częstością 1:6000-8000 żywych urodzeń [157]. Stanowi 15-25% wszystkich przypadków niepełnosprawności intelektualnej (NI) sprzężonej z chromosomem X (2-2,5% wszystkich mężczyzn z NI), wykazując dziedziczenie dominujące z niepełną penetracją. Najczęstszą przyczyną zespołu FraX jest mutacja dynamiczna w genie *FMRI* polegająca na ekspansji trójnukleotydu CGG. W zależności od liczby powtórzeń CGG wyróżniamy: normę (5-55 powtórzeń), premutację (55-199 powtórzeń) oraz pełną mutację ( $\geq 200$  powtórzeń) [75]. Ekspansja powtórzeń CGG ( $\geq 200$ ) powoduje hipermetylację cytozyny w obrębie sekwencji CGG regionu promotorowego genu *FMRI*, co prowadzi do zahamowania transkrypcji genu, a w konsekwencji do braku produktu białkowego [52,141]. Główną funkcją FMRP (ang. *Fragile X Mental Retardation Protein*), białka kodowanego przez *FMRI*, jest selektywne wiązanie RNA oraz kontrolowanie syntezy białka. *FMRI* reguluje ekspresję wielu innych genów biorących udział w tworzeniu synaps oraz ich plastyczności. Produkt genu *FMRI* odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu synaps, a szczególnie ich dojrzewaniu oraz eliminacji. Obniżony poziom lub brak białka FMRP prowadzi do dysregulacji różnych szlaków, co zaburza rozwój mózgu, prowadząc do opóźnienia rozwoju [132]. Głównym objawem zespołu FraX u mężczyzn po okresie pokwitania jest niepełnosprawność intelektualna, zwykle umiarkowanego lub znacznego stopnia, której towarzyszą zaburzenia zachowania pod postacią zaburzeń koncentracji uwagi, labilności emocjonalnej, cech autystycznych oraz stereotypii ruchowych. Około 90% chłopców z zespołem FraX wykazuje jeden lub więcej objawów autyzmu. Kryteria diagnostyczne autyzmu spełnia ok. 25-35% chorych z FraX [52,65,132]. Inne objawy kliniczne to: makroorchydizm (powiększone jądra) po okresie pokwitania oraz wydłużona, wąska twarz, duże, odstające małżowiny uszne. Kobiety nosicielki pełnej mutacji, z racji posiadania dwóch chromosomów X, z których jeden ulega inaktywacji, wykazują znacznie łagodniejsze objawy choroby; u połowy z nich występować może niepełnosprawność intelektualna lekkiego stopnia bądź trudności w nauce, a także zaburzenia emocjonalne. Kobiety nosicielki premutacji zwykle nie wykazują cech choroby, a poziom ich rozwoju intelektualnego mieści się w granicach normy. Osoby z

zespołem FraX mogą posiadać IQ na granicy normy (zwłaszcza w przypadku kobiet), ale też wykazywać umiarkowany (IQ 35-50) lub znaczny stopień NI (IQ 20-35).

### **Zespołowa postać NI sprzężonej z chromosomem X (S-XLMR, MRXS; ang. *Syndromic X-linked Mental Retardation*)**

Dotychczas zidentyfikowano ponad 140 zespołów S-XLMR. Większości zespołowych form XLMR towarzyszy umiarkowany lub ciężki stopień NI. Zidentyfikowane geny S-XLMR w większości kodują białka o różnorodnej funkcji, których brak powoduje poważne konsekwencje rozwojowe. Jednakże, tak jak wspomniano wcześniej, często mutacje tego samego genu powodują S-XLMR, a innym razem mają istotną rolę w patogenezie NS-XLMR.

Przykładem zespołowego XLMR jest zespół Retta (RTT; ang. *Rett Syndrome*), który został po raz pierwszy rozpoznany przez Andreeasa Retta w 1966 roku. Jest to schorzenie neurologiczne, zaliczane do spektrum autystycznego, które dotyczy niemal wyłącznie dziewcząt i kobiet (88-98%). Uważa się także, że zespół Retta stanowi jedną z najczęstszych przyczyn NI u dziewczynek. RTT charakteryzuje się znacznym stopniem NI. Częstość występowania waha się między 1:15000-22000 urodzeń [26,62,105]. Charakterystyczna dla tego zespołu jest nasilona dyspraksja połączona ze specyficznymi ruchami stereotypowymi w obrębie kończyn górnych, chodzenie na palcach, kręcenie się w kółko, problemy ze snem oraz napady hiperwentylacji. W 1999 roku Huda Zoghbi i jej współpracownicy zlokalizowali gen przyczynowy zespołu Retta. Jest to gen *MECP2* zlokalizowany w chromosomie X (Xq28). W genie *MECP2* opisano około 50 różnych mutacji, powstających w większości przypadków *de novo* [7]. Białko kodowane przez *MECP2* reguluje proces transkrypcji. Dotychczas wyodrębniono kilka genów regulowanych przez *MECP2*, w tym badacze zwracają szczególną uwagę na *A2BPI*, *GAMT* oraz przede wszystkim *BDNF* [22,32]. U chłopców, mutacje powodujące zespół Retta są najczęściej letalne. Jednak niedawno pojawiła się publikacja opisująca żyjących chłopców z mutacjami charakterystycznymi dla zespołu Retta [28].

Innym przykładem zespołowej postaci NI jest zespół Coffina-Lowry'ego (CLS; ang. *Coffin-Lowry Syndrome*). Jest chorobą (semi-) dominującą sprzężoną z chromosomem X [90]. Częstość występowania zespołu szacuje się na 1:50000-100000 urodzeń [155]. U osób płci męskiej choroba przebiega pod postacią niepełnosprawności intelektualnej znacznego stopnia z charakterystycznym fenotypem twarzy i dłoni,

uogólnionym obniżeniem napięcia mięśniowego oraz ze zmianami w układzie kostno-stawowym. Dymorfia twarzy obejmuje wysunięte czoło, hiperteloryzm, opadające w dół szpary powiekowe, płaski grzbiet nosa i szerokie usta z pełnymi wargami. Inne cechy kliniczne to: niski wzrost (95%), deformacje klatki piersiowej (80%), kifoza i/lub skolioza (80%). U niektórych pacjentów obserwuje się obecność jedynie pojedynczych objawów lub niemal prawidłowego fenotypu, a u innych występowanie pełnoobjawowego zespołu [64]. Zespół Coffina-Lowry'ego spowodowany jest mutacją w genie *RSK2* (*RPS6KA3*) w locus Xp22.2-p22.1 kodującym białko sygnalizacyjne RSK2 (ang. *ribosomal S6 kinase 2*). Białko należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. Kinaza RSK2 fosforyluje białko CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) odgrywające istotną rolę w procesie uczenia się i zapamiętywania. Wykazano również, że RSK2 fosforyluje czynnik transkrypcyjny ATR4, który pełni funkcję w różnicowaniu osteoblastów, co tłumaczy wady kośćca. Nasilenie cech fenotypowych zależy od aktywności kinazy RSK2 - dowiedziono, że szczątkowa aktywność RSK2 (około 20%), wystarcza by uchronić przed głęboką formą NI i wadami kośćca [66].

Kolejnym znanym zespołem S-XLMR jest zespół Westa (ang. *West Syndrome*, EIEE1; ang. *early infantile epileptic encephalopathy-1*), który jest odmianą padaczki występującej u dzieci. Charakteryzuje się występowaniem napadów zgięciowych, opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego oraz obecnością hysarytmii w zapisie EEG. Napady zgięciowe mogą mieć charakter zgięcia do przodu lub wyprost, a opóźnienie rozwoju motorycznego i umysłowego występuje u około 80-85% dzieci z tym rozpoznaniem. Napady skłonów u 90% chorych pojawiają się w pierwszym roku życia, zwykle między 3. a 9. miesiącem życia. Podejrzewa się, że za część przypadków zespołu Westa może być odpowiedzialna mutacja w genie *ARX*. Gen ten należy do klasy genów homeotycznych, które kodują czynniki transkrypcyjne kierujące rozwojem podczas embriogenezy. Prawdopodobnie jest on zaangażowany w proliferację neuronalną i różnicowanie neuronów GABA-ergicznych [35]. Najczęściej identyfikowaną mutacją genu *ARX* jest duplikacja 24 pz w eksonie 2, która powoduje ekspansję traktu polialaninowego z 12 do 20 powtórzeń.

## **Niespecyficzna postać NI sprzężonej z chromosomem X (NS-XLMR, MRX; ang. *Nonsyndromic X-linked Mental Retardation*)**

W niespecyficznej postaci NI sprzężonej z chromosomem X jedynym objawem klinicznym jest niepełnosprawność intelektualna, a charakterystyczną cechą jest jej rodzinne występowanie [51]. Ocenia się, że występuje ona z częstością 0,9-1,4:1000 urodzeń. Badanie molekularnego podłoża niespecyficznej formy NI sprawia wiele trudności, ze względu na wysoki stopień heterogenności genetycznej oraz niepełną wiedzę na temat genów zaangażowanych w jej etiologię. Uważa się, że około 2/3 pacjentów z NI sprzężoną z chromosomem X prezentuje niespecyficzną formę tego schorzenia [128]. Obecnie zlokalizowano 66 genów w chromosomie X odpowiedzialnych za NS-XLMR, część z nich przedstawiono w tabeli 2. Jak już wspomniano, niektóre z nich (Tab.3.) są zaangażowane również w S-XLMR, co powoduje, że ściśle rozgraniczenie form zespołowych i niespecyficznych wyłącznie na podstawie podłoża molekularnego jest niemożliwe. Produkty genów, których mutacje prowadzą do NS-XLMR, w przeciwieństwie do białek S-XLMR, charakteryzują się wąskim spektrum oddziaływań komórkowych. Przede wszystkim są to procesy bezpośrednio lub pośrednio związane z przekazywaniem sygnałów komórkowych. Mutacje mogą powodować fenotyp NS-XLMR poprzez zmiany prowadzące np. do modyfikacji połączeń neuronalnych, co może mieć duży wpływ na kształtowanie intelektu. Przykładem tego mogą być geny *OPHN1*, *PAK3*, *ARHGEF6*, *FGD1* lub *TM4SF2*, biorące udział w formowaniu neuronów poprzez regulację kinaz Rho [123]. Innym przykładem mogą być geny *GDII* (regulator białek Rab3A) i *ILIRAPLI*, biorące udział w wydzielaniu i transporcie pęcherzyków zawierających neurotransmitery w obrębie błony synaptycznej, lub gen *ASCLA*, związany bezpośrednio z metabolizmem kwasów tłuszczowych, ale odgrywający istotną rolę podczas tworzenia połączeń synaptycznych [99]. Geny *DLG3* i *NLGN4*, których mutacje odpowiedzialne są za umiarkowaną i głęboką niepełnosprawność intelektualną, kodują białka związane z funkcjonowaniem receptora glutaminergicznego typu NMDA, uczestnicząc w kaskadzie przekazywania sygnałów. Osobną klasę genów zaangażowanych w patogenezę NS-XLMR stanowią regulatory transkrypcji, takie jak *FMR2*, *ARX*, *ZNF41* lub *JARID1C*. Gen *FMR2* był pierwszym poznanym genem NS-XLMR, który zidentyfikowano na zasadzie analogii do *FMRI*, po wykryciu obecności miejsca łamliwego. Podobnie jak w przypadku genu *FMRI* obserwuje się tu mechanizm hipermetylacji promotora i wyciszenie genu, czego efektem jest lekka NI u mężczyzn.

Tab.2. Wybrane geny odpowiedzialne za niespecyficzną postać NI (NS-XLMR) (za <http://xlmr.interfree.it>, zmienione)

<b>OMIM</b>	<b>Nazwa białka</b>	<b>Locus</b>	<b>Gen</b>
300034	Angiotensin rec. 2	Xq23	<i>AGTR2</i>
300096	Tetraspanin	Xq11.4	<i>TM4SF2</i>
300104	RABGDIA	Xq28	<i>GD11</i>
300142	P21 Act. Kinase 3	Xq23	<i>PAK3</i>
300157	Fatty acid-CoA ligase 4	Xq23	<i>FACL4 (ACSL4)</i>
300189	Disco large homolog 3	Xq13.1	<i>DLG3</i>
300206	IL1 receptor accessory protein	Xp21.1	<i>IL1RAPL</i>
300267	$\alpha$ PIX	Xq26.3	<i>ARHGEF6</i>
300286	Kruppel-like Factor 8	Xp11.21	<i>KLF8/ZNF741</i>
300336	Neuroigin 3	Xq13	<i>NLGN3</i>
300427	Neuroigin 4	Xp22.3	<i>NLGN4</i>
300499	FTSJ homolog 1	Xq11.23	<i>FTSJ1</i>
300573	zinc-finger 674	Xp11.3	<i>ZNF674</i>
300576	zinc-finger, DHHC-type containing 15	Xq13.3	<i>ZDHHC15</i>
300585	zinc-finger 673	Xp11.3	<i>ZNF673</i>
309548	AFF2 protein	Xq28	<i>FMR2</i>
312173	Ribosomal protein L10	Xp28	<i>RLP10</i>
314995	zinc-finger 41	Xp11.3	<i>ZNF41</i>
314998	zinc-finger 81	Xp11.23	<i>ZNF81</i>

Tab.3. Wybrane geny odpowiedzialne za zespołową (S-XLMR) i niespecyficzną postać NI (NS-XLMR) (za <http://xlmr.interfree.it>, zmienione)

<b>OMIM</b>	<b>Schorzenie</b>	<b>Locus</b>	<b>Gen</b>
300005	zespół Retta	Xq28	<i>MECP2</i>
300032	ATR-X	Xq13.2	<i>ATRX (XNP)</i>
300036	niedobór transportera kreatyniny	Xq28	<i>SLC6A8</i>
300075	zespół Coffina-Lowry'ego	Xp22.1	<i>RSK2 (RPS6KA3)</i>
300127	ataksja mózdkowa	Xq12	<i>OPHN1</i>
300382	zespół Westa/drgawki niemowlęce	Xp22.1	<i>ARX</i>
300463	zespół Sutherlanda i Haana/MRXS3	Xp11.23	<i>PQBP1</i>
300523	zespół Allana, Herndona i Dudleya	Xq13.2	<i>ALC16A2/MCT8</i>
300630	zespół Turnera	Xp22.2	<i>AP1S2</i>
305400	zespół Aarskoga i Scotta	Xp11.22	<i>FGD1</i>
314690	JARID1C-related XLMR	Xp11.22	<i>JARID1C/SMCX</i>

### 1.3.1.5 NI uwarunkowana autosomalnie

NI uwarunkowana autosomalnie stanowi dużą grupą chorób w przeważającej większości uwarunkowanych jednogenowo. W zależności od sposobu dziedziczenia, można je podzielić na zespoły dziedziczone w sposób autosomalny recesywny oraz autosomalny dominujący.

NI uwarunkowana autosomalnie dominująco cechuje się zmienną ekspresją, często niepełną penetracją genu, a także dość wysokim odsetkiem mutacji *de novo*, a mniejszym - dziedziczonym od rodziców. Ryzyko przekazania zmutowanego genu potomstwu wynosi 50%. Przykładami takich chorób są np.: nerwiakowłókniakowatość typu 1, stwardnienie guzowate oraz zespół Noonan.

**Nerwiakowłókniakowatość typu 1** (choroba von Recklinghausena, NF-1; ang. *neurofibromatosis type 1*) jest najczęstszą chorobą nerwowo-skrórną (fakomatozą). Występuje z częstością około 1:2500 żywych urodzeń [76]. Do charakterystycznych objawów skórnych zalicza się rozsiane na skórze tułowia i kończyn brunatne plamy w kolorze "kawy z mlekiem" (fr. *café-au-lait*), piegowate nakrapiania o średnicy 2-3 mm w okolicach pachowych i pachwinowych, a u niektórych pacjentów - guzki podskórne. Liczba i wielkość plam zależna jest w dużej mierze od wieku pacjenta. U ponad 90% dzieci chorych na NF-1 w wieku młodzieńczym stwierdza się brązowe guzki siatkówki o typie *hamartoma* (tzw. guzki Lisch). Padaczka występuje u 10-15% chorych. Około 1/3 chorych wykazuje zaburzenia psychospołeczne. NI znacznego i średniego stopnia dotyczy zazwyczaj mniej niż 1 % chorych. U 30-60% pacjentów występują niewielkie zaburzenia orientacji wzrokowo - przestrzennej, dysleksja, gorsza pamięć krótkoterminowa oraz gorsze wyniki testów werbalnych w badaniu IQ [16,50]. Nerwiakowłókniakowatość typu 1 spowodowana jest mutacją w genie *NF1* kodującym neurofibrominę 1. Neurofibromina 1 posiada domenę homologiczną z rodziną białek aktywujących GTP-azę, co warunkuje jej rolę jako regulatora aktywności onkogenu *p21ras* i syntezy niektórych czynników wzrostowych np. z rodziny NGF. Ponieważ gen *NF1* ma duże rozmiary (ponad 350 kb), dlatego w około połowie przypadków choroba jest wynikiem nowej mutacji [77].

**Stwardnienie guzowate** (TS; ang. *Tuberous Sclerosis*) znane również, jako choroba Bourneville'a - Pringle'a, jest drugim przykładem schorzenia dziedziczonego autosomalnie dominująco. Występuje z częstością 1:7000-10000 urodzeń [2]. Stwardnienie guzowate, należące również do fakomatoz, objawia się podobnie jak NF1 zmianami skórnymi w postaci odbarwionych plam czy piegów pojawiających się już w

pierwszych miesiącach życia. Objawy neurologiczne mogą być znacznie nasilone i obejmować napady padaczkowe, NI, zaburzenia mowy i koordynacji motorycznej. W mózgu stwierdza się wapniejące guzki oraz gwiazdziaki prowadzące niekiedy do wodogłowa. Niepełnosprawność intelektualna występuje w 50% przypadków. Dochodzi również do uszkodzenia siatkówki, nerwu wzrokowego, odbarwienia tęczówki, zaćmy i pogorszenia widzenia. Choroba spowodowana jest mutacjami w genach *TSC1* albo *TSC2*. Gen *TSC1* zlokalizowany jest w chromosomie 9 (9q34) i koduje hamartynę, zaś gen *TSC2* ma *locus* w chromosomie 16 i koduje tuberynę. Oba geny należą do tzw. genów supresji nowotworów (ang. *tumor suppressor genes*). Pomimo odmiennej lokalizacji chromosomowej mutacje obu powyższych genów powodują wystąpienie podobnych objawów chorobowych [37].

**Zespół Noonan** (NS; ang. *Noonan Syndrome*) charakteryzuje się niskorosłością, wadami rozwojowymi twarzoczaszki i serca, nieprawidłowościami hematologicznymi, wnetrostwem u chłopców i NI. Częstość występowania choroby szacuje się na 1:1000-2500 żywo urodzonych dzieci [110]. Najczęstszą przyczyną zespołu Noonan są mutacje w genie *PTPN11*. Mutacje genu *PTPN11* stwierdza się w około 29–60% przypadków choroby [86,108,149]. W kolejnych latach odkryto inne geny odpowiedzialne za występowanie zespołu Noonan – gen *KRAS* zlokalizowany w regionie 12p12.1 [133], gen *SOS1*, którego *locus* zmapowano na krótkim ramieniu (p22-p21) chromosomu 2 oraz *RAF1* [115,125,126,150]. Uważa się, że mutacje w genie *RAF1* występują w około 20%, a *KRAS* i *SOS1* w 10% przypadków zespołu Noonan. Białka kodowane przez geny *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1* i *RAF1* biorą udział w szlaku sygnałowym RAS-MAPK (ang. *RAS-Mitogen Activated Protein Kinase*) i odpowiadają za przenoszenie sygnałów do wnętrza komórki [53].

Dużą grupą chorób w przeważającej większości uwarunkowanych jednogennie i dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny są choroby metaboliczne. Najczęstszym objawem jest NI, ale także zaburzenie rozwoju ruchowego oraz somatycznego. Do najczęstszych przykładów tych chorób zalicza się fenyloketonurię, galaktozemię, homocystynurię, mukopolisacharydozy i wiele innych.

Klasycznym przykładem choroby autosomalnej recesywnej, powodującej powstanie głębokiej niepełnosprawności intelektualnej jest **fenyloketonuria** (PKU; ang. *Phenylketonuria*), po raz pierwszy opisana przez norweskiego lekarza Asbiorna Föllinga w 1934 roku. PKU polega na zaburzonej przemianie fenyloalaniny w tyrozynę. We krwi dziecka chorego na fenyloketonurię zaczyna gromadzić się fenyloalanina i produkty jej

metabolizmu. Na skutek tego, przy braku odpowiedniego leczenia po pewnym czasie może dojść do uszkodzenia mózgu. Mutacji ulega gen *PAH* (12q22-q24.1) kodujący hydroksylazę fenyloalaninową. W genie tym opisano około 300 mutacji punktowych. Częstość występowania PKU w populacji europejskiej wynosi 1:8000-12000 urodzeń. Ryzyko ponownego wystąpienia choroby u potomstwa pary rodziców będących nosicielami uszkodzonej jednej kopii genu wynosi 25% [36]. Objawami nieleczonej choroby są pogłębiające się zaburzenia neurologiczne z napadami padaczkowymi oraz znacznego stopnia upośledzenie rozwoju umysłowego i motorycznego. Poza tym mogą występować, zaburzenia chodu, postawy, hipotonia mięśniowa i zeszywnienie stawów [118]. W Polsce, tak jak w wielu krajach Europy, wykonywane są testy przesiewowe noworodków w kierunku fenyloketonurii, ułatwiające leczenie (dieta ubogofenyloalaninowa) oraz niwelujące późniejsze skutki choroby.

Drugim blokiem metabolicznym przebiegającym z NI jest **galaktozemia** (ang. *Galactosemia*). Częstość jej występowania ocenia się na 1:47000 urodzeń [145]. Osoby dotknięte galaktozemią nie mają aktywnego enzymu niezbędnego do przetworzenia galaktozy (galaktozo-1-fosforanourydylo-transferazy). Gen kodujący ten enzym - *GALT* znajduje się w *locus* 9p13. Dzieci dotknięte galaktozemią źle się rozwijają, po spożyciu mleka wymiotują i cierpią na biegunkę, często mają powiększoną wątrobę i chorują na żółtaczkę. Istnieje też możliwość występowania zaćmy wrodzonej, upośledzenia umysłowego i przedwczesnego zgonu wywołanego uszkodzeniem wątroby. Za łagodną formę galaktozemii odpowiada inny gen - *GALK1* odpowiedzialny za powstawanie galaktokinazy, znajdujący się w *locus* 17q24. Leczenie choroby polega na wczesnym wykluczeniu galaktozy z diety, co powoduje cofnięcie się wszystkich objawów z wyjątkiem opóźnienia rozwoju umysłowego, które jest nieodwracalne [25].

Innym przykładem jest **homocystynuria** (ang. *Homocystinuria*), której przyczyną jest nieprawidłowy metabolizm metioniny. Częstość występowania choroby na całym świecie szacuje się na 1:300000 urodzeń [2]. Homocystynuria charakteryzuje się podwyższonym poziomem homocysteiny w surowicy i w moczu. Najczęstsza jej postać jest spowodowana niedoborem i niską aktywnością enzymu syntazy  $\beta$ -cystationinowej, który katalizuje reakcję przekształcenia homocysteiny do cysteiny poprzez cystationinę. Enzym kodowany jest przez gen *CBS*. Homocystynuria jest chorobą wielonarządową, powodującą patologiczne zmiany w tkance łącznej, mięśniowej, ośrodkowym układzie nerwowym i narządzie wzroku.



## **1.4 Nowoczesne techniki cytogenetyki molekularnej w diagnostyce NI**

W etiologii NI ogromną rolę odgrywają opisane powyżej czynniki genetyczne, a wśród nich submikroskopowe aberracje chromosomów. Do niedawna ich identyfikacja nie była w pełni możliwa przy zastosowaniu klasycznych technik diagnostyki cytogenetycznej, takich jak rutynowe badanie kariotypu. Wraz z postępem i rozwojem technik cytogenetyki molekularnej, takich jak: fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH), MLPA (ang. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) oraz najnowsza technika porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (array-CGH; ang. *Comparative Genomic Hybridization*), a także SNP-array (ang. *Single Nucleotide Polymorphism Array*), stało się oczywiste, że submikroskopowe rearanżacje chromosomowe, takie jak mikrodelecje i mikroduplikacje, odgrywają ważną rolę w etiopatogenezie NI.

Klasyczne techniki cytogenetyczne polegają na analizie obrazu prążkowego chromosomów, uzyskiwanego dzięki zastosowaniu specjalnych technik barwienia. Każda para chromosomów ma specyficzny, charakterystyczny dla siebie, układ poprzecznych prążków, różniących się wielkością i intensywnością zabarwienia. Liczba uzyskanych prążków w standardowym badaniu kariotypu (zazwyczaj 450-550) wpływa na czułość badania i wielkość rozpoznawanych aberracji. W praktyce oznacza to, że najmniejsza zmiana wykryta tą metodą to około 5 Mb. Niekiedy, przy zastosowaniu technik o wysokiej rozdzielczości (HRT; ang. *High Resolution Techniques*), przy uzyskiwanej liczbie 550-850 prążków, można wykazać obecność aberracji o wielkości nawet 3 Mb.

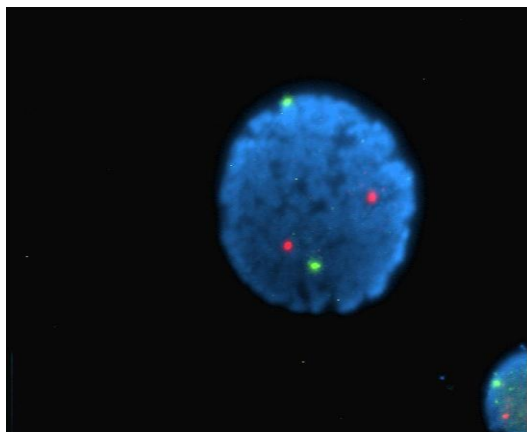
W latach 80. ubiegłego wieku, w związku z dynamicznym rozwojem i automatyzacją technik biologii molekularnej (technika PCR, klonowanie, sekwencjonowanie), powstała nowa gałąź genetyki – cytogenetyka molekularna. Wykorzystuje ona osiągnięcia biologii molekularnej, takie jak klonowanie i automatyczne powielanie sklonowanych fragmentów DNA metodą PCR. Uzyskane w ten sposób wybrane sekwencje DNA wykorzystywane są jako sondy molekularne, komplementarne do odpowiednich fragmentów DNA, co stanowi podstawę techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH; ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*), MLPA (ang. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*), a także porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH; ang. *Comparative Genomic Hybridization*). Zdecydowanie najszersze zastosowanie mają techniki array-CGH oraz SNP-array, umożliwiające analizę całego

genomu z praktycznie dowolną rozdzielczością. W tabeli 4 porównano rozdzielczość różnych technik cytogenetyczno-molekularnych stosowanych obecnie w diagnostyce NI.

Tab.4. Techniki cytogenetyczne i cytogenetyczno-molekularne stosowane w diagnostyce NI (za [146], zmienione)

<b>Technika</b>	<b>Rozdzielczość</b>
Analiza kariotypu (550 prążków)	$\geq 5$ Mb
Analiza kariotypu metodą HRT (800 prążków)	$\geq 3$ Mb
Metoda HR-CGH	$>3$ Mb
Metoda FISH	0,04-0,25 Mb
Metoda MLPA	$>0,04$ Mb
aCGH z sondami BAC	$>1$ Mb
aCGH z sondami oligonukleotydowymi	$>0,001$ Mb (śr. 3-100 kb)

Jedną z pierwszych technik cytogenetyki molekularnej, która w znacznym stopniu zwiększyła rozdzielczość wykrywanych aberracji, była fluorescencyjna hybrydyzacja in situ. FISH służy do wykrywania w badanym materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnie znakowanych sond DNA. Należy podkreślić, że niezbędnym warunkiem użycia sond hybrydujących do określonego fragmentu chromosomu jest uprzednie sformułowanie klinicznego podejrzenia obecności aberracji tego regionu. Badanie polega na usunięciu cytoplazmy i utrwaleniu jąder komórkowych na szkiełku podstawowym. Fluorescencyjna sonda jest наносzona na preparat i całość poddawana jest krótkotrwałej denaturacji w podwyższonej temperaturze, a następnie kilkugodzinnej hybrydyzacji. Kolejnym etapem jest usunięcie nadmiaru niezhybrydowanej sondy przez kilkukrotne odpłukanie preparatu i uwidocznienie jąder komórkowych barwnikiem specyficznym dla DNA (np. DAPI lub jodek propidyny). Tak przygotowany preparat można analizować pod mikroskopem fluorescencyjnym (Ryc.1.).

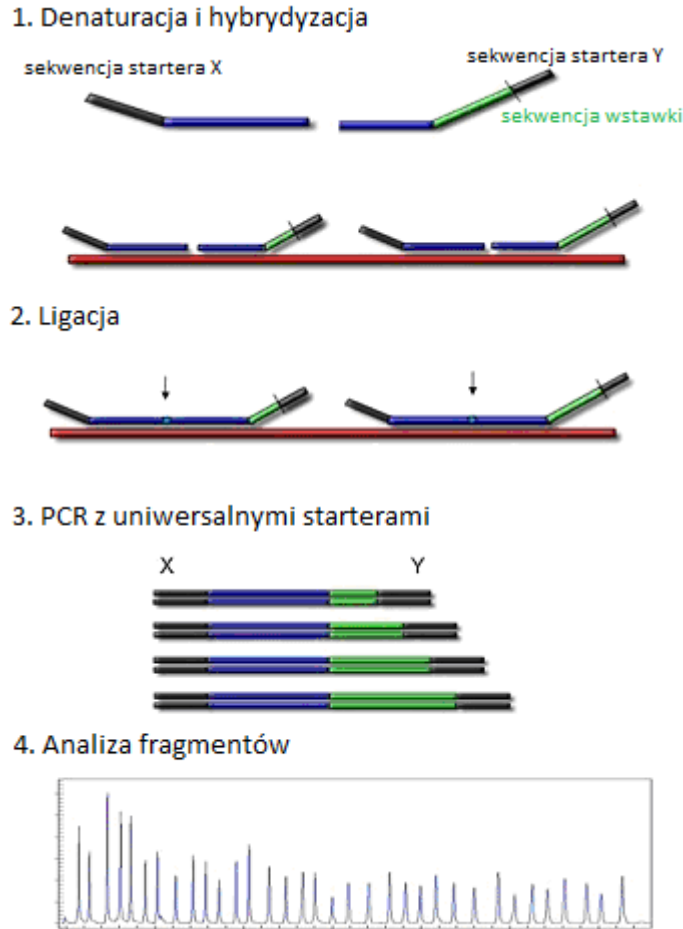


Ryc. 1. Interfazowe jądro limfocyty wybarwione DAPI z sygnałami fluorescencyjnymi z chromosomu 13 (zielony, sonda znakowana fluoresceiną) i 21 (czerwony, sonda znakowana rodaminą) (za [http://www.ask.com/wiki/Fluorescence\\_microscope](http://www.ask.com/wiki/Fluorescence_microscope))

W zależności od typu wykorzystanych sond, FISH znajduje zastosowanie w detekcji konkretnych mutacji, miejsc pęknięć chromosomów, czy dokładnej analizie translokacji. Możemy wyróżnić sondy: centromerowe, telomerowe, malujące, prążkowo specyficzne i specyficzne dla danych regionów chromosomów oraz specyficzne dla rDNA. Często, wielkość zmiany może być na tyle mała, że dopiero zastosowanie techniki FISH umożliwia jej wykrycie i postawienie odpowiedniego rozpoznania klinicznego. Metoda ta stosowana jest również w celu potwierdzenia zmiany wcześniej wykrytej innymi technikami. Podobnie jak w przypadku klasycznego kariotypu, liczba analizowanych komórek stanowi ważny element jakości badania FISH. Zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i diagnostycznego, istotne jest także wykorzystanie techniki FISH do określenia minimalnej wielkości tzw. regionu krytycznego, warunkującego określony zespół kliniczny. Umożliwia to zawężenie badanego regionu i wskazanie tzw. genów kandydujących, odpowiedzialnych za określone objawy kliniczne.

Rozwój technik diagnostycznych pozwolił na opracowanie alternatywnej metody badania delecji i duplikacji, a mianowicie techniki MLPA (ang. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*). Jest to metoda molekularna opracowana w 2002 roku przez firmę MRC/Holland, która jest oparta o ligację i amplifikację zhybrydowanych do DNA sond. Procedura zaczyna się od denaturacji genomowego DNA. Kolejnym krokiem jest hybrydacja matrycy z sondami, a następnie ligacja sond przy pomocy enzymu - ligazy. Drugim etapem jest reakcja PCR z użyciem wspólnych starterów (z których jeden jest znakowany fluorescencyjnie). Podczas PCR dochodzi do amplifikacji DNA sond, których fragmenty uległy ligacji. Ostatnim krokiem jest rozdział produktów na sekwenatorze kapilarnym. Cała procedura przedstawiona jest na rycinie 2 [71]. Istotną

modyfikacją techniki MLPA jest tzw. MS-MLPA (ang. *Methylation-Specific MLPA*) umożliwiający analizę stanu metylacji m.in. w regionie krytycznym zespołów Pradera-Willi'ego i Angelmana [71,112]. Niewątpliwą zaletą MLPA jest duża liczba analizowanych loci w pojedynczym badaniu. Liczba produktów takiej reakcji jest proporcjonalna do liczby badanych regionów DNA. Najszersze wykorzystanie metoda ta znalazła w diagnostyce submikroskopowych aberracji subtelomerowych stanowiąc alternatywę dla bardziej czaso- i pracochłonnej techniki FISH. Liczne pozycje piśmiennictwa wskazują na użyteczność i skuteczność metody MLPA w diagnostyce NI o nieznannej etiologii [83,114,127]. Udowodniono także skuteczność techniki MLPA w diagnostyce znanych zespołów mikrodelecji, takich jak zespół delecji 1p36, zespół Williamsa, DiGeorge'a, Sotosa lub Millera-Diekera poprzez porównanie metody z badaniem FISH i wykazanie pełnej zgodności obu technik [34]. Należy zaznaczyć, że technika MLPA umożliwia badanie w kierunku wielu zespołów genetycznie uwarunkowanych w ramach jednego testu diagnostycznego. Technika ta jest też znacznie tańsza od konkurencyjnej techniki FISH [71]. Liczba publikacji dotyczących techniki MLPA lub opisujących eksperymenty z wykorzystaniem tej metody stale rośnie, co potwierdza użyteczność oraz wiarygodność MLPA w diagnostyce NI oraz innych wad wrodzonych.

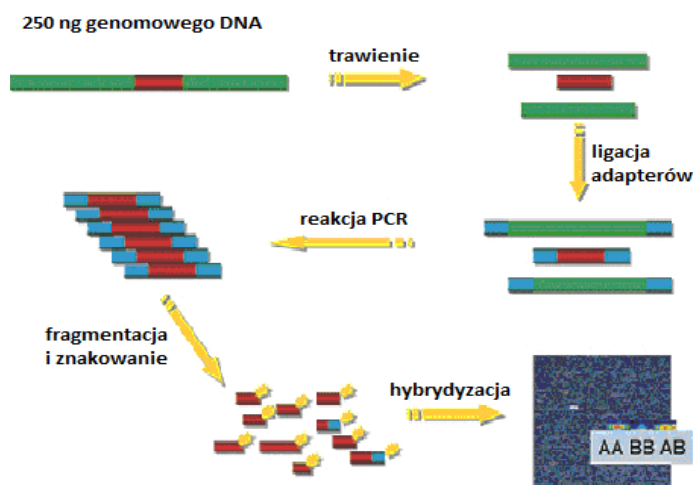


Ryc. 2. Procedura MLPA (za <http://www.mlpa.com>, zmienione)

Głównym ograniczeniem wynikającym z zastosowania techniki FISH oraz w mniejszym stopniu MLPA, jest konieczność wcześniejszego określenia konkretnego rozpoznania klinicznego. Tymczasem, zwłaszcza u noworodków lub niemowląt, jest to bardzo trudne ze względu na często mało charakterystyczny obraz kliniczny, niespecyficzne cechy fenotypowe, wspólne dla różnych zespołów genetycznych [91]. Problem ten został rozwiązany dzięki wprowadzeniu do diagnostyki innowacyjnej metody porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH; ang. *Comparative Genomic Hybridization*) oraz jej modyfikacji. Inaczej niż w badaniu FISH, badanie metodą CGH umożliwia identyfikację zmian w genomie bez uprzedniego podejrzenia obecności konkretnej zmiany. Dzięki tej metodzie możliwa jest ocena wszystkich chromosomów w jednym badaniu. Technika CGH polega na hybrydyzacji do prawidłowych chromosomów metafazowych dwóch genomów DNA, badanego i kontrolnego, wyznakowanych fluorescencyjnie i zmieszanych ze sobą [81]. W cytogenetyce klinicznej, technika CGH znalazła zastosowanie początkowo jako HR-CGH (ang. *High-Resolution CGH*).

Umożliwiło to badanie genomu z dokładnością do 3 Mb, co przyczyniło się do identyfikacji submikroskopowych rearanżacji chromosomowych u około 10% chorych z prawidłowym kariotypem oraz obecnością wad wrodzonych i NI o nieustalonej etiologii [111]. Dalszy rozwój technologii zaowocował wprowadzeniem klonów bakteryjnych (BAC; ang. *Bacterial Artificial Chromosome*) zamiast wcześniej stosowanych chromosomów metafazowych. Rozwiązanie to znacznie zwiększyło rozdzielczość badania, zależną od liczby zastosowanych klonów i odległości między nimi w genomie. Kluczowy wpływ na dalszy rozwój techniki CGH miało poznanie sekwencji genomu ludzkiego. Naukowcy zdawali sobie sprawę, że genom różni się między poszczególnymi ludźmi. Początkowo sądzili jednak, że w bardzo niewielkim stopniu. Kilka lat później, międzynarodowe badania dowiodły, że różnice te są znacznie większe. Do niedawna skupiano się jedynie na polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (SNP; ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). W trakcie kilkuletnich badań udało się jednak znaleźć ponad 1500 różnic dotyczących również dużych fragmentów DNA, które łącznie obejmują aż 12% genomu ludzkiego. Często polegają one na powieleniu całych genów lub ich fragmentów, a także na ich delecjach. Te duże różnice w DNA, określane są jako zjawisko zmienności liczby kopii (CNV; ang. *Copy Number Variations*). Przyjęto, że CNV są większe od 1 kb. Ocenia się, że CNV w większym stopniu niż zmiany pojedynczych nukleotydów mogą odgrywać rolę w patogenezie chorób [103]. Wraz z nowym odkryciem zastąpiono wcześniejsze sondy BAC sondami oligonukleotydowymi, co zwiększyło rozdzielczość oraz umożliwiło identyfikację wielu niestwierdzanych dotychczas nieprawidłowości, które mogą być odpowiedzialne za NI i inne wady wrodzone. W ten sposób zapoczątkowano technikę porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (array-CGH, aCGH). Metoda obejmuje hybrydyzację genomowego DNA pacjenta i kontroli (znakowanych dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi), do sond utrwalonych na specjalnych szkiełkach, zwanych mikromacierzami. Badania przeprowadzane z zastosowaniem metody aCGH umożliwiają jednoczesną identyfikację aneuploidii, duplikacji, delecji z rozdzielczością limitowaną wyłącznie liczbą oraz wielkością sond użytych do konstrukcji mikromacierzy. Technika aCGH jest wykorzystywana głównie w diagnostyce klinicznej chorych z niepełnosprawnością intelektualną, wadami rozwojowymi i dysmorfia. Należy podkreślić, że wraz ze wzrastającą rozdzielczością stosowanych mikromacierzy, zwiększa się odsetek chorych, u których stwierdzano obecność aberracji [129]. Podstawową wadą aCGH jest niemożność identyfikacji w badaniu translokacji zrównoważonych lub inwersji, czyli

takich aberracji chromosomowych, które nie wiążą się z utratą lub nadmiarem materiału genetycznego. W takiej sytuacji swoje zastosowanie znajduje technika SNP-array, której innowacyjnością, oprócz identyfikacji zmian pojedynczych nukleotydów, jest także możliwość wykrycia zrównoważonych translokacji chromosomowych. Dużym wyzwaniem jest interpretacja każdego nieprawidłowego wyniku badania metodą aCGH oraz SNP-array ze względu na występowanie ogromnej liczby sekwencji polimorficznych (CNV) w populacji ludzkiej. Wobec tego, zidentyfikowana zmiana może być zmianą niepatogenną w odniesieniu do obecnych u pacjenta objawów. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, gdy zmiana jest mała (poniżej 1 Mb) lub ta sama aberracja identyfikowana jest u niewykazującego objawów klinicznych członka rodziny lub jest zmianą „łagodną” stwierdzaną w populacji osób zdrowych (polimorfizm).

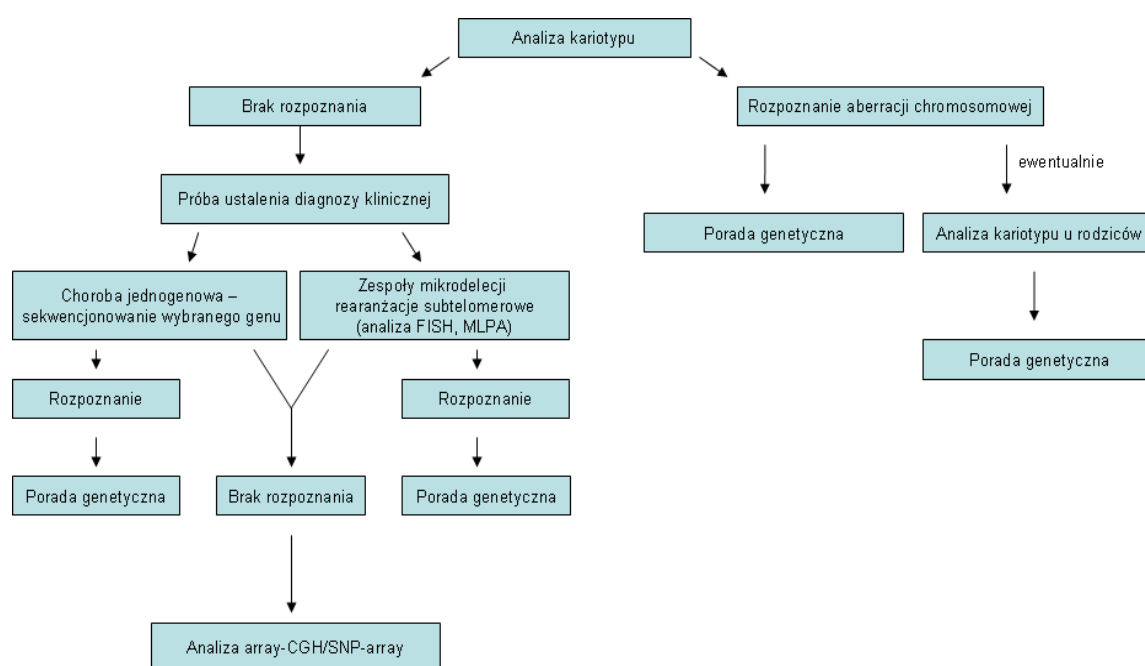


Ryc. 3. Procedura badania techniką mikromacierzy SNP-array (za <http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/site/genomicscore/section/1919>, zmienione)

### 1.5 Algorytm postępowania diagnostycznego u pacjentów z NI

NI często sprawia wiele problemów diagnostycznych w praktyce klinicznej. Zaproponowany algorytm postępowania diagnostycznego w przypadku stwierdzenia opóźnienia rozwoju psychomotorycznego może przyczynić się do lepszego usystematyzowania diagnostyki różnicowej oraz identyfikacji rodzin ryzyka genetycznego. Zarówno w izolowanej, jak i zespołowej postaci NI, kluczowym elementem badania chorego dziecka jest, poza wywiadem i analizą rodowodu, ocena rozwoju psychomotorycznego. Wynik tej oceny stanowi podstawę do wstępnego

zakwalifikowania chorego do dalszych badań diagnostycznych: dodatkowych badań obrazowych oraz biochemicznych, które umożliwiają wysunięcie wstępnego podejrzenia choroby o etiologii genetycznej lub środowiskowej. W przypadku podejrzenia genetycznie uwarunkowanej NI, algorytm postępowania diagnostycznego sugeruje w pierwszej kolejności wykonanie badania z wykorzystaniem klasycznych technik prążkowania chromosomów. W przypadku obecności cech klinicznych lub fenotypu odpowiadającego znanemu zespołowi mikrodelecji, należy w dalszej kolejności przeprowadzić badanie z zastosowaniem technik cytogenetyki molekularnej (FISH lub MLPA). W przypadku podejrzenia zespołu jednogenowego, stosuje się odpowiednie techniki biologii molekularnej (np. sekwencjonowanie wybranego genu). Prawidłowy wynik często nie wyklucza w sposób jednoznaczny podłoża genetycznego choroby, należy więc w następnej kolejności przeprowadzić badanie aCGH lub SNP-array, które umożliwią wykrywanie delecji subtelomerowych lub innych mikroaberracji z większą rozdzielczością. Diagnostyka metodą mikromacierzy sugerowana jest również w przypadku pacjentów z niejednoznacznym rozpoznaniem lub z dyskretnymi cechami dysmorfii. Proces diagnostyczny powinien być zawsze zakończony udzieleniem rodzinie chorego dziecka porady genetycznej. Algorytm postępowania w przypadku podejrzenia genetycznie uwarunkowanej NI przedstawiono na rycinie 4.



Ryc. 4. Algorytm postępowania u pacjentów z NI



## 2 Cele pracy

Niepełnosprawność intelektualna jest wynikiem złożonych procesów mających wpływ na funkcjonowanie układu nerwowego. Szacuje się, że 25–35% przypadków NI ma podłoże genetyczne. Określenie genetycznej etiologii NI ma ogromne znaczenie dla poradnictwa genetycznego pacjentów oraz ich rodzin. W związku z powyższym cele pracy obejmują:

1. Identyfikację submikroskopowych rearanżacji chromosomowych u pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną.
2. Poszukiwanie korelacji genotypowo-fenotypowych u pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną i wykrytymi submikroskopowymi rearanżacjami chromosomowymi.
3. Ustalenie użyteczności wybranych technik biologii molekularnej w diagnostyce przyczyn niepełnosprawności intelektualnej.

# 3 Pacjenci, metody i materiały

## 3.1 Charakterystyka grupy badanej

Łącznie analizowano 162 pacjentów z NI oraz innymi współistniejącymi wadami wrodzonymi (61 płci żeńskiej oraz 101 płci męskiej), w wieku 0-36 lat. W grupie pacjentów włączonych do badań, 96 osób było przypadkami sporadycznymi, natomiast w 66 przypadkach NI występowała rodzinnie. Grupę badaną stanowiły osoby z izolowaną (18) lub zespołową (66) formą NI, rekrutowane głównie spośród pacjentów NZOZ Centrum Genetyki Medycznej Genesis w Poznaniu, a także z innych ośrodków w Polsce. Pacjenci ci prezentowali różny stopień NI, od lekkiego do głębokiego (Tab.5.), który został określony przez neuropsychologów w oparciu o zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia. U niektórych pacjentów wykonano kilka różnych badań (np. analizę MLPA w kierunku znanych zespołów mikrodelecji lub rearanżacji regionów subtelomerowych, a następnie badanie aCGH/SNP-array). Do badań zakwalifikowano osoby, które świadomie wyraziły na nie zgodę, a w przypadku niemożności wyrażenia świadomej zgody na udział w badaniach przez pacjenta, zgoda na przeprowadzenie badań była podjęta przez jego prawnych opiekunów. Uzyskano również zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego na wykonanie badań. Głównym kryterium włączenia do badań była obecność izolowanej niepełnosprawności intelektualnej (sporadycznej oraz rodzinnej), jak również NI współwystępującej z wadami wrodzonymi i cechami dysmorfii.

Tab.5. Liczbowy rozkład pacjentów z różnymi stopniami NI

<b>Stopień NI</b>	<b>Liczba pacjentów</b>
lekki	74
umiarkowany	20
znaczny	17
głęboki	7
nieznany ze względu na zbyt niski wiek pacjentów (występuje opóźnienie rozwoju)	44

## **3.2 Metody badawcze**

### **3.2.1 Badania kliniczne**

Badaniom klinicznym, cytogenetycznym oraz molekularnym poddano łącznie 162 pacjentów. Wstępne badania kliniczne, pozwalające na dobór odpowiedniej diagnostyki obejmowały:

- wywiad rodzinny przeprowadzony przez lekarza genetyka (ze szczególnym uwzględnieniem wystąpienia w rodzinie NI lub innych wad wrodzonych),
- pokrewieństwo rodziców,
- przebieg ciąży z pacjentem (w tym ekspozycję na czynniki teratogenne, stosowanie leków oraz infekcje przebyte przez matkę w okresie ciąży),
- przebieg porodu,
- rozwój psychomotoryczny pacjenta,
- przegląd dotychczasowej dokumentacji medycznej pacjenta,
- badanie przedmiotowe pacjenta.

Analiza całości obrazu klinicznego pacjenta i wyników badań dodatkowych służyła ustaleniu rozpoznania i zaplanowaniu dalszej indywidualnej diagnostyki genetycznej, służącej do wykrycia przyczyny NI. W zależności od postawionego rozpoznania klinicznego, pacjentów kwalifikowano do odpowiednich badań genetycznych. U wszystkich pacjentów na początku wykonano przesiewowe badanie kariotypu.

### **3.2.2 Materiał biologiczny do badań**

Od pacjentów zakwalifikowanych do badań, zabezpieczono materiał biologiczny. Do analizy pobierano krew obwodową do probówki z antykoagulantem:

- 5-10 ml sterylnie pobrane na heparynę w celu analizy kariotypu,
- 5-10 ml pobrane na EDTA (z wyjątkiem noworodków i niemowląt, od których pobierano 1-2 ml) w celu izolacji DNA, stanowiącego wyjściowy materiał do badań molekularnych.

W przypadkach sporadycznych, jeśli istniała taka możliwość, krew była pobierana również od obojga rodziców pacjenta. Natomiast w przypadkach rodzinnych, krew pobierana była dodatkowo od wszystkich dostępnych krewnych pacjenta z NI, a także od obojga rodziców.

### **3.2.3 Badania kariotypu**

Pacjenci z prawidłowym wynikiem kariotypu lub zrównoważoną aberracją chromosomową, kwalifikowani byli do dalszych badań molekularnych, w celu znalezienia przyczyny NI. Dwie pacjentki, mimo obecności niezrównoważonych zmian w analizie kariotypu, zakwalifikowano do badań SNP-array. Takie postępowanie wynikało z konieczności bardziej szczegółowej analizy miejsc pęknięć w poszczególnych chromosomach, gdyż wynik kariotypu nie wskazywał na dokładny rodzaj i obszar zmiany.

### **3.2.4 Przygotowanie DNA do badań molekularnych**

#### **3.2.4.1 Izolacja genomowego DNA**

Izolację DNA przeprowadzano metodą detergentową z 1-10 ml krwi. W pierwszym etapie przeprowadzano wstępną lizę erytrocytów dodając do krwi 20 ml buforu do lizy. Całość mieszano przez odwracanie probówki. Mieszaninę wirowano w temperaturze 20°C, przez 10 minut przy prędkości 3600 rpm. Supernatant usuwano pozostawiając zawiesinę na dnie probówki. Osad leukocytów przemywano 3-krotnie 20 ml buforu 1xTKM, a następnie po każdym przemyciu wirowano przy prędkości 3400 rpm przez 10 minut. Osad zawieszano w 800 µl buforu 1x TKM, a następnie rozbijano, po czym dodawano 400 µl 10% roztworu SDS. Mieszaninę inkubowano 10 minut w temperaturze 60°C. Po inkubacji do mieszaniny dodawano 800 µl 5M roztworu NaCl i silnie wytrząsano. Całość wirowano w temperaturze 20°C, przez 30 minut przy prędkości 9500 rpm. Supernatant przenoszono do nowych probówek, a następnie dodawano 8 ml 96% etanolu i inkubowano przez 30 minut. Wytrącony DNA przenoszono do nowych probówek, a następnie 2-krotnie przemywano 1 ml 70% etanolu, każdorazowo wirując

całość w temperaturze 20°C, przez 10 minut przy prędkości 9200 rpm. Usuwano supernatant, a osady DNA suszono w 37°C, po czym rozpuszczano je w 500 µl buforu TE.

### 3.2.4.2 Ocena jakościowa i ilościowa DNA po izolacji

Wyizolowany DNA poddawano ocenie ilościowej oraz jakościowej poprzez pomiar jego stężenia oraz rozdział elektroforetyczny roztworu wysokocząsteczkowego DNA w obecności standardu wielkości (Lambda DNA/HindIII). Elektroforezę prowadzono w buforze 1xTAE, w 0,8% żelu agarozowym zawierającym bromek etydydy (1µg/ml), przy napięciu 60V, przez 2 godziny. Rozdział elektroforetyczny oceniano w świetle UV za pomocą systemu dokumentacji żeli *BioDoc-It™ Imaging System*. Stężenie rozpuszczonego DNA mierzono przy długości fali 260nm, 280nm oraz 320nm, przy pomocy urządzenia *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). Stosunek absorpcji A260/A280 pozwolił na określenie stopnia zanieczyszczenia roztworu DNA białkami.

### 3.2.5 Badania MLPA

Regiony genomowe, których zmiana liczby kopii związana jest z NI oraz towarzyszącymi wadami, badano za pomocą techniki MLPA. Reakcję MLPA wykonywano przy użyciu 3 zestawów sond komercyjnych firmy MRC-Holland:

- SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes – 1 (delecje/duplikacje obecne w następujących zespołach mikrodelecji: zespół delecji 1p36, delecja 2p16, delecja 3q29, delecja 9q22.3, zespół delecji 15q24, delecja 17q21, zespół Phelan-McDermida, zespół krzyku kota, zespół DiGeorge'a, zespół DiGeorge'a (region 2), zespół Langer-Giediona, zespół Millera-Diekera, Nerwiakowłókniakowatość typu I, zespół Pradera-Willi'ego/Angelmana, duplikacja MECP2/Xq28, zespół Rubinsteina-Taybi'ego, zespół Smitha-Magenisa, zespół Sotosa, zespół WAGR, zespół Williama, zespół Wolfa-Hirschhorna),
- SALSA MLPA P036 Human Telomere - 3 (delecje/duplikacje regionów subtelomerowych),
- SALSA MLPA P070 Human Telomere - 5 (delecje/duplikacje regionów subtelomerowych).

Reakcje MLPA wykonano według następującego protokołu:

#### 1. Denaturacja:

Przygotowywano 5 µl wodnego roztworu DNA pacjenta o stężeniu 50 ng/µl, a następnie podgrzewano do 98°C przez 8 minut, po czym schładzano próbki do 25°C przed otwarciem pokrywy termocyklera.

#### 2. Hybrydyzacja:

Do każdej próbki DNA dodawano mieszaninę składającą się z 1,5 µl buforu do hybrydyzacji oraz 1,5 µl sond. Całość podgrzewano do 95°C przez 1 minutę, po czym inkubowano w 60°C przez 16 godzin.

#### 3. Ligacja

Do każdej próbki dodawano 32 µl mixu L65 (3 µl buforu A + 3 µl buforu B + 25 µl wody + 1 µl ligazy 65), następnie inkubowano 15 minut w 54°C, po czym ogrzewano w 98°C przez 5 minut.

#### 4. Amplifikacja

10 µl mieszaniny ligacyjnej przenoszono do nowych probówek i dodawano 4 µl buforu oraz 26 µl wody, a następnie inkubowano 2-3 minuty w 60°C. Do inkubowanych w 60°C próbek dodawano 10 µl mieszaniny do reakcji PCR (2 µl starterów + 2 µl buforu rozpuszczającego + 5,5 µl wody + 0,5 µl polimerazy DNA). Reakcję PCR przeprowadzano według programu:

95°C	30s	
60°C	30s	x 35 cykli
72°C	60s	
72°C	20min.	
4°C	∞	

Rozdział produktów przeprowadzano na sekwenatorze *3730 DNA Analyzer* firmy Applied Biosystems. Wyniki analizowano przy użyciu programu *Peak Scanner™ Software* firmy Applied Biosystems.

### **3.2.6 Badania metodą SNP-array oraz aCGH**

Badania metodą SNP-array oraz aCGH wykonywano zgodnie z protokołem producentów. Należy jednak zaznaczyć, iż dokładny skład niektórych odczynników nie jest podany w tej pracy, gdyż stanowi tajemnicę handlową producenta.

### 3.2.6.1 Badania metodą SNP-array

Badania SNP-array wykonywano na platformach Illumina (*HumanCytoSNP-12 BeadChip*, 300k) oraz Affymetrix (*Genome-Wide Human SNP Array 6.0*, 1M). Osobne procedury badania dla obu typów SNP-array przedstawiono poniżej.

#### *HumanCytoSNP-12 BeadChip* (Illumina)

##### 1. Amplifikacja DNA

Przygotowywano 4  $\mu$ l DNA pacjenta (o stężeniu 50 ng/ $\mu$ l), następnie dodawano 20  $\mu$ l odczynnika MA1 oraz 4  $\mu$ l 0,1 M NaOH. Całość wytrząsano przy 1600 rpm przez 1 minutę i wirowano przez 1 minutę przy prędkości 280 x g, a następnie inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Dodawano 34  $\mu$ l odczynnika MA2 oraz 38  $\mu$ l odczynnika MSM, wirowano, a potem wytrząsano jak wyżej. Próbki inkubowano przez 20-24 godzin w temperaturze 37°C.

##### 2. Fragmentacja DNA

Do próbek dodawano 25  $\mu$ l odczynnika FMS, wytrząsano przez 1 minutę przy 1600 rpm, po czym wirowano w temperaturze 22°C przez 1 minutę przy prędkości 50 x g. Całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę.

##### 3. Precypitacja

Do próbek dodawano 50  $\mu$ l odczynnika PM1, wytrząsano przy 1600 rpm przez 1 minutę i inkubowano całość przez 5 minut w temperaturze 37°C, potem wirowano w temperaturze 22°C przez 1 minutę przy prędkości 50 x g. Dodawano 155  $\mu$ l 100% 2-propanolu i dokładnie mieszano zawartość próbki, a następnie inkubowano w temperaturze 4°C przez 30 minut. Po tym czasie, próbki wirowano w temperaturze 4°C przez 20 minut przy prędkości 3000 x g. Zlewano supernatant, a osady DNA suszono. Osady zawieszano w 23  $\mu$ l odczynnika RA1, a potem inkubowano w temperaturze 48°C przez 1 godzinę. Próbki wytrząsano przez 1 minutę przy 1800 rpm, po czym krótko wirowano przy prędkości 280 x g.

##### 4. Hybrydyzacja

Próbki denaturowano w 95°C przez 20 minut, a następnie krótko wirowano przy 280 rpm. Nakładano 15  $\mu$ l próbki na szkiełko mikromacierzowe i umieszczano je w komorze hybrydyzacyjnej. Inkubacja była prowadzona w temperaturze 48°C przez 16 godzin.

##### 5. Płukanie

Po hybrydyzacji, szkiełko mikromacierzowe płukano w 150 ml buforu PB1 przez 1 minutę.

## 6. Znakowanie

Podgrzewano 150 ml buforu PB1, w którym było szkiełko mikromacierzowe, do 44°C, a następnie dodawano do niego odczynniki w następującej kolejności:

- 150 µl RA1 i inkubowano przez 30 sekund (powtarzano 5 razy)
- 450 µl XC1 i inkubowano przez 10 minut
- 450 µl XC2 i inkubowano przez 10 minut
- 200 µl TEM i inkubowano przez 15 minut
- 450 µl 95% formamidu/1mM EDTA i inkubowano przez 1 minutę (powtarzano 2 razy)
- 450 µl XC3 i inkubowano przez 1 minutę.

Szkiełko mikromacierzowe wkładano do naczynia zawierającego 310 ml buforu PB1, a następnie krótko wytrząsano i inkubowano przez 5 minut. Po tym czasie mikromacierz przenoszono do naczynia zawierającego 310 ml odczynnika XC4, a potem krótko wytrząsano i inkubowano przez 5 minut. Szkiełko suszono w eksykatorze próżniowym przez 50 minut.

## 7. Skanowanie

Mikromacierz skanowano przy użyciu skanera *iScan*.

## 8. Analiza danych

Uzyskane wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania *GenomeStudio*, jak również z wykorzystaniem internetowych baz danych opartych na wersji HG18 (*Database of Genomic Variants, Decipher, Ensemble Genome Browser, UCSC Genome Browser*).

## ***Genome-Wide Human SNP Array 6.0*** (Affymetrix)

### 1. Trawienie DNA

Przygotowywano roztwór wodny DNA pacjenta o stężeniu 50 ng/µl. Następnie przeprowadzano dwie oddzielne reakcje trawienia z enzymami restrykcyjnymi Sty I i Nsp I. Do każdej reakcji pobierano 5 µl DNA (w sumie 250 ng) i dodawano 14,75 µl Digestion Master Mix o następującym składzie:

#### Sty I Digestion Master Mix:

NE Buffer 3 (10x): 2 µl  
BSA (100x; 10 mg/ml): 0,2 µl  
Sty I (10 U/µl): 1 µl  
woda: 11,55 µl

#### Nsp I Digestion Master Mix:

NE Buffer 2 (10x): 2 µl  
BSA (100x; 10 mg/ml): 0,2 µl  
Nsp I (10 U/µl): 1 µl  
woda: 11,55 µl

Całość krótko wytrząsano i wirowano przy prędkości 2000 rpm przez 30 sekund.



Mieszankiny trawiono według następującego programu:

37°C	120 min.
65°C	20 min.
4°C	∞

Po fragmentacji próbki wirowano przy prędkości 2000 rpm przez 30 sekund.

## 2. Ligacja

Do każdej mieszaniny dodawano 5,25 µl Ligation Master Mix o następującym składzie:

### Sty I Ligation Master Mix:

T4 Ligase Buffer (10x): 2,5 µl  
Adaptor Sty I (50 µM): 0,75 µl  
T4 DNA Ligase (400U/µl): 2 µl

### Nsp I Ligation Master Mix:

T4 Ligase Buffer (10x): 2,5 µl  
Adaptor Nsp I (50 µM): 0,75 µl  
T4 DNA Ligase (400U/µl): 2 µl

Próbki krótko wytrząsano i wirowano przy prędkości 2000 rpm przez 30 sekund. Ligację prowadzono zgodnie z następującym programem:

16°C	180 min.
70°C	20 min.
4°C	∞

Po ligacji, mieszaniny wirowano przy prędkości 2000 rpm przez 30 sekund, a następnie dodawano do nich 75 µl wody.

## 3. Amplifikacja

W celu amplifikacji przygotowywano mieszaninę o następującym składzie:

- mieszanina ligacyjna: 10 µl
- woda: 39,5 µl
- TITANIUM *Taq* PCR Buffer (10x): 10 µl
- GC-Melt (5 M): 20 µl
- dNTP (2,5 mM): 14 µl
- PCR Primer 002 (100 µM): 4.5 µl
- TITANIUM *Taq* DNA Polymerase (50x): 2 µl

Próbki krótko wytrząsano i wirowano przy prędkości 2000 rpm przez 30 sekund. Reakcję PCR przeprowadzano według programu:

<u>94°C</u>	<u>3min.</u>	
94°C	30s	
60°C	45s	x 30 cykli
<u>68°C</u>	<u>15s</u>	
68°C	7min.	
4°C	∞	

Po amplifikacji, pobierano 3 µl produktu PCR oraz 3 µl buforu obciążającego i przeprowadzano elektroforezę w 2% żelu agarozowym celem sprawdzenia efektywności trawienia.

#### 4. Oczyszczanie

Po amplifikacji, przygotowywano mieszaninę o następującym składzie:

- produkt reakcji PCR (Sty I): 100  $\mu$ l
- produkt reakcji PCR (Nsp I): 100  $\mu$ l

Dodawano 1 ml cząsteczek magnetycznych, mieszano, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Całość przenoszono na filtry *Millipore*, po czym włączano próżnię (20-24 Hg), tak długo, aż ciecz przeszła przez filtr. Na filtr nakładano 900  $\mu$ l 75% etanolu, a potem włączano próżnię (20-24 Hg) przez 1-2 minuty. Dodawano kolejne 900  $\mu$ l 75% etanolu i włączano próżnię (20-24 Hg) przez 10-15 minut. Cząsteczki magnetyczne ze związanym DNA rozpuszczano w 55  $\mu$ l buforu EB, a następnie włączano próżnię (20-24 Hg) przez 5-15 minut. Eluat oczyszczonego DNA (ok. 45  $\mu$ l) zbierano do nowych próbek, po czym pobierano 2  $\mu$ l każdej próbki w celu pomiaru stężenia DNA.

#### 5. Fragmentacja

Do każdej próbki dodawano 5  $\mu$ l Fragmentation Buffer, a następnie 5  $\mu$ l Fragmentation Reagent (0,1 U/ $\mu$ l). Mieszaninę inkubowano zgodnie z następującym programem:

37°C	35 min.
95°C	15 min.
4°C	$\infty$

Sprawdzano 1,5  $\mu$ l produktu fragmentacji dodając do niego 4  $\mu$ l buforu obciążającego i przeprowadzając elektroforezę w 4% żelu agarozowym.

#### 6. Znakowanie

Do każdej próbki dodawano 19,5  $\mu$ l Labeling Master Mix o następującym składzie:

- TdT Buffer (5x): 14  $\mu$ l
- DNA Labeling Reagent (30 mM): 2  $\mu$ l
- TdT enzyme (30 U/ $\mu$ l): 3,5  $\mu$ l

Próbki krótko wytrząsano i wirowano przy prędkości 2000 rpm przez 30 sekund, a następnie inkubowano zgodnie z poniższym programem:

37°C	4 godz.
95°C	15 min.
4°C	$\infty$

#### 7. Hybrydyzacja

Do każdej próbki dodawano 190  $\mu$ l Hybridization Master Mix i inkubowano zgodnie z programem:

95°C	10 min.
49°C	$\infty$

Nakładano 200 µl zdenaturowanych próbek na płytkę mikromacierzową i hybrydyzowano w 50°C przez 16-18 godzin.

### 8. Płukanie

Po hybrydyzacji mikromacierz płukano według następującej kolejności:

- 6 cykli płukań (5 wytrząsań/cykl) w buforze A, w temperaturze 25°C,
- 24 cykle płukań (5 wytrząsań/cykl) w buforze B, w temperaturze 45°C,
- inkubowano w buforze SAPE przez 10 minut, w temperaturze 25°C,
- 6 cykli płukań (5 wytrząsań/cykl) w buforze A, w temperaturze 25°C,
- inkubowano w Antibody Stain Solution przez 10 minut, w temperaturze 25°C,
- inkubowano w buforze SAPE przez 10 minut, w temperaturze 25°C,
- 10 cykli płukań (6 wytrząsań/cykl) w buforze A, w temperaturze 30°C,
- inkubowano w Array Holding Buffer (25°C) do momentu skanowania.

### 9. Skanowanie

Mikromacierz skanowano przy użyciu skanera *GeneChip Scanner 3000 7G*.

### 10. Analiza danych

Dane otrzymane podczas skanowania mikromacierzy były przetwarzane przy pomocy oprogramowania *Genotyping Console*. Oprogramowanie to pozwoliło wygenerować pliki zawierające informacje o sile sygnału pochodzącego od każdej z sond w oparciu o obrazy otrzymane ze skanera. Dane analizowano również w oparciu o internetowe bazy danych oparte na wersji HG19 (*Database of Genomic Variants, Decipher, Ensemble Genome Browser, UCSC Genome Browser*).

## **3.2.6.2 Badania metodą aCGH**

Badania porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy wykonywano na platformie NimbleGen przy użyciu 135 tysięcy sond oligonukleotydowych (135k). Analizy przeprowadzono na skanerze *MS 200 Microarray Scanner* firmy Roche.

Badanie aCGH wykonywano zgodnie z poniższym protokołem:

### 1. Znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi

Przygotowywano 2 mieszaniny składające się z:

- 40 µl wodnego roztworu DNA pacjenta o końcowym stężeniu 1µg oraz 40 µl barwnika Cy3.
- 40 µl wodnego roztworu DNA kontrolnego o końcowym stężeniu 1µg oraz 40 µl barwnika Cy5.

Całość poddawano denaturacji w 98°C przez 10 minut, po czym do każdej próbki dodawano 20 µl dNTP/Klenow Master Mix (10 µl 10mM dNTP mix + 8 µl wody + 2 µl polimerazy Klenowa) i inkubowano w 37°C przez 2 godziny. W celu zatrzymania aktywności polimerazy do wszystkich próbek dodawano 10 µl STOP Solution (0,5 M EDTA), a następnie 11,5 µl 5 M NaCl.

## 2. Precypitacja znakowanego DNA

Do próbek dodawano 110 µl 100% 2-propanolu, krótko wytrząsano, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Całość wirowano przez 10 minut przy prędkości 12000 x g. Po wirowaniu usuwano supernatant, a osady przemywano 500 µl 80% zimnego etanolu i wirowano przez 2 minuty przy prędkości 12000 x g. Usuwano supernatant, a osady DNA suszono i rozpuszczano w 25 µl wody. Następnie mierzono stężenie każdej wyznakowanej próbki DNA (*NanoDrop 2000*, Thermo Scientific), po czym mieszano ze sobą 20 µg wyznakowanego DNA badanego oraz 20 µg DNA kontrolnego. W dalszym etapie z każdej próbki odparowywano supernatant, a osady DNA rozpuszczano w 3,3 µl buforu Sample Tracking Control.

## 3. Hybrydyzacja

Do 3,3 µl DNA rozpuszczonego w Sample Tracking Control dodawano 8,7 µl Hybridization Solution Master Mix (5 µl 2 x Hybridization Buffer + 2,9 µl Hybridization Component A + 0,8 µl Alignment Oligo). Próbkę inkubowano w 95°C przez 5 minut, a następnie nakładano na umieszczone w stacji hybrydyzacyjnej szkiełko mikromacierzowe i inkubowano w 42°C przez co najmniej 16 godzin.

## 4. Płukanie

Po hybrydyzacji, szkiełko mikromacierzowe płukano kolejno w buforach: I – o temperaturze 42°C (wytrząsano szkiełko przez 2 minuty), II – o temperaturze pokojowej (wytrząsano szkiełko przez 1 minutę), III – o temperaturze pokojowej (wytrząsano szkiełko przez 15 sekund). Składy buforów do płukania podano poniżej:

Bufor I:	woda: 225 ml 10 x Wash Buffet I: 25 ml 1M DTT: 25 µl
Bufor II:	woda: 225 ml 10 x Wash Buffet II: 25 ml 1M DTT: 25 µl
Bufor III:	woda: 225 ml 10 x Wash Buffet III: 25 ml 1M DTT: 25 µl

W celu wysuszenia szkiełka mikromacierzowego, wirowano je przez 1 minutę przy prędkości 900 rpm, w wirówce *Microarray High Speed Centrifuge*.

### 5. Skanowanie

Mikromacierz umieszczano w skanerze *MS 200 Microarray Scanner* i dokonywano pomiaru fluorescencji przy długości fali 532 nm (DNA znakowane Cy3) i 635 nm (DNA znakowane Cy5) oraz rozdzielczości 2  $\mu\text{m}$ .

### 6. Analiza danych

Wstępną analizę parametrów technicznych oraz jakości badania przeprowadzano przy użyciu programu *NimbleScan Software*. Szczegółowa ocena każdego chromosomu odbywała się przy pomocy programu *Genoglyphix Software*, za pomocą którego dokonano graficznej prezentacji wykrytych zmian. Dokładna lokalizacja zmian podawana była według koordynatu HG18.

## **3.2.7 Badania liczby kopii regionu genomowego metodą qPCR**

Wykryte zmiany w badaniu SNP-array i aCGH u pacjentów oraz nosicielstwo tych zmian u rodziców, były potwierdzane metodą ilościowego PCR (qPCR; ang. *quantitative PCR*).

Badania qPCR wykonywano na urządzeniu *LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System* firmy Roche na płytkach 96-dołkowych.

W obrębie każdej weryfikowanej zmiany zaprojektowano 3 pary specyficznych starterów, za pomocą programu *Primer 3*.

Skład mieszaniny reakcyjnej podano poniżej:

- AmpliQ SYBR GREEN KIT (2x): 5  $\mu\text{l}$
- premix starterów (stężenie końcowe startera F + R = 5 pmol/ $\mu\text{l}$ ): 1  $\mu\text{l}$
- woda: 3  $\mu\text{l}$
- matryca DNA (rozcieńczona do stężenia 50 ng/ $\mu\text{l}$ ): 1  $\mu\text{l}$

Reakcję qPCR przeprowadzano według programu:

<u>95°C</u>	<u>3min.</u>	
95°C	30s	
60°C	30s	x 40 cykli
<u>72°C</u>	<u>60s</u>	
68°C	7min.	
4°C	$\infty$	

Każdą reakcję qPCR przeprowadzano w trzykrotnym powtórzeniu. Do kalibracji ilości kopii używano DNA kontrolnego, w którym wykluczono, w badaniu SNP-array i aCGH, obecność zmian. Kontrolę wewnętrzną stanowiły dwa geny referencyjne: albuminy (*ALB*) i czynnika VIII krzepnięcia krwi (*F8*). Pierwszy gen stanowił kontrolę w postaci dwóch kopii badanego regionu, natomiast *F8* (zlokalizowany w chromosomie X) był zależny od płci badanego pacjenta. W przypadku płci męskiej, stanowił punkt odniesienia równoznaczny z jedną kopią badanego regionu, a u płci żeńskiej występował w dwóch kopiach. Do obliczenia względnej liczby kopii badanego regionu zastosowano metodę  $\Delta\Delta C_t$ .

Tab.6. Sekwencje starterów użytych do oceny liczby kopii badanych regionów wykonywanych metodą qPCR

Nazwa startera	Sekwencja startera	Region chromosomowy	Rodzaj zmiany
1F	GGAATGCAGCTCTGAAGGTC	11q13.1	delecja
1R	GTGGAAATTGCACCCCTAGA		
2F	TGGGCCTTTACAAAGGTGAG		
2R	GATTCACCAAAGCTGGTGT		
3F	CGATCTCCTCACCCAGTGAT		
3R	ATGGGTCTGGCAGAGAGAGA		
4F	CCCACAAGCACACTCACT	11q13.3-q13.4	duplikacja
4R	CATGTGCCCTCCAGCTTAT		
5F	ACACTTCTGCCTGGCTGACT		
5R	GAGGTTCCAAGCTGGTGGTA		
6F	GCCCAACCTGTGGTTTCTTA		
6R	GAGATCTGCAGAAGGGCTTG		
7F	CCCGCTACTTCCTTCCCTAC	15q11.2	duplikacja
7R	GGATGTGCTCACCACAGCTA		
8F	CCTCCAGTCCCCAAATAGT		
8R	TACAACGAGTGTGCCTGCTC		
9F	AGTTGGGGTGTGGCTACAG		
9R	CATAGCTGTGGGCTGAATGA		
10F	CCCATCTCCAGCAACCTAAA	Xq21.1	delecja
10R	CAATCTCCCCTAAACGGTGA		
11F	GAAGTTCAAGGCCATCCTGA		
11R	GACCTACTGGGGTCAAGCAA		
12F	GAACTAGGAGGGGGTCTTGG		
12R	CTTCTCGGGCTATCACAAAGG		
13F	ACACTCACACCACACCCTCA	22q11.21	delecja
13R	GCTGTCTCCCTGCTGTAAG		
14F	GAGCTCAAGAGCACCTGGAC		
14R	GGGTGTCTGGATTGCAGAGT		
15F	ACTACTGATCCGCACACG		
15R	GCGAAATAGGCGCAAACCTAC		
16F	TTCCCTAAGAAGGCTGGTG	1q43-1q44	delecja
16R	GCCAACCAGACCAAGTGAAT		
17F	CAGTTCCCATCCAGACACCT		
17R	AGCTCCATGCTGTCTCCAAT		
18F	AGCTGGGCCTAGTCTGTCAA		
18R	AGGGGCTCTCAGAAGGAATC		
19F	CTTGGCCAGTGATTCCATCT	5q31.2	duplikacja
19R	CCCTAACCCAGATGGGTGAGA		
20F	CGCCCAAGTTTCTAGAGTGC		
20R	GAAGTGGGTTGCTTGAGAGC		
21F	AACCTCACGCTGTAGCCAGT		
21R	GGAGCAGGGGAAAACATACA		
22F	TTGCTAAGGGAACGGAACAC	22q11.21	duplikacja
22R	TGGAGGCCACGTGTACATAA		
23F	TAAGGGAGCTCCAAGGAACA		
23R	ACAATGAGGGTGGCTACCAG		
24F	TGCTCAACTGACAGGCAGAG		
24R			

24R	TTTGGGAGTTCACCCAGAAG		
25F	CGTGGTGGATAAGGTTTTGG	15q11.2	delecja
25R	GCAGTATGGCCATTCAACCT		
26F	GAACCTTACAGACGGGGACA		
26R	GCAGATGACCTTAGCCTTGC		
27F	CCTTACCAAACAAGGAAGC		
27R	GGGAACCTGGAGCACAACAT		
28F	CCCCAAAATTCTACTCCATTG	16p11.2	delecja
28R	CCAAGTCTCCTTTGCTTTGC		
29F	TGTTGCAGTGAACGAAACAGA		
29R	GACCCAAGGCTCATGTCTTF		
30F	GCTAGAAAGGGAAGGGTAGGG		
30R	CAAATCGGGCAATTAACAT		
31F	CCCTGCACAACAACCAGTTA	22q11.21	duplikacja
31R	TGATCATGTCAGCCTTTCAA		
32F	GGGCTAATTTGGGGGATAAG		
32R	CCCAAGGAACAGGGACTACA		
33F	AGCCAGTAAGTGGTGAAAGCA		
33R	AGCTGGGTCACCTTCCTCTT		
34F	TTTGAGACAAGGGGACACTG	2q37.3	delecja
34R	AGGCCAAGCTGAAATGTGTC		
35F	AGGAAGACACTGAGGCACGA		
35R	GTGCTAGGGGTATGGCAGAG		
36F	TCAAACCTTTGCTTCTGAGC		
36R	TGGCCTCTGGTGTCTCTTTT		
37F	CCAGATTCTGCTTTTTGCAT	10p15.3-10p15.1	duplikacja
37R	AGATAAACCCGTGTGCCTGA		
38F	CCCAAGGACAAAAGATCGAA		
38R	AACTGTGGGCTGGTTAATGG		
39F	TCTCAACAAAAGACCAGCCCTA		
39R	TTTTGAAAACACACCGTACA		
40F	TGCTTCTATGTGGCAGAGAC	9p24.3-9p22.2	delecja
40R	ACTGAGATGGCAGCATGGTA		
41F	TGGAGGAGGGGAACTCTTA		
41R	TCCATTGATGGACATTTCTGTT		
42F	CATCGGAGCAGGCACTATTA		
42R	CTGACTTTTCAAAAAGCATTCA		
43F	TGAGCTTAAAGGGATAGTGGTG	9p22.2-9p12	duplikacja
43R	CTTTGGAGTTCCTGCTCTG		
44F	GAGAGTTGCTTTCAAGTCTTTGTC		
44R	GAAGCTGGATGGTGGTGATT		
45F	AATCAACAGAAAGGCAATGAAA		
45R	AACATTGGTTGAAAAGTACTCAAAAA		
46F	GACTGCAGCAATGCAGAGAG	22q13.33	delecja
46R	CCGTGTATCCCCATCTGAC		
47F	TAGAAGATCCCCAAGCAAGG		
47R	TGAGGTGTGTCTGGGTC		
48F	CAATGGGCACAAAGTCACAG		
48R	TGGGGTACAGGGAGATGTTT		
49F	TCCCGGAGGTCTACCTATT	15q26.3	duplikacja
49R	TGTTAACAGGGCCAGGAAAG		
50F	CTCACAGCCTGGTCCTTCTC		
50R	TCCCATCCCTCTTCTCTT		
51F	TTGATCCTGCCTTTGTTCC		
51R	TCTCCTCGGCAGTGATTCTC		
52F	GGGCAAAGGCCTATCATAACA	1q21.1	delecja
52R	CTCTGCAAAAAGCAGGAACC		
53F	AGCCTCCTGTGGGAATTCTT		
53R	TGAGCTCCATTTTCCCAAC		
54F	CTGGTCCATTGCTGAACTT		
54R	AGCCAGAAAGGACCACAGAA		
55F	AGGCTCCAGAACCAACTTGA	9q34.11-9q34.13	delecja
55R	TTTGGCAGAGATGAGTGTGC		
56F	CCTGGGAGAAAGTCCAATGA		
56R	AACGGATCAGTGGTTTCTGG		
57F	CCTGGGGCTCATGAAAGATA		
57R	GGGCCGTCTCTAATTTTCC		
ALB_F	TGTTGCATGAGAAAACGCCA	4q13.3	-
ALB_R	GTCCGCTGTTACCAAGGAT		
F8_F	GCCAAGAAGCATCCTAAAACCTG	Xq26	-
F8_R	GGCGAGGACTAAGGGAGCAT		

### 3.3 Materiały

#### 3.3.1 Odczynniki

Tab.7. Wykaz ważniejszych odczynników

<b>ODCZYNNIKI</b>	
<b>Odczynnik</b>	<b>Producent</b>
Agaroza	Sigma-Aldrich
Alkohol etylowy	POCH Gliwice
AmpliQ SYBR GREEN KIT	Novazym
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Genome-Wide Human SNP Array 6.0	Affymetrix
Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 6.0	Affymetrix
HumanCytoSNP-12 BeadChip Kit	Illumina
KCl	Sigma-Aldrich
Marker Lambda DNA/HindIII	Fermentas
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma-Aldrich
NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit	Roche
NimbleGen Hybridization Kit, LS	Roche
Nonidet <sup>®</sup> P40	Sigma-Aldrich
Nova DNA ladder 100bp	Novazym
Reference DNA	Promega
SALSA MLPA P036 Human Telomere-3	MRC-Holland
SALSA MLPA P070 Human Telomere-5	MRC-Holland
SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes	MRC-Holland
SDS	Sigma-Aldrich
SNP 6 Core Reagent Kit	Affymetrix
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris HCl	Sigma-Aldrich
2-propanol	POCH Gliwice



Tab.8. Wykaz buforów sporządzanych przez autora

<b>BUFORY</b>	
<b>Bufor TKM (10x):</b>	
Tris Base	3,025 g
Na <sub>2</sub> EDTA	3,72g
Tris HCl	3,94g
KCl	3,725g
MgCl <sub>2</sub> (6x H <sub>2</sub> O)	4.25 ml
H <sub>2</sub> O	uzupełnić do 1 L
<b>Bufor TAE (10x):</b>	
Tris Base	48,4 g
Kwas octowy (ρ=1,6 g/ml)	6,8 ml
EDTA	2,92 g
H <sub>2</sub> O	uzupełnić do 1 L
<b>Bufor do lizy (1x)</b>	
Nonidet <sup>®</sup> P40	37,5 ml
1x TKM	962,5 ml

### 3.3.2 Internetowe programy komputerowe i bazy danych

W pracy autor korzystał z różnego typu programów oraz internetowych baz danych, które przedstawiono poniżej:

- BLAST; <http://www.ensembl.org/Multi/blastview>
- Database of Genome Variants (DGV); <http://projects.tcag.ca/variation/>
- Decipher; <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- Ensemble Genome Browser; <http://www.ensembl.org/index.html>
- GCAD (Genoglyphix chromosomal aberration database);  
<http://www.uk.genoglyphix.com/gcad/search/>
- GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- HGMD (Human Genome Mutation Database);  
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Map Viewer; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>
- OMIM<sup>®</sup> (Online Mendelian Inheritance in Man);  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- Primer 3; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
- UCSC Genome Browser; <http://genome.ucsc.edu/>

## 4 Wyniki

U wszystkich pacjentów wykonano badanie kariotypu o rozdzielczości 550 prążków. U 147 pacjentów stwierdzono prawidłowy kariotyp, u 13 wykryto zrównoważone aberracje chromosomowe. U 2 pacjentek w badaniu kariotypu, widoczne były niezrównoważone zmiany (46,XX der(22), 46,XX,add(9)(p24)).

### 4.1 Wyniki badania MLPA

U 125 pacjentów przeprowadzono badanie MLPA w kierunku znanych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji (69 pacjentów) i aberracji regionów subtelomerowych (96 pacjentów). U 40 pacjentów wykonano zarówno badanie w kierunku zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji i rearanżacji subtelomerowych. Dzięki metodzie MLPA u 3 z 69 badanych pacjentów (4,3%) zidentyfikowano znane mikrodelecje, natomiast u 2 z 96 badanych pacjentów (2,1%) wykryto rearanżacje regionów subtelomerowych. Opisy kliniczne pacjentów z nieprawidłowymi wynikami badania MLPA omówiono poniżej.

#### Pacjentka A-1

Dziewczynka urodzona w 2005 roku, w 40 tygodniu I ciąży, w wyniku prawidłowego porodu siłami natury. Masa urodzeniowa dziecka wynosiła 3050 g, długość ciała 53 cm, obwód głowy 33 cm, klatki piersiowej 34 cm. Dziewczynka oceniona na 10 punktów w skali Apgar. W pierwszym roku życia stwierdzono opóźniony rozwój dziecka. Dziecko rozpoczęło siadać około 9 miesiąca życia, natomiast samodzielnie chodzić około 3,5 roku życia. Około 4 miesiąca życia stwierdzono atopowe zapalenie skóry. Obserwowano brak przyrostu masy ciała oraz wzrostu. Z powodu zeza, w 10 miesiącu życia, dziecko było konsultowane u okulisty. W wieku 1,5 roku u dziewczynki rozpoczęto rehabilitację ruchową i logopedyczną. W tym okresie ortopeda i neurolog zdiagnozowali wiotkość stawową. Z uwagi na zaburzenia zachowania przeprowadzono diagnostykę w kierunku autyzmu, wykluczając go. Obserwowano dziwne ruchy rąk, znaczne opóźnienie rozwoju mowy oraz zaburzenia snu. W wykonanym badaniu rentgenowskim (RTG) nadgarstka stwierdzono opóźniony o 2 lata wiek kostny. W wieku 4 lat dziecko było hospitalizowane na oddziale endokrynologicznym z podejrzeniem somatotropinowej

niedoczynności przysadki. Rezonans magnetyczny (NMR) głowy wykazał hipoplazję przysadki. W dniu pierwszej wizyty w Poradni Genetycznej dziewczynka miała 2 lata. Masa ciała wynosiła 10,2 kg, a obwód głowy 43 cm. Dziewczynka była bardzo szczupła. Zaznaczone cechy dysmorfii twarzy w postaci zeza, większych oczu, błękitnych twardówek, długich rzęs, wysokiego podniebienia, gładkiej rynienki podnosowej, odstających małżowin usznych, nasilonego owłosienia na plecach, klinodaktylii V palców dłoni, dużych przeprostów i wiotkości stawowej. W wieku 5 lat u pacjentki nadal występował niedobór masy ciała i wzrostu. Ponadto obserwowano bardzo słaby rozwój mowy, w postaci wypowiedzania pojedynczych słów. Wywiad rodzinny jest obciążony występowaniem NI u krewnej drugiego stopnia ojca dziewczynki. Rodzice są ogólnie zdrowi i nie są spokrewnieni. U dziewczynki stwierdzono prawidłowy kariotyp żeński (46,XX), a następnie wykonano badanie FISH w kierunku delecji 22q11.2, uzyskując prawidłowy wynik. Z uwagi na zaburzenia zachowania, opóźnienie rozwoju mowy oraz stereotypie ruchowe przeprowadzono diagnostykę molekularną w kierunku zespołu Retta. Wykluczono zmiany w sekwencji kodującej genu *MECP2*. Z uwagi na cechy dysmorfii, u dziewczynki przeprowadzono badanie MLPA w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji (zestaw P245), uzyskując nieprawidłowy wynik w postaci heterozygotycznej delecji regionu 1p36. W celu weryfikacji nosicielstwa zmiany u rodziców dziecka, wykonano u nich badanie MLPA w kierunku delecji regionu 1p36. Wynik badania był prawidłowy, potwierdzając zmianę *de novo* u córki.

## **Pacjent A-2**

Mężczyzna urodzony w 1975 roku z II ciąży, powikłanej obrzękami kończyn dolnych (pierwsza ciąża matki zakończyła się poronieniem samoistnym), z masą ciała 3000 g. Po porodzie stwierdzono wrodzoną wadę serca pod postacią zwężenia zastawki aorty. Pacjent był operowany z powodu prawostronnego wnetrostwa. Mężczyzna ma niedosłuch i wadę wzroku i jest osobą niepełnosprawną intelektualnie w stopniu lekkim. W badaniach endokrynologicznych stwierdzono hipopituitarizm z następowym hipogonadyzmem hipogonadotropowym, wolem guzkowym i niedoborem hormonu wzrostu. Mężczyzna znajduje się pod stałą opieką endokrynologa. Podczas wizyty w Poradni Genetycznej pacjent miał 36 lat. W badaniu przedmiotowym wzrost pacjenta wynosił 163 cm, masa ciała 54 kg, a obwód głowy 53,5 cm. Charakterystyczne cechy dysmorfii pacjenta to: skośno-górne ustawienie szpar powiekowych, mały zadarty nos,

wygładzona rynienka podnosowa, kąciaki ust ustawione ku dołowi, brak zębów stałych, zaburzone wiry owłosienia na głowie, brak owłosienia na ciele, długie paluchy, stosunkowo długie palce dłoni, lekka płetwistość między palcami dłoni oraz długie i wąskie stopy. Matka pacjenta zmarła z powodu raka pęcherzyka żółciowego, ojciec przeżył udar mózgu. Rodzice nie byli ze sobą spokrewnieni. U pacjenta wykonano badanie kariotypu, którego wynik był prawidłowy (46,XY). Badanie metodą MLPA w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji (zestaw P245) wykazało obecność heterozygotycznej delecji 22q11.2, będącej przyczyną zespołu DiGeorge'a. Lekarz genetyk, wobec nietypowych objawów u pacjenta, zlecił potwierdzenie rozpoznania klinicznego drugą niezależną metodą FISH. Wynik badania FISH w kierunku mikrodelecji potwierdził wcześniej wykrytą zmianę, a badanie u ojca pacjenta, pod kątem mikrodelecji 22q11.2, dało prawidłowy wynik.

### **Pacjent A-3**

Chłopiec urodzony w 2001 roku w 41 tygodniu III ciąży w wyniku porodu cięciem cesarskim (wahania tętna płodu). Masa urodzeniowa dziecka wynosiła 2900 g, oceniony na 9 punktów w skali Apgar. Po urodzeniu stwierdzono hipotrofię, a później przepuklinę mosznową i opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. W wieku 4 lat, w badaniu echokardiograficznym rozpoznano nadzastawkowe zwężenie aorty. W wieku 10 lat w badaniu przedmiotowym stwierdzono: lekko opóźniony rozwój psychomotoryczny, niedobór wzrostu oraz dyskretne cechy dysmorfii (mały zadarty nos, wydłużona rynienka podnosowa, klinodaktylia V palca u dłoni, wydatna warga oraz niebieskie, gwiazdziste tęczęwki). Rodzice pacjenta są ogólnie zdrowi, niespokrewnieni i nienarażeni na działanie czynników mutagennych i teratogennych. Pacjent ma troje rodzeństwa, które rozwija się prawidłowo. W rodzinie nie występowały wcześniej choroby uwarunkowane genetycznie, niepowodzenia rozrodu, wady wrodzone, ani niepełnosprawność intelektualna. U pacjenta uzyskano prawidłowy wynik badania kariotypu (46,XY). Obserwowane u chłopca: niedobór wzrostu, lekkie opóźnienie rozwoju, cechy dysmorfii i typowa, wrodzona wada serca pozwalały na wysunięcie klinicznego podejrzenia zespołu Williamsa. Rozpoznanie to zostało jednoznacznie potwierdzone wykonanym badaniem techniką MLPA (zestaw P245), które wykazało obecność heterozygotycznej delecji 7q11. Powyższej zmiany nie wykryto u rodziców pacjenta, co wskazuje u niego na zmianę *de novo*.

#### **Pacjentka A-4**

Kobieta urodzona w 1989 roku w 32 tygodniu ciąży powikłanej nieprawidłowo niskim zagnieżdżeniem łożyska w macicy (łożysko przodujące). Masa urodzeniowa dziecka wynosiła 1040 g, a obwód głowy 29 cm. Dziewczynka oceniona na 3 punkty w skali Apgar. Po porodzie stwierdzono wady wrodzone w postaci hipoplazji lewej nerki oraz refluksu pęcherzowo-moczowodowego. W badaniu przedmiotowym w wieku 21 lat wzrost pacjentki wynosił 135 cm, masa ciała 27 kg, a obwód głowy 50 cm. Stwierdzono następujące cechy dysmorfii: niskorosłość, mały podbródek, trójkątną twarz, małe stopy, nieregularne kształty palców u dłoni, wysokie czoło, nisko osadzone małżowiny uszne, kąćki ust skierowane ku dołowi oraz przerost łechtaczki. U pacjentki stwierdzono także zachowania autystyczne, padaczkę, obniżone napięcie mięśniowe oraz zaburzenia chodu. Występuje u niej NI w stopniu głębokim. W badaniu EEG nie stwierdzono zmian. Pacjentka jest jedynaczką, a rodzice są ogólnie zdrowi, niespokrewnieni i nienarażeni na działanie czynników mutagennych i teratogennych. Ponadto w rodzinie nie stwierdzono wad wrodzonych oraz chorób genetycznych. W badaniu kariotypu u probandki stwierdzono prawidłowy kariotyp żeński (46,XX). Analiza regionów subtelomerowych wykonana metodą MLPA (zestawy P036 i P070), ujawniła heterozygotyczną delecję sekwencji subtelomerowych na ramieniu krótkim chromosomu 4 (4p) pacjentki. W celu oceny nosicielstwa wykrytej zmiany, badanie MLPA wykonano również u obojga rodziców. Nie wykryto u nich badanej zmiany, co oznacza, że delecja u córki powstała *de novo*.

#### **Pacjent A-5**

Chłopiec urodzony w 2007 roku z I ciąży, powikłanej infekcją wirusową dróg oddechowych u matki (grypa z wysoką gorączką około 40°C przez 2 dni) w 3 miesiącu ciąży oraz infekcją dróg rodnych i układu moczowego (około 4-5 miesiąca ciąży). Dziecko urodzone cięciem cesarskim w 37 tygodniu ciąży, z masą ciała 1440 g i długością 47 cm. Chłopiec oceniony na 7 punktów w skali Apgar. Po porodzie stwierdzono przetokę ślinową na szyi po prawej stronie. W badaniu audiologicznym stwierdzono ubytek słuchu w prawym uchu. W przeciemieniowym badaniu ultrasonograficznym (USG) wykonanym w 1 dobie życia, podejrzewano hipoplazję mózdzku, ale w badaniu kontrolnym przeprowadzonym około 4 miesiąca życia dziecka, obraz OUN był w normie. Chłopiec słabo przybierał na wadze. Ma obniżone napięcie

mięśniowe i jest intensywnie rehabilitowany. Dziecko mikrosomiczne – w wieku 6 miesięcy masa ciała wynosiła 4 kg. Poziom TSH był w normie. W badaniu przedmiotowym wykonanym w wieku 2 lat, obecne cechy dysmorfii twarzy: skośno-górne ustawienie szpar powiekowych, wąskie szpary powiekowe, małozuchwie, kąćki ust skierowane ku dołowi, nieco niżej osadzone małżowiny uszne, płaska nasada nosa. Pacjent jest jedynakiem, a rodzice są ogólnie zdrowi, niespokrewnieni i nienarażeni na działanie czynników mutagennych i teratogennych. Ponadto, w rodzinie nie stwierdzono wad wrodzonych oraz chorób genetycznych. W toku przeprowadzonej diagnostyki otrzymano prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz nie wykryto mutacji dynamicznej w genie *FMRI*, tym samym wykluczając zespół FraX u chłopca. Obserwowany u dziecka opóźniony rozwój psychomotoryczny, obniżone napięcie mięśniowe, charakterystyczne cechy dysmorfii twarzy oraz słaby przyrost masy ciała w okresie niemowlęctwa, pozwoliły wysunąć kliniczne podejrzenie zespołu Pradera-Willi’ego. Przeprowadzono test metylacji *locus SNRPN*, otrzymując prawidłowy wynik. W diagnostyce różnicowej uwzględniono również istnienie aberracji submikroskopowej. Analiza regionów subtelerowych wykonana metodą MLPA (zestawy P036 i P070), ujawniła heterozygotyczną duplikację sekwencji subtelerowych na ramieniu krótkim chromosomu 19 (19p) pacjenta. W celu oceny nosicielstwa wykrytej zmiany, badanie MLPA wykonano również u obojga rodziców. Nie wykryto u nich badanej zmiany, co oznaczało, że duplikacja u syna powstała *de novo*.

#### 4.1.1 Podsumowanie wyników badania MLPA

Tab.9. Lista wykrytych zmian u pacjentów w badaniu MLPA

Pacjent	Region	Rodzaj zmiany	Zespół genetyczny	Zestaw diagnostyczny	Pochodzenie
A-1	1p36	delecja	Zespół delecji 1p36	P245	<i>de novo</i>
A-2	22q11.2	delecja	Zespół DiGeorge’a	P245	nz
A-3	7q11	delecja	Zespół Williamsa	P245	<i>de novo</i>
A-4	4p	delecja	Delecja 4p	P036, P070	<i>de novo</i>
A-5	19p	duplikacja	Duplikacja 19p	P036, P070	<i>de novo</i>

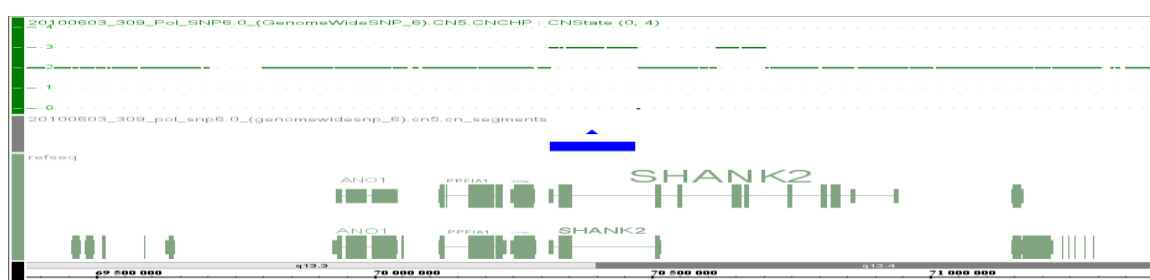
**Legenda:** nz – niezidentyfikowane pochodzenie aberracji

## **4.2 Wyniki badania SNP-array oraz aCGH**

W celu dokładnej analizy genomu u 63 pacjentów (25 płci żeńskiej oraz 38 płci męskiej) wykonano badanie techniką SNP-array lub aCGH. Należy zauważyć, że u 26 pacjentów wykonano wcześniej badanie techniką MLPA, natomiast 37 pacjentów nie miało przeprowadzonego badania metodą MLPA. Analizę SNP-array przeprowadzono u 58 pacjentów (u 34 pacjentów z rozdzielczością 300k, a u 24 pacjentów z rozdzielczością 1M). Badanie aCGH o rozdzielczości 135k wykonano u 5 pacjentów. U 15 z 58 badanych pacjentów (25,9%) wykryto zmiany w badaniu SNP-array, natomiast u 1 z 5 badanych pacjentów (20%) uzyskano nieprawidłowy wynik badania aCGH. Ze względu na wysoką rozdzielczość zastosowanej metody oraz dużą ilość uzyskanych zmian, w pracy pominięto te, które są polimorficzne oraz nie zawierają żadnych genów. Ostatecznie 11 zmian u 10 pacjentów (15,9%) uznano za patogenne. Charakterystyka pacjentów z prawidłowymi wynikami badań aCGH/SNP-array przedstawiono niżej w tabeli 11. U 47 pacjentów wynik badania aCGH/SNP-array był prawidłowy. U pacjentów tych nie zidentyfikowano żadnych zmian CNV lub jedynie takie, które były często identyfikowane w populacji ludzi zdrowych. Obraz kliniczny poszczególnych pacjentów wraz z wykrytymi u nich zmianami przedstawiono poniżej.

## Pacjent B-1

Chłopiec urodzony w 2008 roku, siłami natury w 40 tygodniu niepowikłanej ciąży. Masa urodzeniowa wynosiła 3400 g, a obwód głowy 34 cm. Dziecko ocenione na 10 punktów w skali Apgar. W wieku 1 roku i 7 miesięcy, chłopiec ważył 11 kg, a obwód głowy wynosił 48 cm. W badaniu fizykalnym prezentował następujące cechy dymorfii: dużą mózgowczaszkę, wysokie czoło, duże, odstające małżowiny uszne, szeroki, płaski nos z poszerzonym czubkiem, wąskie wargi, duże palce. Pacjent wykazuje obniżone napięcie mięśniowe, słabą koordynację motoryczną i nieprawidłowy chód. U dziecka obserwuje się zachowania autystyczne oraz opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Matka chłopca ukończyła szkołę specjalną i ma wrodzoną agenezję lewej nerki. W wieku 13 lat przeżyła zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Ojciec choruje na padaczkę i ma zeza. Rodzice są niespokrewnieni i nienarażeni na działanie czynników mutagennych i teratogennych. W rodzinie nie obserwuje się innych wad wrodzonych i chorób genetycznych. U pacjenta stwierdzono prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. Wykonano także badanie MLPA w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji (zestaw P245) oraz rearanżacji regionów subteleromowych (zestawy P036 i P070). W obu testach uzyskano prawidłowe wyniki. Następnie u dziecka przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 1M. W badaniu uzyskano nieprawidłowy wynik w postaci duplikacji w chromosomie 11 (region 11q13.3-q13.4; rozmiar duplikacji: 170,6 kb; pozycja genomowa wg HG19: chr11:70308218-70478809).

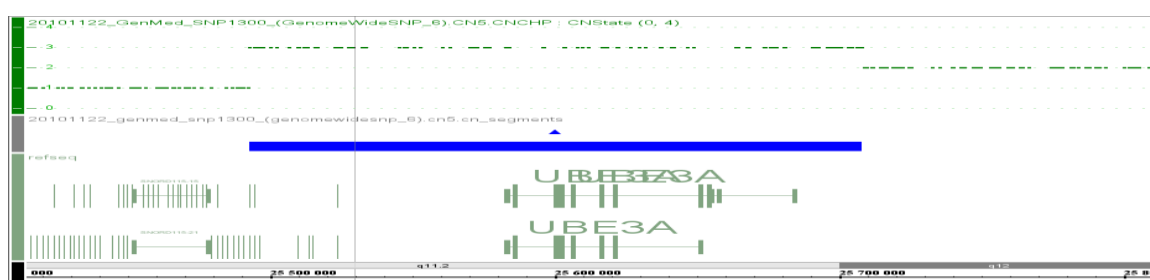


Ryc. 5. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-1. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 11q13.3-q13.4



## Pacjent B-2

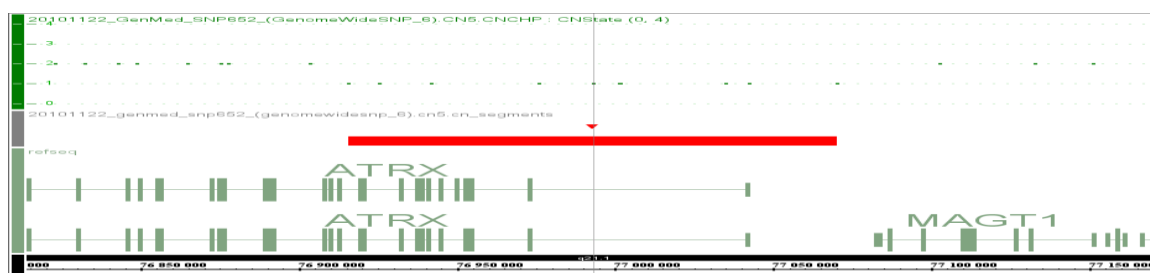
Chłopiec urodzony w 1993 roku, w 39 tygodniu III niepowikłanej ciąży (pierwsza ciąża matki zakończyła się poronieniem samoistnym), z masą ciała wynoszącą 2820 g i oceną 9 punktów w skali Apgar. Podczas porodu zaobserwowano zielone wody płodowe, jednakże u noworodka nie stwierdzono żadnej infekcji. Po porodzie, u dziecka nie stwierdzono większych nieprawidłowości, z wyjątkiem alergii pokarmowej. W wieku 5 miesięcy chłopiec przeszedł zapalenie przyusznic (świnkę). W późniejszym okresie stwierdzono głęboki niedosłuch prawostronny. Pacjent zaczął chodzić w wieku 16 miesięcy. W badaniu przedmiotowym w wieku 17 lat, chłopiec ważył 45 kg i mierzył 170 cm. Wśród cech dysmorficznych, zaobserwowano jedynie lejkowatą klatkę piersiową. U pacjenta występuje NI w stopniu lekkim oraz ADHD (ang. *attention deficit hyperactivity disorder* - zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi). Pacjent ma zdrową starszą siostrę. Rodzice chłopca są ogólnie zdrowi, niespokrewnieni i nienarażeni na działanie czynników mutagennych i teratogennych. Jednakże w rodzinie pacjenta występują liczne przypadki NI. Brat matki matki pacjenta ma córkę z NI oraz wnuka z autyzmem dziecięcym. W rodzinie ojca matki pacjenta są także liczne osoby z NI. U chłopca stwierdzono prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. W celu dokładnej analizy genomu, u pacjenta przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 1M. W badaniu wykryto duplikację w chromosomie 15 (region 15q11.2; rozmiar delecji: 236,4 kb; pozycja genomowa wg HG19: chr15:25482105-25718507).



Ryc. 6. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-2. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 15q11.2

### Pacjentka B-3

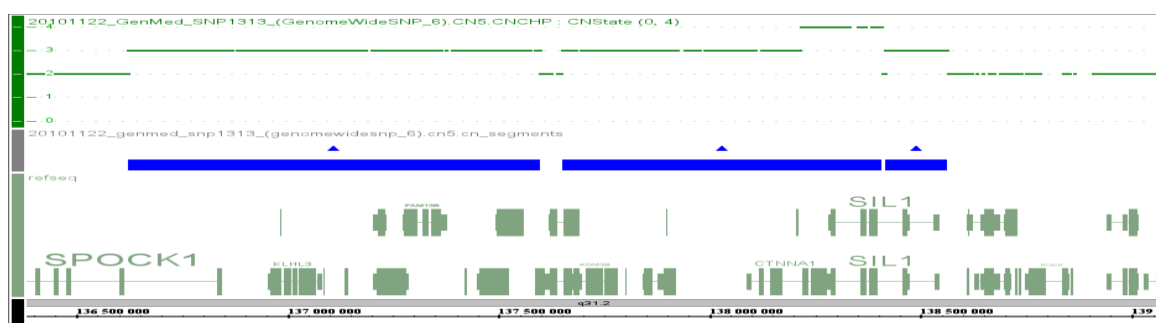
Pacjentka urodzona w 1989 roku. Poród odbył się siłami natury w 40 tygodniu ciąży. Dziecko ważyło 3500 g, obwód głowy wynosił 32 cm, ocenione na 10 punktów w skali Apgar. Po urodzeniu, u noworodka nie stwierdzono żadnych wad. W późniejszym okresie, u dziecka zaobserwowano opóźniony rozwój chodu, a także częste wymioty. W trakcie pierwszego badania przedmiotowego w Poradni Genetycznej, pacjentka miała 21 lat, ważyła 54 kg, mierzyła 168 cm, a obwód głowy wynosił 58 cm. Oprócz znacznej NI, kobieta prezentowała cechy dysmorfii: wydłużoną twarz, wydatne brwi, prognatyzm, wąskie podniebienie, skoliozę. Pacjentka wykazywała nieprawidłowy chód, spastyczność oraz wygórowane odruchy ścięgniste. Rodzice pacjentki są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. Brat pacjentki jest również niepełnosprawny intelektualnie w stopniu znacznym oraz posiada bardzo podobne cechy fenotypowe. W badaniu kariotypu u kobiety uzyskano prawidłowy kariotyp żeński (46,XX). Następnie wykonano przesiewowe badanie mutacji dynamicznej w genie *FMR1*, analizę rearanżacji regionów subtelerowych metodą FISH oraz test metylacji *locus SNRPN*. We wszystkich badaniach uzyskano prawidłowe wyniki. Przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 1M, otrzymując 1 zmianę. Wykryto delecję w chromosomie X (region Xq21.1; rozmiar delecji: 170,1 kb; pozycja genomowa wg HG19: chrX:76907922-77078030).



Ryc. 7. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-3. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie Xq21.1

## Pacjent B-4

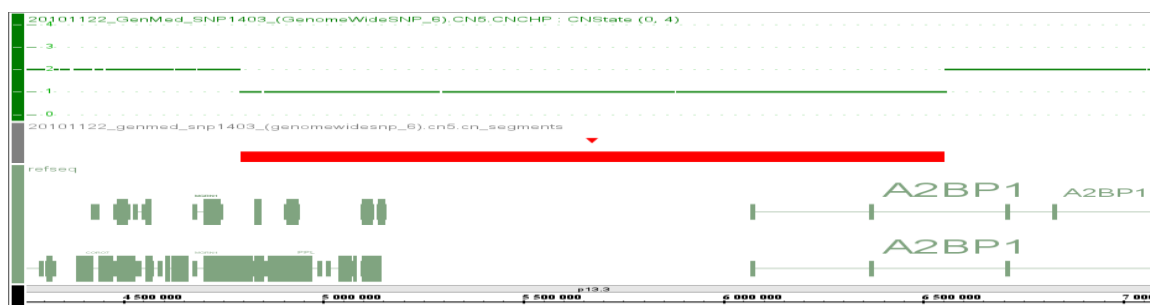
Chłopiec urodzony w 2007 roku, z I ciąży. Przebieg ciąży prawidłowy, poród w 38 tygodniu ciąży, siłami natury. Masa urodzeniowa wynosiła 3270 g, obwód głowy 33 cm, oceniony na 9 punktów w skali Apgar. Rozwój psychomotoryczny opóźniony. Dziecko objęto opieką neurologiczną, psychologiczną i logopedyczną. W badaniu przedmiotowym w wieku 2 lat chłopiec wykazywał prawidłową budowę ciała (wzrost 90 cm, waga 15 kg, obwód głowy 48 cm), płaską potylicę, wysokie czoło, klinodaktylię V palców obu dłoni, krótkie palce dłoni i stóp oraz pojedyncze cechy dysmorfii twarzy (duże małżowiny uszne, wąska czerwień wargowa, pogłębiona rynienka nosowo-wargowa, szerokie brwi). Rodzice pacjenta nie są spokrewnieni. Matka ukończyła zawodową szkołę specjalną, a ojciec szkołę podstawową. Oboje są ogólnie zdrowi i nienarażeni na szkodliwe czynniki środowiskowe. Pacjent ma młodszą siostrę, wykazującą również opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. W dalszej rodzinie pacjenta występuje NI u dwójki dzieci kuzynki matki pacjenta oraz niskorosłość u siostry matki pacjenta. U chłopca stwierdzono prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. Wykonano badanie SNP-array o rozdzielczości 1M. Analiza ujawniła duplikację w chromosomie 5 (region 5q31.2; rozmiar duplikacji: 1,99 Mb; pozycja genomowa wg HG19: chr5:136574745-138570014).



Ryc. 8. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-4. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 5q31.2

## Pacjent B-5

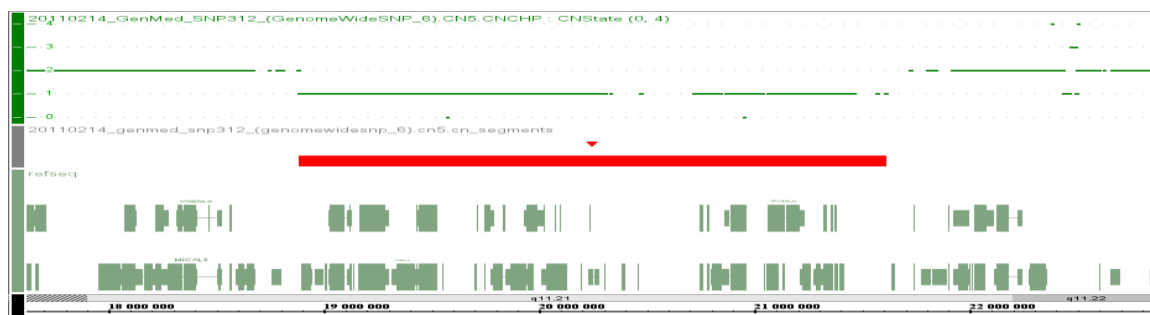
Chłopiec urodzony w 2005 roku z I prawidłowej ciąży. Poród odbył się w 40 tygodniu ciąży, z masą urodzeniową 2700 g i obwodem głowy 30 cm. Oceniony na 7 punktów w skali Apgar. Po porodzie stwierdzono zwężenie zastawki tętnicy płucnej. Chłopiec zaczął chodzić w wieku 18 miesięcy, mówić pierwsze słowa w wieku 3 lat. Ma niedosłuch prawostronny. Występuje u niego NI w stopniu lekkim (IQ 57). W badaniu przedmiotowym w wieku 5 lat, wzrost wynosił 100 cm, masa ciała 17 kg, a obwód głowy 48 cm. Widoczne były też dyskretne cechy dysmorfii twarzy w postaci małozuchwia i grubych obrąbków małżowin usznych. Budowa ciała szczupła, prawidłowa. U pacjenta występuje duża ruchliwość oraz stereotypie ruchowe (pocieranie dłoni). Chłopiec wykazuje opóźnienie rozwoju mowy. Dziecko było adoptowane w wieku 20 dni. Rodzice biologiczni dziecka są blisko spokrewnieni ze sobą, jednak nie ma bliższych danych na temat ich stanu zdrowia oraz wywiadu rodzinnego. U pacjenta stwierdzono prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. Wykonano badanie SNP-array o rozdzielczości 1M, stwierdzając delecję w chromosomie 16 (region 16p13.3; rozmiar delecji: 1,93 Mb; pozycja genomowa wg HG19: chr16:4706455-6642330).



Ryc. 9. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-5. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 16p13.3

## Pacjentka B-6

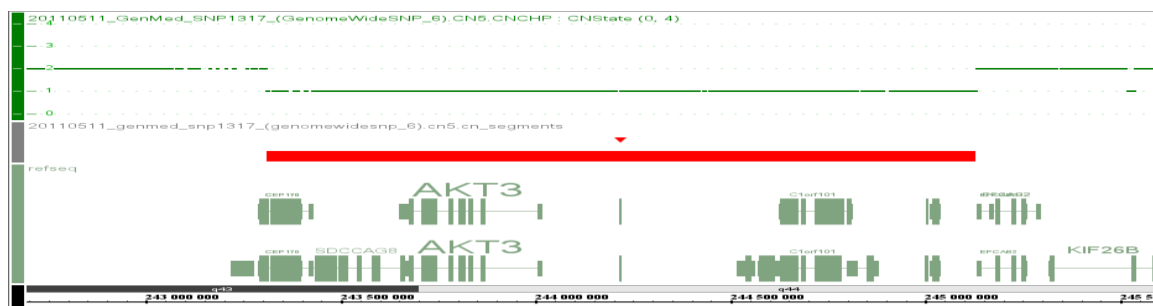
Pacjentka urodzona 1984 roku, z IV ciąży (matka w czasie ciąży prawdopodobnie nadużywała alkoholu). Urodzona przedwcześnie w 35 tygodniu ciąży, rozwiązanej cięciem cesarskim. Dziecko urodzone w stanie ciężkim (otrzymało 3 punkty w skali Apgar). Przez pierwszych 10 dni życia występowała niewydolność oddechowo-kążeniowa, w direktoskopii stwierdzono niedorozwój krtani. Od urodzenia dziecko objęte opieką poradni dla wcześniaków. Od wczesnych lat dziecięcych pod opieką Poradni Psychologicznej. W 6. roku życia operowana z powodu wady stóp (stopy końsko-szpotałe). Od urodzenia rozwój psychomotoryczny znacznie opóźniony: w wieku 3,5 lat rozwój na poziomie dziecka półrocznego. Rozwój mowy bardzo zaburzony (pierwsze słowa dziewczynka zaczęła wypowiadać w wieku 6 lat). W wieku 24 lat, masa ciała pacjentki wynosiła 59 kg, wzrost 152 cm, a obwód głowy 55 cm. Pacjentka ma pogrubione rysy twarzy, szpary powiekowe skośne ku górze, wylupiaсте oczy, duży nos, czubek nosa bulwiasty, wydatne usta, duży język, wysokie podniebienie, małą żuchwę, małe małżowiny uszne, szczupłe palce dłoni oraz klinodaktylię V palców u dłoni. Występują u niej stereotypie ruchowe, zaburzenia snu, nadwrażliwość skóry oraz krótkowzroczność. Kobieta wykazuje NI w stopniu znacznym (IQ 35). Pacjentka od urodzenia przebywała w domu dziecka. Ma dwóch starszych braci: u jednego rozpoznano schizofrenię, natomiast drugi jest niepełnosprawny intelektualnie w stopniu lekkim. Brak bliższych danych z wywiadu rodzinnego. U pacjentki stwierdzono prawidłowy kariotyp żeński (46,XX) oraz wykluczono zmiany w sekwencji kodującej genu *MECP2*. Następnie przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 1M, wykrywając delecję w chromosomie 22 (region 22q11.21; rozmiar delecji: 2,99 Mb; pozycja genomowa wg HG19: chr22:18750666-21747559).



Ryc. 10. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-6. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 22q11.2

## Pacjent B-7

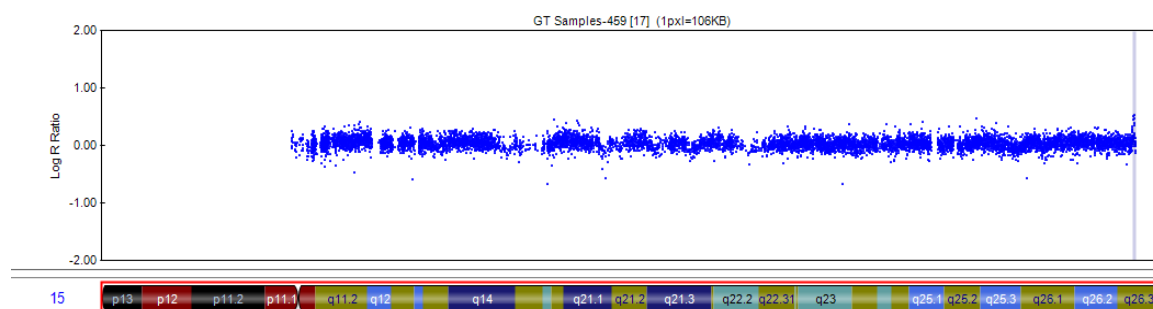
Chłopiec urodzony w 1997 roku, w 37 tygodniu ciąży, w wyniku prawidłowego porodu siłami natury. Masa urodzeniowa dziecka wynosiła 2590 g, a obwód głowy 32 cm. U dziecka stwierdzono wrodzoną wadę serca (ASDII) oraz wnętrostwo prawostronne. W wieku 11 lat masa ciała chłopca wynosiła 30 kg, wzrost 131 cm, a obwód głowy 47 cm. Pacjent prezentował następujące cechy dysmorfii: małogłowie, nachylone czoło, płaską potylicę, wydatny nos, krótką rynienkę podnosową, cienkie wargi, duże małżowiny uszne zrotowane ku tyłowi, szerokie górne siekacze, astygmatyzm oraz nadwzroczność. U pacjenta występują drgawki, niedokrwistość oraz opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Obecna jest NI w stopniu głębokim. W badaniu MRI wykryto agenezję ciała modzelowatego. Rodzice chłopca są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie pacjenta występują dwa przypadki NI (kuzynka i kuzyn drugiego stopnia). W badaniu kariotypu u chłopca uzyskano prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. Następnie wykonano test metylacji *locus SNRPN*, otrzymując wynik prawidłowy. Później przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 1M, wykazując delecję w chromosomie 1 (region 1q43-1q44; rozmiar delecji: 2,00 Mb; pozycja genomowa wg HG19: chr1:243218196-245220074).



Ryc. 11. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-7. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 1q43-1q44

## Pacjent B-8

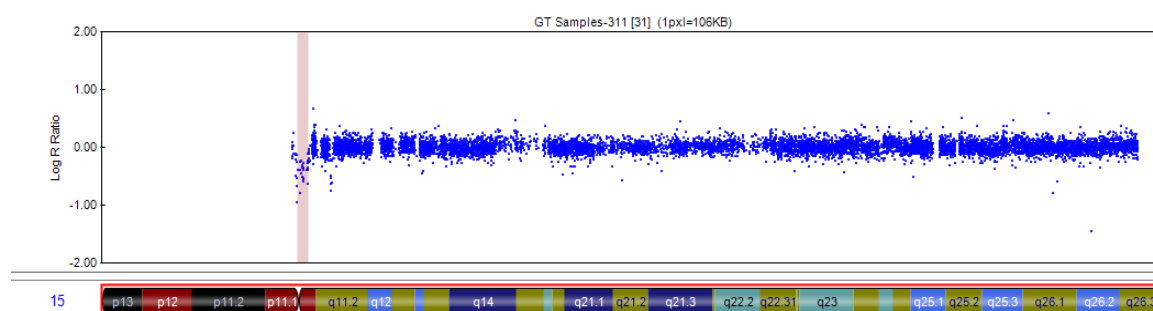
Chłopiec urodzony w 2000 roku, z niepowikłanej ciąży. Poród odbył się w 38 tygodniu ciąży, z masą ciała 3500 g i obwodem głowy 35 cm. Oceniony na 8 punktów w skali Apgar. Po urodzeniu stwierdzono przetrwały przewód tętniczy i opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. W wieku 10 lat masa ciała chłopca wynosiła 50 kg, wzrost 150 cm, a obwód głowy 55 cm. Stwierdzono następujące cechy dysmorfii: głęboko osadzone oczy, hipoteloryzm, dysplastyczne małżowiny uszne, płaski profil twarzy oraz krótki nos. Dziecko wykazuje nadaktywność, zaburzenia koncentracji, a także wadę wymowy. Występuje u niego NI w stopniu umiarkowanym. W tomografii komputerowej (TK) wykryto obecność jamy przegrody przezroczystej. Rodzice chłopca są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie stwierdzono 2 przypadki NI (brat i siostra ojca pacjenta). U chłopca stwierdzono prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. Wykonano także badanie FISH w kierunku delecji 22q11.2, oraz badanie MLPA w kierunku najczęstszych zmian w chromosomie X, związanych z NI. We wszystkich badaniach uzyskano prawidłowe wyniki. Następnie przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, wykazując duplikację w chromosomie 15 (region 15q26.3; rozmiar duplikacji: 250,4 kb; pozycja genomowa wg HG18: chr15:99841659-100092020).



Ryc. 12. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-8. Widoczna terminalna duplikacja w chromosomie 15q26.3

## Pacjentka B-9

Dziewczynka urodzona w 1995 roku, w 40 tygodniu niepowikłanej ciąży, siłami natury. Masa urodzeniowa dziecka wynosiła 2900 g, obwód głowy 32 cm, ocenione na 10 punktów w skali Apgar. Po urodzeniu stwierdzono wrodzoną wadę nerek. W wieku 15 lat masa ciała dziewczynki wynosiła 44 kg, wzrost 150 cm, a obwód głowy 51 cm. Pacjentka prezentowała następujące cechy dysmorfii: małogłowie, cienką górną i pełną dolną czerwień wargową, duże małżowiny uszne, szerokie usta, prognatyzm, długie i cienkie kości. Zdiagnozowano u niej chorobę refluksową przełyku i obniżone napięcie mięśniowe. Dziewczynka wykazuje opóźnienie rozwoju psychomotorycznego oraz rozwoju mowy. Występuje u niej NI w stopniu znacznym. Ponadto obserwuje się u niej nadaktywność, nadmierną ruchliwość oraz stereotypie ruchowe. U dziecka stwierdzono także nieprawidłowości w badaniu EEG. Rodzice pacjentki są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie nie występują przypadki chorób genetycznych ani wrodzonych wad rozwojowych. U pacjentki stwierdzono prawidłowy kariotyp żeński (46,XX). Następnie wykonano test metylacji *locus SNRPN* oraz badanie FISH w kierunku rearanżacji regionów subteleromowych, otrzymując prawidłowe wyniki. Przeprowadzone badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, dało wynik nieprawidłowy w postaci delecji w chromosomie 15 (region 15q11.2; rozmiar delecji: 3,40 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr15:18818086-22219100).

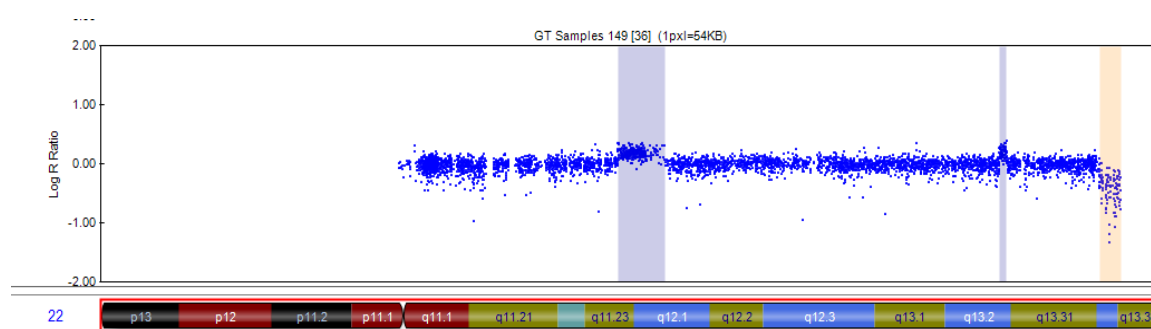


Ryc. 13. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-9. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 15q11.2



## Pacjentka B-10

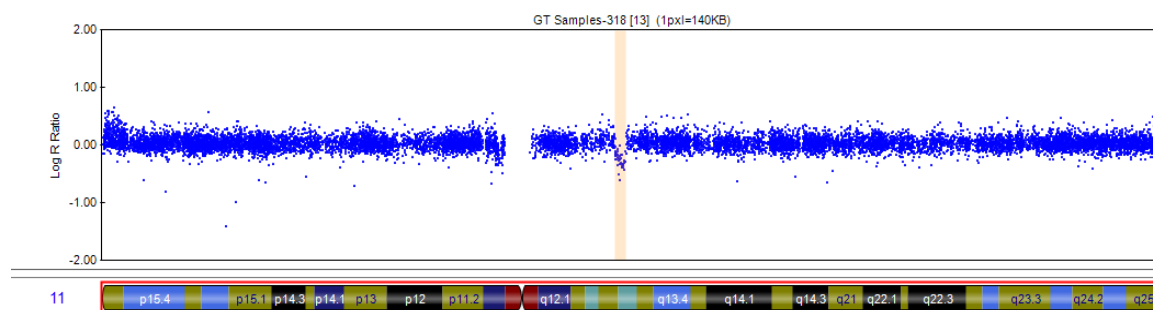
Dziewczynka urodzona w 2002 roku z niepowikłanej ciąży, siłami natury. Poród odbył się w 37 tygodniu ciąży, z masą ciała 3000 g i obwodem głowy 33 cm. Oceniona na 10 punktów w skali Apgar. Po porodzie, u dziewczynki nie stwierdzono żadnych wad wrodzonych. W wieku 8 lat masa ciała dziecka wynosiła 31 kg, wzrost 133 cm, a obwód głowy 52 cm. Pacjentka prezentowała następujące cechy dysmorfii: krótką rynienkę podnosową, wadę zgryzu, małozuchwie, małe zęby, niską przednią linię włosów, nisko osadzone małżowiny uszne, kamptodaktylię IV palców u rąk, krótką szyję. U pacjentki zdiagnozowano diplegię spastyczną kończyn dolnych i afazję semantyczną. Ponadto występuje u niej NI w stopniu lekkim, nadaktywność, nadwrażliwość oraz opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. W badaniu MRI stwierdzono torbiel pajęczynówki, hipoplazję ciała modzelowatego oraz ogniska hiperintensywne w obrębie istoty białej. Rodzice dziewczynki są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie nie ma przypadków chorób genetycznych ani wrodzonych wad rozwojowych. W badaniu kariotypu u dziecka stwierdzono kariotyp żeński z nieprawidłowym chromosomem 22 (46,XX,der(22) *de novo*). W celu dokładniejszego określenia charakteru aberracji chromosomu 22, przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, wykazując delecję wielkości 1,03 Mb (region 22q13.33; pozycja genomowa wg HG18: chr22:48483337-49515911).



Ryc. 14. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-10. Widoczna terminalna delecja w chromosomie 22q13.33

## Pacjent B-11

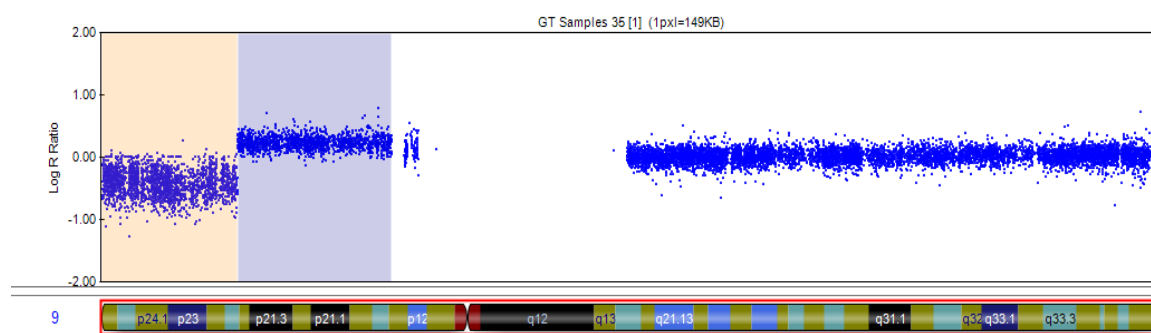
Chłopiec urodzony w 2001 roku z niepowikłanej ciąży, siłami natury. Poród odbył się w 40 tygodniu ciąży, z masą ciała 1950 g i obwodem głowy 34 cm. Po porodzie, u chłopca nie stwierdzono żadnych wad wrodzonych. W wieku 8 lat masa ciała dziecka wynosiła 18 kg, wzrost 115 cm, a obwód głowy 51 cm. Pacjent prezentował następujące cechy dysmorfii: wydłużoną twarz, płaską rynienkę podnosową, wysoką przednią linię włosów, asymetryczną postawę ciała (lewe ramię niższe), częściową syndaktylię II i III palców u stóp i suchą skórę. U pacjenta stwierdzono obniżone napięcie mięśniowe oraz opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Występuje u niego NI w stopniu umiarkowanym. Rodzice chłopca są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie pacjenta występują przypadki rozszczepu podniebienia, przepukliny oponowo-rdzeniowej oraz głuchoty. W badaniu kariotypu uzyskano wynik prawidłowy (46,XY), zaś w badaniu MLPA wykluczono najczęstsze zespoły mikrodelecji (zestaw P245). Następnie przeprowadzono analizę SNP-array o rozdzielczości 300k, stwierdzając delecję w chromosomie 11 (region 11q13.1; rozmiar delecji: 815 kb; pozycja genomowa wg HG18: chr11:65952841-66768341).



Ryc. 15. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-11. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 11q13.1

## Pacjentka B-12

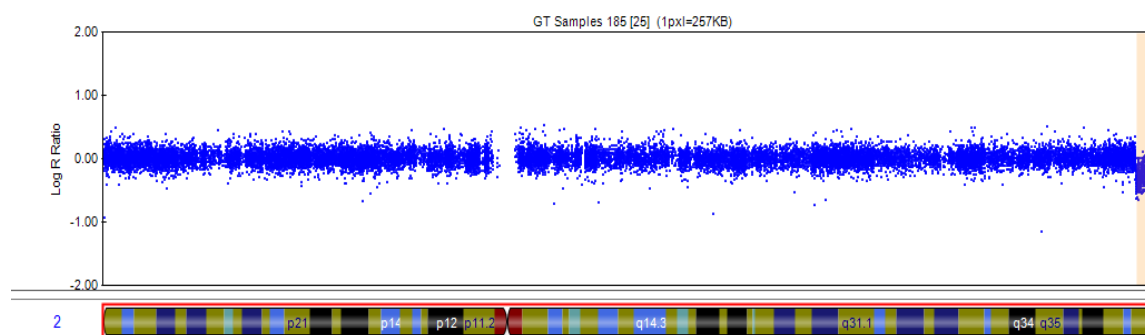
Dziewczynka urodzona w 2009 roku w 37 tygodniu niepowikłanej ciąży, siłami natury. Masa urodzeniowa dziecka wynosiła 3200 g, a ocena w skali Apgar – 7 punktów. Po urodzeniu stwierdzono prawą stopę końsko-szpotawą. Do Poradni Genetycznej dziewczynka trafiła mając 6 miesięcy, z podejrzeniem opóźnienia rozwoju psychomotorycznego. Masa ciała wynosiła 5 kg, wzrost 63 cm, a obwód głowy 42 cm. Podczas badania fizykalnego stwierdzono: wielkogłowie, hiperteloryzm, szpary powiekowe ustawione skośnie ku dołowi, szeroką nasadę nosa, wysokie i wąskie podniebienie, krótkie wędzidełko języka, krótki i zadarty ku górze nos, małe i nisko osadzone małżowiny uszne, szeroko rozmieszczone brodawki sutkowe oraz brak XII pary żeber. Dziewczynka wykazywała obniżone napięcie mięśniowe oraz niedosłuch. W badaniu MRI stwierdzono torbiel pajęczynówki oraz zaokrąglone rogi czołowe mózgu. Rodzice dziecka są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie nie występują przypadki chorób genetycznych ani wrodzonych wad rozwojowych. W badaniu kariotypu u dziecka stwierdzono kariotyp żeński z nieprawidłowym chromosomem 9 (46,XX,add(9)(p24)). W celu dokładniejszego określenia aberracji chromosomu 9, przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, wykazując 2 zmiany: delecję (region 9p24.3-9p22.2; rozmiar delecji: 18,17 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr9:36587-18206477) oraz duplikację (region 9p22.2-9p12; rozmiar duplikacji: 23,3 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr9:18214660-41513872).



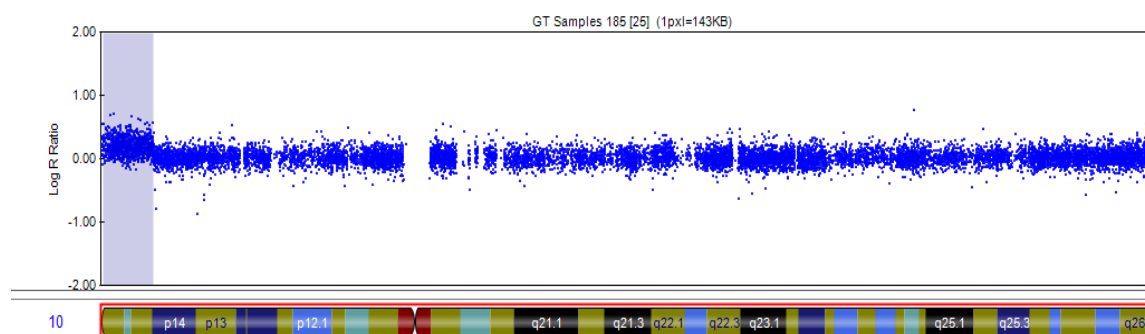
Ryc. 16. Obraz zmian wykrytych u pacjentki B-12. Widoczna terminalna delecja (9p24.3-9p22.2) oraz interstycjalna duplikacja (9p22.2-9p12)

## Pacjentka B-13

Dziewczynka urodzona w 2008 roku z niepowikłanej ciąży. Poród odbył się w 40 tygodniu ciąży, z masą ciała 3680 g i obwodem głowy 35 cm. Po porodzie, u dziecka nie stwierdzono żadnych wad wrodzonych. W wieku 3 lat masa ciała dziecka wynosiła 17 kg, wzrost 102 cm, a obwód głowy 51 cm. Pacjentka prezentowała następujące cechy dysmorfii: małe głęboko osadzone oczy, krótki nos, zapadniętą nasadę nosa, niską przednią linię włosów, dysplastyczne i wydatne małżowiny uszne. Pacjentka wykazywała obniżone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, zachowania autystyczne, łatwość irytacji oraz nadaktywność. Dziewczynka ma lekki stopień NI i nie mówi. Rodzice dziecka są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie brat matki probandki cierpi na schizofrenię. W badaniu kariotypu u dziecka stwierdzono kariotyp żeński z inwersją paracentryczną chromosomu 2 (46,XX,inv(2)(q36.32q37.3). W celu określenia ewentualnego niezrównoważenia kariotypu, przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, wykazując 2 zmiany: delecję w chromosomie 2 (region 2q37.3; rozmiar delecji: 4,35 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr2:238251381-242604099) oraz duplikację w chromosomie 10 (region 10p15.3-10p15.1; rozmiar duplikacji: 6,55 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr10:125708-6683822).



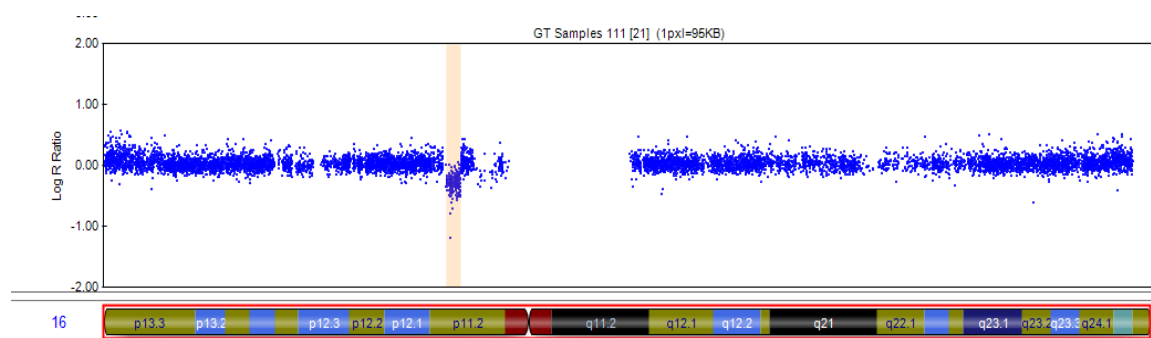
Ryc. 17. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-13. Widoczna terminalna delecja w chromosomie 2q37.3



Ryc. 18. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-13. Widoczna terminalna duplikacja w chromosomie 10p15.3-10p15.1

## Pacjent B-14

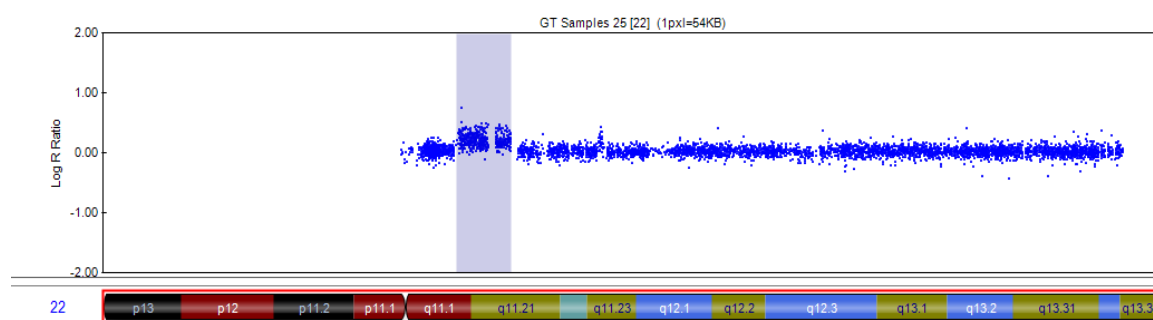
Chłopiec urodzony w 2004 roku z niepowikłanej ciąży, siłami natury. Poród odbył się w 40 tygodniu ciąży, z masą ciała 3480 g i obwodem głowy 34 cm. Dziecko ocenione na 7 punktów w skali Apgar. Po porodzie stwierdzono wnetrostwo i wrodzoną wadę serca (ASDII). W wieku 5 lat masa ciała dziecka wynosiła 18 kg, wzrost 110 cm, a obwód głowy 54 cm. Chłopiec wykazuje opóźnienie rozwoju psychomotorycznego oraz zachowania autystyczne. Rodzice dziecka są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. U chłopca stwierdzono prawidłowy kariotyp męski (46,XY) oraz wykluczono zespół FraX. Wykonano także badanie MLPA w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji (zestaw P245) oraz rearanzacji regionów subtelerowych (zestawy P036 i P070). W obu testach uzyskano prawidłowe wyniki. Przeprowadzono badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, wykazując delecję w chromosomie 16 (region 16p11.2; rozmiar delecji: 1,16 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr16:29563594-30731722).



Ryc. 19. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-14. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 16p11.2

## Pacjent B-15

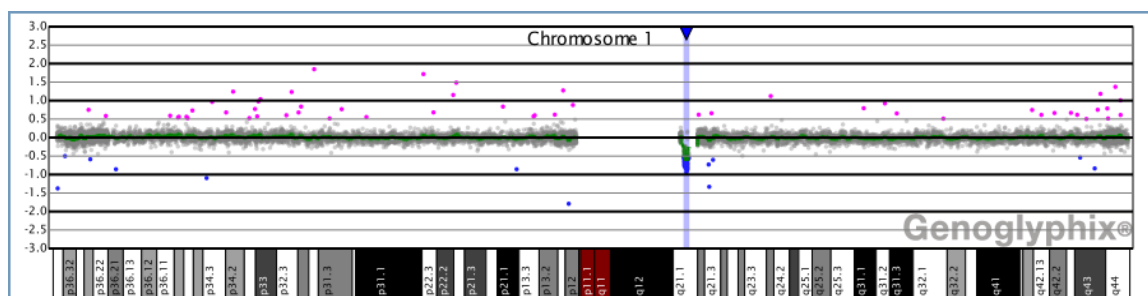
Chłopiec urodzony w 1994 roku. Poród odbył się w 41 tygodniu ciąży, cięciem cesarskim z powodu miednicowego położenia płodu. Masa urodzeniowa wynosiła 2900 g, a obwód głowy 33 cm. Po porodzie, u dziecka nie stwierdzono żadnych wad wrodzonych. W późniejszym okresie, u chłopca występowało opóźnione zarastanie ciemniaczka. W wieku 4 lat u pacjenta zaobserwowano regres w rozwoju psychomotorycznym. W wieku 13 lat masa ciała dziecka wynosiła 33 kg, wzrost 145 cm, a obwód głowy 53 cm. Pacjent prezentował następujące cechy dysmorfii: duże małżowiny uszne, krótkie palce u dłoni, ciemne plamy na skórze oraz niedorozwój jąder. Ponadto chłopiec jest agresywny i uparty. Rodzice dziecka są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie chłopca nie występują przypadki chorób uwarunkowanych genetycznie, ani wad wrodzonych. W badaniu kariotypu u dziecka stwierdzono kariotyp męski ze zrównoważoną translokacją wzajemną chromosomów 2 i 10 (46,XY,t(2;10)(q37.1;q23.2)mat. Ta sama translokacja zrównoważona obecna jest u zdrowej matki pacjenta oraz u zdrowego rodzeństwa (siostry i brata). Wykluczono także zespół FraX u chłopca. W celu sprawdzenia występowania ewentualnego niezrównoważenia kariotypu, wykonano badanie SNP-array o rozdzielczości 300k, wykazując duplikację (region 22q11.21; rozmiar duplikacji: 2,46 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr22:17187197-19654308).



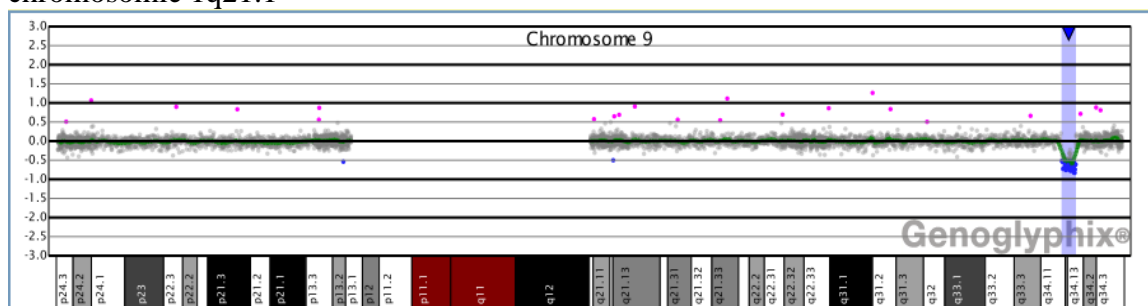
Ryc. 20. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-15. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 22q11.21

## Pacjent B-16

Chłopiec urodzony w 2007 roku z niepowikłanej ciąży, siłami natury. Poród odbył się w 36 tygodniu ciąży, z masą ciała 1930 g i obwodem głowy 31,5 cm. Dziecko ocenione na 4 punkty w skali Apgar. Po urodzeniu u chłopca stwierdzono wodogłowie, refluks pęcherzowo-moczowodowy i zastawkę cewki tylnej. W wieku 3 lat masa ciała dziecka wynosiła 11 kg, wzrost 88 cm, a obwód głowy 47 cm. Pacjent prezentował następujące cechy dysmorfii: wysokie i szerokie czoło, krótki nos z odwróconymi nozdrzami, wąskie usta, ptozę, płaską twarz i potylicę. U pacjenta występuje opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Chłopiec wykazuje astygmatyzm krótkowzroczny oraz ma zeza rozbieżnego. Rodzice dziecka są ogólnie zdrowi i niespokrewnieni. W rodzinie nie występują przypadki chorób genetycznych ani wrodzonych wad rozwojowych. W badaniu kariotypu stwierdzono wynik prawidłowy (46,XY). Wykluczono też zespół FraX. Następnie przeprowadzono badanie aCGH o rozdzielczości 135k, wykazując 2 zmiany: delecję w chromosomie 1 (region 1q21.1; rozmiar delecji: 1,19 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr1:144998070-146193043) oraz delecję w chromosomie 9 (region 9q34.11-9q34.13; rozmiar delecji: 1,81 Mb; pozycja genomowa wg HG18: chr9:132217687-134031151).



Ryc. 21. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-16. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 1q21.1



Ryc. 22. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-16. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 9q34.11-9q34.13

#### 4.2.1 Podsumowanie wyników badań aCGH i SNP-array

Tab.10. Lista wykrytych zmian u pacjentów w badaniach aCGH i SNP-array

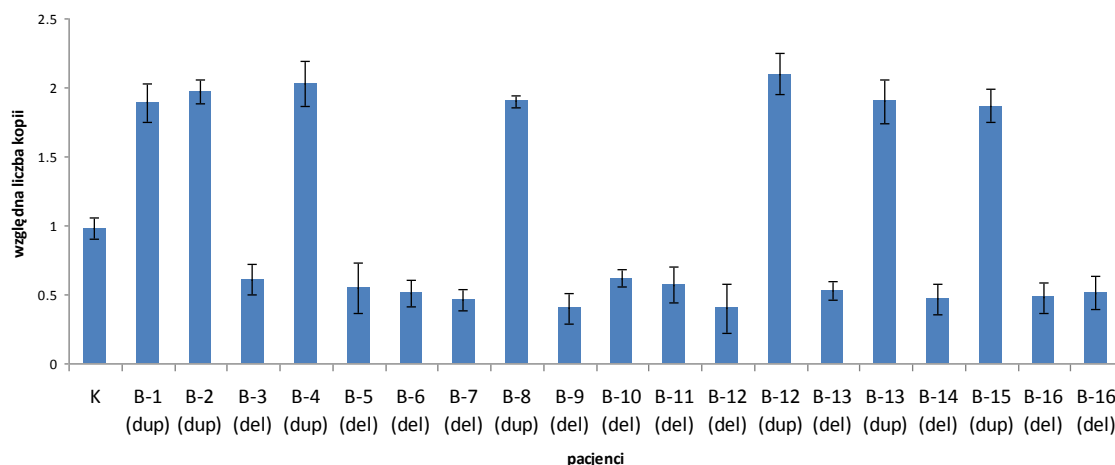
Pacjent	Region zmiany	Rodzaj zmiany	Rozmiar zmiany	Pochodzenie zmiany	Charakter zmiany
B-1	11q13.3-q13.4	duplikacja	170,6 kb	nz	nieznany
B-2	15q11.2	duplikacja	236,4 kb	<i>de novo</i>	polimorficzny
B-3	Xq21.1	delecja	170,1 kb	<i>de novo</i>	polimorficzny
B-4	5q31.2	duplikacja	1,99 Mb	nz	nieznany
B-5	16p13.3	delecja	1,93 Mb	nz	patogeny
B-6	22q11.21	delecja	2,99 Mb	nz	patogeny
B-7	1q43-1q44	delecja	2,00 Mb	nz	patogeny
B-8	15q26.3	duplikacja	250,4 kb	nz	nieznany
B-9	15q11.2	delecja	3,40 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-10	22q13.33	delecja	1,03 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-11	11q13.1	delecja	815,0 kb	<i>de novo</i>	nieznany
B-12	9p24.3-9p22.2	delecja	18,17 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-12	9p22.2-9p12	duplikacja	23,3 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-13	2q37.3	delecja	4,35 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-13	10p15.3-10p15.1	duplikacja	6,55 Mb	<i>de novo</i>	nieznany
B-14	16p11.2	delecja	1,16 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-15	22q11.21	duplikacja	2,46 Mb	<i>de novo</i>	patogeny
B-16	1q21.1	delecja	1,19 Mb	nz	patogeny
B-16	9q34.11-9q34.13	delecja	1,81 Mb	nz	nieznany

Legenda: nz – niezidentyfikowane pochodzenie aberracji

#### 4.3. Podsumowanie wyników

W pracy, łącznie analizowano 162 pacjentów z izolowaną oraz zespołową formą NI. U 21 pacjentów (12,9%) wykryto zmiany patogenne lub potencjalnie patogenne, w postaci 8 duplikacji i 15 delecji. Wszystkie zidentyfikowane zmiany u pacjentów oraz określenie ich nosicielstwa u rodziców, zostały potwierdzone metodą MLPA oraz qPCR. Weryfikacja zmian wykrytych u pacjentów za pomocą techniki qPCR, została przedstawiona na rycinie 23.





Ryc. 23. Wyniki badania qPCR. Porównanie względnej ilości kopii badanych regionów u pacjentów B-1 – B-16 do kontroli (K). Wartość 1 oznacza występowanie 2 kopii badanego regionu.

U 141 pacjentów nie wykryto żadnych zmian lub zmiany, które są polimorficzne i występują w populacji osób zdrowych. Krótka charakterystyka pacjentów z prawidłowymi wynikami przedstawiona jest w tabeli 11.

Tab.11. Charakterystyka pacjentów z prawidłowymi wynikami MLPA i aCGH/SNP-array

Pacjent	Płeć	Stopień NI	Cechy fenotypowe i behawioralne	Wykonane badania				
				Kariotyp	MLPA	SNP-array	aCGH	Inne
C-1	M	lekki	otyłość, duże małżowiny uszne, krótkie wędzidełko języka sucha skóra, zachowania autystyczne	46,XY	S	-	-	FMR1
C-2	K	lekki	duża i asymetryczna twarz, małogłowcie, małe małżowiny uszne, hirsutyzm, różnobarwność tęczy, brak koncentracji, padaczka	46,XX	S	-	-	-
C-3	K	umiarkowany	wydłużona twarz, wydatne czoło, szerokie kciuki i pierwsze palce, klinodaktylia V palców u rąk, hipoteloryzm, zez, oczopląs, opóźnienie rozwoju mowy, nadaktywność, agresja	46,XX	S	-	-	-
C-4	M	lekki	małogłowcie, skrócenie IV i V kości śródreżca, astygmatyzm, krótkowzroczność, słaba koordynacja motoryczna	46,XY	S	1M	-	FMR1
C-5	K	lekki	niskie czoło, długi nos, hirsutyzm, skóra marmurkowa, krótkie palce, niskorosłość, zez, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	M	-	-	-
C-6	M	lekki	małogłowcie, długi nos, długa, wydatna rynienka podnosowa, wydatne małżowiny uszne, krótkie palce, wnętrostwo, ADHD, opóźniony wiek kości, osteoporoza	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-7	M	umiarkowany	wnętrostwo, astygmatyzm, drgawki, padaczka	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-8	M	lekki	wnętrostwo prawostronne, nadciśnienie płucne, hiperteloryzm, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY,inv (9)(p11q12)	M	-	-	FMR1
C-9	M	lekki	gęste brwi, ciężka skolioza, małe stopy, opóźnienie wzrostu, astygmatyzm, niedosłuch	46,XY	M	-	-	-
C-10	K	znaczny	wysokie czoło, duży nos, skolioza, nadmierna potliwość, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	M	-	-	-
C-11	M	znaczny	duży nos, duże małżowiny uszne, delikatna	46,XY	S	-	-	FMR1

			skóra, duża elastyczność stawowa, skolioza, nadaktywność, agresja					
C-12	K	lekki	okrągła twarz, gęste i zrośnięte brwi, syndaktylia II i III palców u stóp	46,XX	M, S	-	-	-
C-13	M	umiarkowany	wysokie czoło, wydatne zęby siekacze, ginekomastia, wąska klatka piersiowa, nadaktywność, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-14	M	-	ostro zaznaczone linie brwi, długie rzęsy, małe usta, wąska nasada nosa, obustronny rozszczep, wargi i podniebienia, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	M, S	300k	-	-
C-15	K	lekki	długa twarz, wysokie czoło, arachnodaktylia, niedosłuch	46,XX	M, S	-	-	-
C-16	M	znaczny	częściowe zarośnięcie brwi, hiperteloryzm, mikrognacja, przykurcze w stawach kolanowych, opóźnienie rozwoju mowy, zachowania autystyczne, padaczka	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-17	M	umiarkowany	ginekomastia, odwrócone brodawki sutkowe, zdeformowane stawy kolanowe, zachowania autystyczne, autoagresja, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	M, S	300k	-	FMR1
C-18	K	umiarkowany	duża głowa, długie palce, klinodaktylia V palców u rąk, stereotypie ruchowe, sucha skóra, opóźnienie rozwoju mowy, brak koncentracji	46,XX	M, S	-	-	-
C-19	K	lekki	gęste brwi, przepuklina pachwinowa i pępkowa, krótkie stopy i palce, nadwzroczność, niedosłuch, nadaktywność	46,XX	S	-	-	-
C-20	M	lekki	nadwaga, duże oczy, duże małżowiny uszne, odwrócone brodawki sutkowe, duże stopy, płaskostopie	46,XY,inv (9)(p11q12)	S	-	-	FMR1
C-21	M	lekki	okrągła twarz, wydatne czoło, głęboko osadzone oczy, cienkie obrąbki uszu, skrócone V palce u rąk, brak koncentracji	46,XY	S	-	-	SNRPN
C-22	K	znaczny	długie palce u stóp, zachowania autystyczne, nadaktywność, agresja	46,XX	M, S	-	-	-
C-23	M	lekki	niskie czoło, hiperteloryzm, duże małżowiny uszne, pełne usta, wysokie podniebienie, szeroka nasada nosa, brachydaktylia, syndaktylia V palców u rąk, zez, opóźnienie rozwoju mowy, słaba koncentracja	46,XY	S	-	-	FMR1
C-24	M	lekki	duża i trójkątna głowa, duże małżowiny uszne, klinodaktylia V palców u rąk, opóźnienie rozwoju mowy, stereotypie ruchowe, nadaktywność, brak koncentracji	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-25	K	umiarkowany	skrócone palce II, III, IV u stóp, opóźnienie rozwoju mowy, ADHD	46,XX	M, S	-	-	FMR1
C-26	K	-	wada serca (AVSD), mikrognacja, pogrubiałe rysy twarzy, rzadkie rzęsy, niska i płaska nasada nosa, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	M, S	-	-	-
C-27	M	lekki	duże przednie ciemiączko, opóźnione zamknięcie ciemiączka, skolioza kręgów piersiowych, asymetria łopatek, zez, opóźnienie rozwoju mowy, nadaktywność	46,XY	M	-	-	FMR1
C-28	M	umiarkowany	poszerzenie aorty, głęboko osadzone oczy, częściowe zarośnięcie brwi, długi nos, skolioza, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	S	300k	-	FMR1
C-29	M	umiarkowany	bardzo długie rzęsy, dolichostenomelia, padaczka, drgawki, nadaktywność, agresja	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-30	M	lekki	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-31	K	-	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, drgawki, stereotypie ruchowe, zachowania autystyczne	46,XX	M, S	-	-	MECP2 SNRPN
C-32	K	znaczny	małogłowie, płaska twarz, pełne usta, nisko osadzone małżowiny uszne, długa rynienka podnosowa, brachydaktylia, obniżone napięcie mięśniowe, wada zgryzu	46,XX	M, S	-	-	-
C-33	M	-	hiperteloryzm, zmarszczki nakątne oczu, brak paznokci, zachodzące na siebie palce u stóp, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	M, S	300k	-	FMR1
C-34	K	lekki	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	M	-	-	-
C-35	K	lekki	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	S	-	-	-
C-36	M	lekki	agresja, nadaktywność	46,XY	M	-	-	FMR1

C-37	M	lekki	nadaktywność, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	FMR1
C-38	M	-	obustronna dysplazja stawów biodrowych, hiperteloryzm, wąska nasada nosa, krótka rynienka podnosowa, hipotonia krtani, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	FMR1 SNRPN
C-39	K	-	obniżone napięcie mięśniowe, nadwaga, migdałowe oczy	46,XX	M	-	-	SMN1
C-40	M	umiarkowany	dysplastyczne małżowiny uszne, szeroko rozstawione zęby, odwrócone nozdrza, opóźnienie rozwoju mowy, nadaktywność, zachowania autystyczne	46,XY	S	-	-	FMR1
C-41	K	-	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, zanik mózdzku w badaniu MRI	46,XX	M, S	-	-	-
C-42	M	lekki	wnętrostwo, lewostronna przepuklina pachwinowa, asymetryczne małżowiny uszne, gładka i długa rynienka podnosowa, duże ciemiączko, odwrócone brodawki sutkowe, mała moszna i prącie	46,XY	S	-	-	FMR1 SNRPN GJB2
C-43	K	lekki	wrodzona wada serca (VSD, ASD II), aplazja prawego kciuka, niedorozwój lewej małżowiny usznej z atreją zewn. kanału słuchowego, długa rynienka podnosowa, szeroki paluch u lewej stopy	46,XX	M, S	1M	-	-
C-44	M	lekki	małe pofalowane małżowiny uszne, niskie czoło, krzaczaste brwi, gładka rynienka podnosowa, duże oczy, niskorosłość, zez, astygmatyzm, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	M, S	-	-	PTPN1 1
C-45	M	umiarkowany	wada serca (VSD), spodziectwo, agenezja lewej nerki, płaska potylicy, wysokie czoło, duże małżowiny uszne, głęboko osadzone oczy, wysokie podniebienie, mikrognacja, ataksja	46,XY	M, S	300k	-	FMR1 SNRPN
C-46	K	głęboki	kamptodaktylia II palca u lewej stopy, afazja semantyczna, padaczka	46,XX	S	-	-	SNRPN
C-47	K	znaczny	obustronny rozszczep podniebienia, mikrognacja, syndaktylia II i III palców u stóp, głuchota przewodzeniowa	46,XX	M, S	-	-	-
C-48	M	-	wydłużenie esicy, miękka skóra, niedosłuch	46,XY	S	-	-	-
C-49	M	umiarkowany	obustronny rozszczep wargi i podniebienia, atreja kanału łzowego, skolioza, wada zgryzu, drgawki, mózgowie porażenie dziecięce	46,XY	M, S	-	-	FMR1 ARX
C-50	M	lekki	obniżone napięcie mięśniowe, wnetrostwo, syndaktylia II i III palców u stóp, klinodaktylia V palców u rąk, hiperteloryzm, wielkogłowcie, niestabilna postawa, agresja, irytacja	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-51	K	lekki	zez, krótkowzroczność, nadaktywność, agresja, wysoki próg bólu	46,XX	S	-	-	-
C-52	M	lekki	duża i trójkątna głowa, zapadnięta nasada nosa, małe małżowiny uszne, klinodaktylia V palców u rąk, opóźnienie rozwoju mowy, nadaktywność	46,XY,t(6;19)(q16.2;13.33)	M	-	-	FMR1
C-53	M	lekki	duże małżowiny uszne, hipoteloryzm, wydatna nasada nosa, mikrognacja, rzadkie włosy, napady śmiechu i płaczu, klaskanie w dłonie	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-54	K	lekki	bardzo długi język, skośne szpary powiekowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	M	-	135k	-
C-55	K	lekki	niskie czoło, długi nos, duże małżowiny uszne, niskorosłość, krótkie palce u rąk i stóp, niestabilna postawa, hirsutyzm, nadwzroczność, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	S	-	-	-
C-56	M	-	wrodzona wada serca, wydatna potylicy, wysokie czoło, hiperteloryzm, skośne szpary powiekowe, zapadnięta i szeroka nasada nosa, klinodaktylia V palców u rąk	46,XY	M	-	-	-
C-57	M	lekki	zapadnięta nasada nosa, długa rynienka podnosowa, częściowe zarośnięcie brwi, wydatne małżowiny uszne, małe prącie, zez, nadwzroczność, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY,inv(5)(q14.2q35.3)	S	-	-	FMR1
C-58	K	umiarkowany	asymetryczny nos, małe małżowiny uszne, szerokie kciuki, nadwzroczność, niedosłuch, ADHD, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	M, S	300k	-	-
C-59	K	umiarkowany	mikrognacja, krótkie palce u rąk, hirsutyzm, zarośnięcie brwi, zapadnięta nasada nosa,	46,XX	M, S	-	-	-

			nisko osadzone małżowiny uszne, długie rzęsy, małe ręce, sucha skóra, zwiększone napięcie mięśniowe, skolioza, opóźnienie rozwoju mowy					
C-60	M	głęboki	ponura twarz, długie rzęsy, skośne szpary powiekowe, długi nos, padaczka, opóźnienie rozwoju mowy, nadaktywność	46,XY	M	-	-	-
C-61	M	lekki	wysokie i szerokie czoło, skośne szpary powiekowe, długie rzęsy, szeroka rynienka podnosowa, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	M	-	-	-
C-62	M	lekki	syndaktylia II i III palców u stóp, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	FMR1
C-63	M	lekki	mikrognacja, nadwzroczność	46,XY	M	-	-	FMR1
C-64	M	lekki	owalna twarz, hiperteloryzm, szeroka nasada nosa z odwróconymi nozdrzami, długa rynienka podnosowa, duże małżowiny uszne, nadwzroczność	46,XY	M, S	-	-	-
C-65	M	lekki	mikrognacja, głęboko osadzone oczy, długie rzęsy, wysokie podniebienie, padaczka, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	S	-	-	-
C-66	M	lekki	mikrognacja, nadwzroczność	46,XY	S	-	-	-
C-67	M	-	wrodzona wada serca (VSD), dysplastyczne małżowiny uszne, wysokie podniebienie, mikrognacja, skóra marmurkowa, stopy końsko-szpotałe	46,XY	M	-	-	-
C-68	K	znaczny	zespół zaburzeń oddychania, niska linia włosów, grube włosy, ropnie skórne	46,XX	S	-	-	FMR1
C-69	K	lekki	mikrognacja, wada zgryzu, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	S	300k	-	-
C-70	M	-	hipoplazja lewej nerki, obniżone napięcie mięśniowe, małogłowie, pogrubione rysy twarzy, niskie czoło, płaska potylica, zez, nadaktywność, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	M	-	-	FMR1
C-71	M	-	małogłowie, zwiększone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	300k	-	-
C-72	M	lekki	zwiększone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju mowy, agresja, zachowania autystyczne	46,XY	S	-	-	FMR1
C-73	M	-	wnętrostwo, wielkogłowie, atrezja moczowodów, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	-
C-74	K	-	dysplastyczne małżowiny uszne, otyłość	46,XX	M, S	-	-	SNRPN
C-75	K	-	nadaktywność	46,XX	M, S	-	-	-
C-76	M	-	krótki i mały nos, wąskie wargi, padaczka, obniżone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju mowy, nadaktywność	46,XY	M, S	-	-	SNRPN
C-77	K	lekki	skośne szpary powiekowe, niebieskie twardówki, krótka i szeroka szyja, nadwzroczność, zmiany atopowe skóry, osteoporoza	46,XX,inv (9)(p11q1 3)	S	-	-	-
C-78	M	lekki	zwiększona elastyczność skóry, słaba koordynacja motoryczna, nadaktywność, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	S	-	-	FMR1
C-79	K	znaczny	głęboko osadzone oczy, wada zgryzu, dziwne ruchy rąk, nadaktywność, padaczka	46,XX	M	-	-	MECP2
C-80	M	umiarkowany	obustronna polidaktylia pozaosiowa, pogrubiałe rysy twarzy, hiperteloryzm, krótka rynienka podnoskowa, nadaktywność, agresja	46,XY	S	-	-	FMR1
C-81	M	znaczny	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	FMR1
C-82	M	lekki	wodogłowie, przepuklina pępowinowa, nisko osadzone małżowiny uszne, hiperteloryzm, wielkogłowie, wada zgryzu, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, brak uwagi	46,XY	S	-	-	FMR1
C-83	K	lekki	zapadnięta nasada nosa, makroglosja, krótka rynienka podnoskowa, duże małżowiny uszne, zapadnięta klatka piersiowa, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	S	-	-	-
C-84	K	-	asymetryczna twarz, mikrognacja, nisko osadzone dysplastyczne małżowiny uszne, obustronne wady dłoni, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	M, S	-	-	-
C-85	M	lekki	zmiany naczyńniowe na twarzy i plecach	46,XY	S	-	-	FMR1
C-86	M	lekki	mózgowe porażenie dziecięce, skośne szpary	46,XY	S	1M	-	FMR1

			powiekowe, łukowate brwi, długi nos, gładka rynienka podnoskowa, mikrognacja, opóźnienie rozwoju mowy					
C-87	K	-	wąska nasada nosa z odwróconymi nozdrzami, krótkie szpary powiekowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, agresja	46,XX	S	300k	-	-
C-88	M	lekki	wielkogłowie, wydatne czoło, głęboko osadzone oczy, duże małżowiny uszne, hiperteloryzm, szeroka nasada nosa, wnetrostwo, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	M	-	-	-
C-89	M	lekki	wysokie czoło, mikrognacja, duże małżowiny uszne, szeroka nasada nosa, płaska potylicza, obniżone napięcie mięśniowe, brak koncentracji, nadaktywność	46,XY	M	-	-	FMR1
C-90	M	lekki	wnetrostwo, obniżone napięcie mięśniowe, mała twarz, małe wargi, niska linia włosów, małe małżowiny uszne	46,XY	M	-	-	FMR1
C-91	M	lekki	zachowania autystyczne	46,XY	S	300k	-	-
C-92	K	-	wrodzona wada serca, szeroko rozstawione brodawki sutkowe, ptoza, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	S	-	-	-
C-93	M	-	duże małżowiny uszne, szeroka nasada nosa z odwróconymi nozdrzami, wodniaki jąder, długie rzęsy, obniżone napięcie mięśniowe, nadaktywność, opóźnienie rozwoju mowy, zachowania autystyczne	46,XY,inv(9)(p12q13)pat	M, S	-	-	-
C-94	M	lekki	głęboko osadzone oczy, duże małżowiny uszne, wysoka nasada nosa, brak koncentracji	46,XY	S	-	-	FMR1
C-95	M	lekki	asymetryczna twarz, dysplastyczne małżowiny uszne, długie palce u rąk, skóra marmurkowa, niestabilna postawa ciała, brak koncentracji	46,XY	M	-	-	FMR1
C-96	M	lekki	krótkie wędzidełko języka, krótkie i cienkie palce, ADHD, irytacja	46,XY	S	-	-	FMR1
C-97	M	lekki	płaska klatka piersiowa, ADHD, irytacja	46,XY	M	-	-	FMR1
C-98	K	lekki	wrodzona wada serca (ASDII), sucha skóra	46,XX,inv(9)(p11;q21.2)	M, S	300k	-	-
C-99	M	-	wrodzony ubytek tęczówki, wąskie wargi, zez, syndaktylia II i III palców u stóp, padaczka, obniżone napięcie mięśniowe	46,XY	S	-	-	-
C-100	K	lekki	hiperteloryzm, prognatyzm, syndaktylia II i III palców u stóp, niedosłuch, zez, krótka rynienka podnosowa	46,XX	S	-	135k	-
C-101	K	lekki	syndaktylia II, III, IV palca u prawej stopy	46,XX	S	-	-	-
C-102	K	znaczny	padaczka	46,XX	S	-	-	-
C-103	K	umiarkowany	szeroka nasada nosa, długa rynienka podnosowa, encefalopatia, drgawki, zez, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	M, S	300k	-	ARX MECP2 SNRPN
C-104	M	znaczny	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	-	1M	-	FMR1
C-105	K	lekki	-	46,XX	-	1M	-	-
C-106	M	umiarkowany	przetoka skrzelowa	46,XY	-	300k	-	-
C-107	K	-	małe wargi, płaska potylicza, długa rynienka podnosowa, sucha skóra, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	-	300k	-	-
C-108	K	umiarkowany	mózgowe porażenie dziecięce, zmarszczki nakątne oka, zez, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	-	300k	-	SNRPN
C-109	M	-	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY,t(X;2)(p11.1;q37.3)mat	-	300k	-	FMR1
C-110	M	-	wydatne czoło, hiperteloryzm, nisko osadzone małżowiny uszne, zwiększone napięcie mięśniowe, autoagresja, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	-	300k	-	-
C-111	M	-	wydłużona twarz, wysokie czoło, płaska potylicza, wysokie i wąskie podniebienie, duże małżowiny uszne, długa rynienka podnosowa, wnetrostwo, syndaktylia II, III, IV palców u stóp, mikrognacja, szeroko rozstawione brodawki sutkowe	46,XY	-	300k	-	DHCR 7
C-112	K	-	nisko osadzone małżowiny uszne, zrotowane ku tyłowi, niska nasada nosa z odwróconymi nozdrzami, mikrognacja, nadaktywność	46,XX	-	300k	-	-

C-113	K	-	roszczep podniebienia, zanik ciała modelowatego, hipoplazja pnia mózgu	46,XX,t(3;17)(p21.3;q21.3)	-	300k	-	-
C-114	M	-	wnętrostwo, przepuklina pępkowa i pachwinowa, wielkogłowie, wodogłowie, hiperteloryzm, niska nasada nosa, wydurna czerwien wargowa, mikrognacja, nisko osadzone małżowiny uszne, mały nos, obniżone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	-	300k	-	GPC3
C-115	M	lekki	zachowania autystyczne, stereotypie ruchowe, nadaktywność	46,XY	-	300k	-	FMR1
C-116	M	głęboki	ptoza, głęboko osadzone oczy, krótka rynienka podnosowa, duże i dysplastyczne małżowiny uszne, cienka czerwien wargowa, wysokie czoło, brachydaktylia, szerokie paluchy, stereotypie ruchowe	46,XY	-	300k	-	-
C-117	M	znaczny	syndaktylia III i IV palców u dłoni, mikrognacja, agenezja lewej nerki, atrezja przelyku, niedorozwój moszny, brak jąder, długie rzęsy, zez, oczopląs, hirsutyzm	46,XY	-	300k	-	-
C-118	M	-	długie palce u dłoni i stóp, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, zachowania autystyczne	46,XY,t(4;14)(q27;q22)	-	300k	-	-
C-119	K	lekki	obniżone napięcie mięśniowe, częściowa syndaktylia III, IV, V palców u stóp, padaczka, ataksja, astygmatyzm	46,XX	-	-	135k	RSK2
C-120	M	-	wydurna czoło, hiperteloryzm, płaska nasada nosa z odwróconymi nozdrzami, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, nadaktywność	46,XY,t(1;3)(p35.2;p14.2)mat	-	-	135k	FMR1
C-121	M	lekki	duże i dysplastyczne małżowiny uszne, nadaktywność	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-122	M	-	nisko osadzone małżowiny uszne, hiperteloryzm, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	FMR1
C-123	M	lekki	wąska nasada nosa z odwróconymi nozdrzami, krótkie szpary powiekowe, syndaktylia II i III palców u stóp	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-124	M	-	obniżone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	M, S	-	-	FMR1
C-125	M	lekki	nisko osadzone małżowiny uszne, hiperteloryzm, wielkogłowie, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, nadaktywność	46,XY	M	-	-	FMR1
C-126	K	lekki	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	M	-	-	-
C-127	K	lekki	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	S	-	-	-
C-128	M	-	wydurna czerwien wargowa, nisko osadzone małżowiny uszne, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	S	-	-	FMR1
C-129	M	lekki	opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	-	1M	-	FMR1
C-130	K	lekki	-	46,XX	-	1M	-	-
C-131	M	lekki	małogłowie, zwiększone napięcie mięśniowe, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	-	300k	-	FMR1
C-132	K	znaczny	niskie czoło, krótki nos, szerokie kciuki i palce, wystający język, niedobór masy ciała, skóra marmurkowa, zachowania autystyczne, napady agresji	46,XX	S	1M	-	-
C-133	M	-	nisko osadzone uszy, kraniosynostoza, spodziectwo, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XY	-	1M	-	FMR1 FGFR2
C-134	M	umiarkowany	wydłużona głowa, długa rynienka podnosowa, cienka górna warga, zapadnięta nasada nosowa, niewyraźna mowa, nadaktywność	46,XY	S	1M	-	FMR1
C-135	M	lekki	płaska potylicza, wysokie czoło, oczy głęboko osadzone, szpary powiekowe lekko skośne ku górze, długi nos, klinodaktylia V palców u dłoni, opóźnienie rozwoju mowy	46,XY	S	1M	-	FMR1
C-136	K	lekki	wysokie czoło, nisko osadzone, dysplastyczne małżowiny uszne, pełne usta, wysokie podniebienie, skrócone wędzidełko języka, szeroki nos z odwróconymi nozdrzami, klinodaktylia V palców u dłoni, opóźnienie rozwoju mowy	46,XX	-	1M	-	-
C-137	M	lekki	zmarszczki nakątne oczu, duże małżowiny uszne, wydurna guzy czołowe, wielkogłowie,	46,XY	S	1M	-	FMR1 SNRPN

			wysokie podniebienie, otyłość, małe prącie, opóźnienie rozwoju mowy					
C-138	M	znaczny	małogłowie, gęste owłosienie, niskie czoło, krótka rynienka podnosowa, duży i długi nos, krótkie palce u dłoni i stóp, niskorosłość, wąska obręcz barkowa, zez, obniżone napięcie mięśniowe, drgawki, przedwczesne dojrzewanie płciowe	46,XY	-	1M	-	FMR1
C-139	K	lekki	małogłowie, asymetryczna twarz, zwiększone napięcie mięśniowe, szpary powiekowe skierowane skośnie ku dołowi, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego	46,XX	-	1M	-	-
C-140	M	głęboki	zrotowane obrąbki uszu, szeroka nasada nosa, kamptodaktylia II palców u lewej stopy, zmarszczki nakątne oczu, hiperteloryzm, nadaktywność	46,XY	-	1M	-	FMR1 SNRPN
C-141	K	głęboki	kamptodaktylia II palców u lewej stopy, padaczka, afazja, nadaktywność, wybuchy radości	46,XX	-	1M	-	SNRPN

**Legenda:** K – kobieta, M – mężczyzna, M - badanie MLPA w kierunku znanych zespołów mikrodelecji, S – badanie MLPA w kierunku rearanżacji regionów subtelomerowych, FMR1 – badanie mutacji dynamicznej w genie *FMR1* (zespół FraX), SNRPN – test metylacji locus SNRPN (zespół Pradera-Willi'ego/Angelmana), PTPN11 – badanie sekwencji kodującej genu *PTPN11* (zespół Noonan), ARX – badanie duplikacji 24 pz genu *ARX*, FGFR2 – badanie sekwencji kodującej genu *FGFR2*, RSK2 – badanie sekwencji kodującej genu *RSK2* (zespół Coffina-Lowry'ego), GPC3 – badanie sekwencji kodującej genu *GPC3* (zespół Simpsona-Golabi-Behmel), DHCR7 - badanie sekwencji kodującej genu *DHCR7* (zespół Smitha-Lemli'ego-Opitza), SMN1 – badanie delecji w genie *SMN1* (rdzeniowy zanik mięśni), GJB2 – badanie mutacji w genie *GJB2* (głuchota wrodzona), MECP2 – badanie mutacji w genie *MECP2* (zespół Retta)

U wszystkich pacjentów łącznie wykonano 228 badań molekularnych. Ich zestawienie ilościowe zostało przedstawione w tabeli 12.

Tab.12. Liczbowy wykaz badań przeprowadzonych u pacjentów z NI

Rodzaj badania	Liczba wykonanych badań
MLPA (zespoły mikrodelecji/mikroduplikacji)	69
MLPA (rearanżacje regionów subtelomerowych)	96
SNP-array	58
aCGH	5
<b>Łącznie</b>	<b>228</b>

## 5 Dyskusja

Identyfikacja podłoża genetycznego NI umożliwia określenie sposobu dziedziczenia choroby, a co za tym idzie, pozwala określić ryzyko wystąpienia choroby u pozostałych członków rodziny. Dlatego też poznanie genetycznych przyczyn NI jest kluczowym elementem pozwalającym udzielić rzetelnej i wiarygodnej porady genetycznej osobom chorym oraz ich rodzinom. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badań byli konsultowani w Poradni Genetycznej. W związku z tym, dobór odpowiedniej diagnostyki był uzależniony od przeprowadzonego wywiadu rodzinnego oraz cech klinicznych pacjenta. Zastosowany w tej pracy algorytm diagnostyczny wykazał, że wiele spośród zmian wykrytych u pacjentów z NI, to aberracje submikroskopowe (12,9%). Indywidualnego komentarza wymagają rearanżacje uzyskane u poszczególnych pacjentów. Dlatego też ich omówienie przedstawiono poniżej, osobno dla każdego z nich.

### 5.1 Badania MLPA

#### Pacjentka A-1

Z uwagi na zaburzenia zachowania, opóźnienie mowy oraz stereotypie ruchowe u dziewczynki przeprowadzono diagnostykę molekularną w kierunku zespołu Retta, badając sekwencję kodującą genu *MECP2*. Wobec braku potwierdzenia podejrzenia klinicznego, wykonano badanie w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji. U dziewczynki stwierdzono heterozygotyczną delecję regionu 1p36. Zespół delecji 1p36 jest bardzo dobrze poznanym zespołem mikrodelecyjnym. Większość dzieci z zespołem delecji 1p36 cechuje się opóźnionym rozwojem psychomotorycznym. Dzieci te później niż zdrowe siadają i mówią. Stopień NI zależy od wielkości wykrytej delecji. Są doniesienia mówiące, że istnieje związek między rozmiarem delecji a możliwościami intelektualnymi pacjenta, jakkolwiek teoria ta nie została jeszcze udowodniona i wymaga dalszych badań [135]. Co ważne, dziewczynka prezentuje cechy, które są charakterystyczne dla innych pacjentów z zespołem delecji 1p36. Cechy te są przedstawione w tabeli 13 wraz z częstością ich występowania.



Biorąc pod uwagę fakt, że delecja powstała *de novo* (co zdarza się w większości przypadków zespołu delecji 1p36) oraz kilka cech fenotypowych pacjentki A-1 jest tożsamy z tymi, które są opisywane w zespole delecji 1p36, można stwierdzić, że wynik badania MLPA jednoznacznie wskazuje przyczynę NI oraz innych wad wrodzonych u pacjentki.

Tab.13. Porównanie cech fenotypowych i behawioralnych pacjentki A-1, charakterystycznych dla zespołu delecji 1p36, z częstością ich występowania u innych pacjentów (za [135])

Cechy fenotypowe i behawioralne	Częstość występowania cechy u pacjentów z delecją 1p36
słaby rozwój mowy	brak danych
klinodaktylia V palców dłoni	64%
niedobór masy ciała i wzrostu	85%
opóźnienie psychoruchowe	92%
anomalie ośrodkowego układu nerwowego w MRI/TK	18%
zachowania autystyczne	brak danych

## Pacjent A-2

U pacjenta stwierdzono heterozygotyczną delecję 22q11.2, znaną jako przyczyna zespołu DiGeorge'a. Delecja obejmuje region krytyczny zawierający kluczowe geny: *TBX1*, *COMT*, *PRODH*, *HIRA*. Po porodzie u pacjenta stwierdzono wrodzoną wadę serca pod postacią zwężenia zastawki aorty. Według piśmiennictwa u około 80% pacjentów z delecją 22q11.2 występuje wrodzona wada serca [106]. U pacjenta zdiagnozowano także NI i niedobór hormonu wzrostu. Poza wadą serca, NI oraz niedoborem hormonu wzrostu, u mężczyzny nie zaobserwowano innych objawów typowych dla zespołu DiGeorge'a. Jednakże obraz kliniczny choroby jest na tyle zmienny, że nawet w obrębie tej samej rodziny często obserwuje się wielką zmienność fenotypu. Do tej pory sądzono, że zmienność ta spowodowana jest rozmiarem delecji, lecz w miarę rozwoju technik molekularnych okazało się, że osoby z taką samą delecją wykazują bardzo dużą zmienność objawów. Niektórzy mogą posiadać niewielkie cechy dysmorficzne twarzy, podczas gdy inni będą mieć złożone wady serca, niedobory odporności itd. [100]. Przypuszcza się, iż obraz kliniczny choroby modyfikowany jest także poprzez ekspresję

innych genów znajdujących się w regionie delecji 22q11.2 lub w innych chromosomach, a także ich mutacje punktowe.

Wykryta delecja u pacjenta nie jest obecna u jego zdrowego ojca, natomiast matka pacjenta nie żyje, co nie pozwala jednoznacznie stwierdzić pochodzenia zmiany. Jednakże według piśmiennictwa 90-95% delecji w zespole DiGeorge'a powstaje *de novo* [131,154]. Wobec tak wysokiej częstości powstawania delecji 22q11.2 *de novo* jest wysoce prawdopodobnym, że zmiana jest przyczyną nieprawidłowego fenotypu pacjenta.

### **Pacjent A-3**

Badanie MLPA u pacjenta wykazało obecność heterozygotycznej delecji 7q11.23, która obejmuje region około 1,5 Mb i stanowi potwierdzenie klinicznego rozpoznania zespołu Williamsa. Zmiana ma charakter *de novo* a u pacjenta obecne są typowe cechy dla zespołu Williamsa takie jak: opóźniony rozwój psychomotoryczny, nadzastawkowe zwężenie aorty, niedobór wzrostu, mały zadarty nos, wydłużona rynienka podnosowa, wydatne wargi oraz niebieskie, gwiazdziste tęczówki. Mikrodelecje 7q11.23 są najczęściej spowodowane nierówną rekombinacją (ang. *crossing-over*) między homologicznymi chromatydami 7 chromosomu podczas mejozy [6,48]. U 60% pacjentów z zespołem Williamsa zmiana jest pochodzenia matczynego, a u 40% ojcowskiego. W regionie krytycznym, ulegającym delecji jest prawie 30 genów [119]. Jednakże funkcja większości z nich nie została do tej pory poznana. Do najlepiej poznanych należą: *ELN*, *LIMK1*, *FZD3* oraz *WSCR1*. Geny *LIMK1*, *FZD3* i *WSCR1* wykazują aktywność w mózgu, co oznacza, że mogą wpływać na jego rozwój i funkcje. Gen elastyny (*ELN*) odpowiada za budowę tkanki łącznej i zapewnia elastyczność wielu narządów i tkanek, dlatego delecja tego genu odpowiada za występowanie charakterystycznego fenotypu twarzy oraz zmian naczyniowych. Gen elastyny ulega delecji w większości przypadków zespołu (95%) [5,46].

Biorąc pod uwagę całość obrazu chorobowego, wykonanych badań diagnostycznych oraz charakter *de novo* zmiany, stwierdzane u dziecka nieprawidłowości rozwojowe wynikają z mikrodelecji w regionie chromosomowym 7q11.23.

### **Pacjentka A-4**

U pacjentki wykryto heterozygotyczną delecję sekwencji subtelomerowych na ramieniu krótkim chromosomu 4 (4p). U większości pacjentów rearanżacje regionów

subtelomerowych nie charakteryzują się konkretnym fenotypem. Jednakże w tym przypadku delecja 4p manifestuje się znanymi już cechami klinicznymi, opisywanymi w piśmiennictwie jako zespół Wolfa-Hirschhorna (WHS). Delecja obejmuje region krytyczny (165 kb) obejmujący gen *WHSC1*. U wszystkich pacjentów z zespołem WHS występuje NI. U pacjentki stwierdzono ponadto niskorosłość, która występuje u około 76% pacjentów z WHS a także wady budowy narządów płciowych zewnętrznych (przerost łechtaczki) obecne u 64% pacjentów. U kobiety obecne są także napady padaczkowe, opisywane u 47% pacjentów z WHS oraz obniżone napięcie mięśniowe [15]. Pacjentka nie ma obciążonego wywiadu rodzinnego, ale w około 80% przypadków przyczyną choroby jest delecja *de novo*, w pozostałych przypadkach choroba jest efektem nosicielstwa translokacji zrównoważonej u jednego z rodziców [17].

Biorąc pod uwagę powyższe cechy dysmorfii występujące u pacjentki, głęboką NI oraz pochodzenie *de novo* zmiany, należy sądzić, że ma ona charakter patogeny.

### **Pacjent A-5**

U pacjenta wykryto heterozygotyczną duplikację sekwencji subtelomerowych na ramieniu krótkim chromosomu 19 (19p). Rearanżacje regionów subtelomerowych są stwierdzane u 3-8% pacjentów z idiopatyczną NI. Dla większości rearanżacji subtelomerowych charakterystyczny obraz kliniczny pozostaje niewyjaśniony [40]. Początkowo, prezentowane przez pacjenta cechy kliniczne (opóźniony rozwój psychomotoryczny, obniżone napięcie mięśniowe, charakterystyczne cechy dysmorfii twarzy oraz słaby przyrost masy ciała w okresie niemowlęcym), sugerowały zespół Pradera-Willi'ego. Jednakże wykonano test metylacji *locus SNRPN*, otrzymując prawidłowy wynik. Duplikacja 19p jest niezwykle rzadką aberracją submikroskopową. W piśmiennictwie opisano zaledwie kilka przypadków duplikacji 19p, najczęściej wraz z innymi współtowarzyszącymi aberracjami. Natomiast tylko u jednego pacjenta opisanego przez Andries i wsp. stwierdzono izolowaną duplikację 19p bez współwystępowania innych zmian genetycznych [8]. Porównanie cech dysmorfii pacjenta A-5 z opisanym wcześniej przypadkiem przedstawiono w tabeli 14. Należy zauważyć, że nie ma wyraźnych cech fenotypowych, które można by uznać za typowe dla duplikacji 19p. Właściwie jedyną cechą wspólną jest opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. W rodzinie pacjenta nie stwierdzono wad wrodzonych ani chorób genetycznych, a wykryta zmiana ma charakter *de novo*.

Zbieżność cech fenotypowych prezentowanych przez pacjenta A-5 i innego pacjenta z duplikacją 19p oraz brak duplikacji u rodziców chłopca, pozwala uznać ją za patogenną.

Tab.14. Porównanie cech dysmorfii pacjentów z duplikacją 19p (za [8], zmienione)

Cechy fenotypowe i behawioralne	Andries i wsp.	Pacjent A-5
<b>opóźnienie psychomotoryczne</b>	+	+
krótki nos	+	
nozdrza skierowane ku przodowi	+	
małożuchwie		+
<b>nisko osadzone małżowiny uszne</b>	+	+
obniżone napięcie mięśniowe		+
płaska nasada nosa		+
wąskie szpary powiekowe		+
skośno-górne ustawienie szpar powiekowych		+
kąciki ust skierowane ku dołowi		+

**Legenda:** + obecność cechy

Zastosowanie techniki MLPA u 125 pacjentów z idiopatyczną NI oraz innymi wadami wrodzonymi, pozwoliło na wyjaśnienie przyczyn tych zaburzeń u 4% badanych. Wszyscy pacjenci zbadani metodą MLPA wykazywali opóźnienie rozwoju psychomotorycznego i/lub NI. Obciążony wywiad rodzinny występował tylko w jednym przypadku. Po urodzeniu, wrodzone wady rozwojowe obserwowano u wszystkich pacjentów (hipoplazja przysadki, zwężenie zastawki aorty, wnętrostwo, przepuklina mosznowa, hipoplazja nerki, refluks pęcherzowo-moczowodowy, przetoka ślinowa). Padaczka była obserwowana u 1 pacjentki. Również u 1 pacjentki występował znacznie opóźniony rozwój mowy. Problemy endokrynologiczne (hipoplazja przysadki, hipopituitarizm) stwierdzono u 2 pacjentów. W badaniu przedmiotowym wszyscy pacjenci prezentowali cechy dysmorfii, które były w większości przypadków dyskretne lub umiarkowanie nasilone. Tylko u 1 pacjenta nieznane jest pochodzenie wykrytej zmiany. W pozostałych przypadkach zmiany miały charakter *de novo*. Uzyskane wyniki badań wskazują, że najczęstszą stwierdzaną mikroaberracją chromosomową u pacjentów z wadami wrodzonymi i NI są rearanżacje końcowych fragmentów chromosomów (aberracje subtelerowe 4p, 19p oraz 1p36), co stanowi 60% wszystkich wykrytych

aberracji metodą MLPA. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów [93].

Dzięki badaniom MLPA udowodniono skuteczność tej techniki w diagnostyce znanych zespołów mikrodelecji, takich jak zespół delecji 1p36, zespół Williamsa, DiGeorge'a, Wolfa-Hirschhorna lub rearanżacji regionów subteleromowych. Według danych z piśmiennictwa aplikacja techniki MLPA w grupie chorych z niepełnosprawnością intelektualną, wadami rozwojowymi oraz cechami dysmorfii umożliwia ustalenie rozpoznania dodatkowo u 2-6% pacjentów przy jednoczesnej specyficzności techniki MLPA [1]. Niejednokrotnie problemy w diagnostyce zespołów genetycznych wynikają przede wszystkim z braku wiedzy o tym, jaki region genomu i/lub jakie geny odpowiedzialne są za cechy kliniczne stwierdzane u pacjentów. Doskonałym przykładem badawczym do tego typu poszukiwań są submikroskopowe aberracje chromosomowe, które zawierają niewiele genów, co umożliwia w wielu przypadkach odniesienie ich funkcji do określonych cech fenotypowych pacjenta. Tak też jest w zespołach mikrodelecji/mikroduplikacji, w których znane są geny, przyczyniające się do nieprawidłowego fenotypu pacjentów. Dość niski procent wykrytych zmian patogennych w badaniu MLPA (4%), wskazuje na główną wadę tej metody, jaką jest ograniczona liczba mikroaberracji chromosomowych możliwych do wykrycia w pojedynczej reakcji. Jednakże koszt przeprowadzenia badania MLPA jest dużo mniejszy, niż w przypadku metod SNP-array/aCGH.

## **5.2 Badania SNP-array/aCGH**

### **Pacjent B-1**

U chłopca wykryto interstycjalną duplikację ramienia długiego chromosomu 11 (region 11q13.3-q13.4) o wielkości 170,6 kb. Za patogennością powyższej zmiany przemawia fakt, że w obszarze duplikacji znajduje się część genu *SHANK2*. Gen ten ulega silnej ekspresji w neuronach, a jego produkty odgrywają decydującą rolę w powstawaniu i stabilizowaniu synaps. Mutacje *SHANK2* zaobserwowano u pacjentów z autyzmem, NI oraz schizofrenią. Również pacjent B-1 wykazuje zachowania autystyczne, jednak w piśmiennictwie opisywane są głównie delecje genu *SHANK2* i brakuje doniesień opisujących identyczną lub podobną duplikację [18]. Wielkość zmiany może wskazywać

na jej łagodny charakter i brak znaczenia klinicznego. Z drugiej jednak strony, baza danych DGV (ang. *Database of Genomic Variants*) nie wskazuje tego regionu jako miejsca polimorficznego, obecnego u osób zdrowych. Tak więc nie ma jednoznacznych doniesień mówiących o jej patogenności, jak również jej łagodnym charakterze. Niestety nieznane jest pochodzenie wykrytej zmiany, gdyż nie było możliwości przeprowadzenia badania nosicielstwa duplikacji u rodziców chłopca.

### **Pacjent B-2**

U pacjenta zidentyfikowano duplikację w obrębie długiego ramienia chromosomu 15 (15q11.2), o wielkości 236,4 kb. Zmiana ta powstała *de novo*. W regionie mikroduplikacji wykrytej u pacjenta znajduje się gen *UBE3A*, którego mutacje są przyczyną zespołu Angelmana. Produkt tego genu – ligaza ubikwitynowa, jest odpowiedzialny za wskazanie wybranych białek do degradacji poprzez ich ubikwitynację. Gen *UBE3A* jest genem podlegającym piętnowaniu rodzicielskiemu i ulega ekspresji tylko w mózgu z allelu matczynego, natomiast ojcowska kopia pozostaje wyciszona [148]. Przeprowadzone badania na modelu mysim wskazują, że zwiększona dawka genu *UBE3A* podnosi poziom serotoniny i dopaminy, a co za tym idzie, może prowadzić do autyzmu lub zachowań autystycznych [4,140]. U pacjenta nie zaobserwowano zachowań autystycznych, a poza lekkim stopniem NI nie ma on żadnych cech fenotypowych wskazujących na zespół Angelmana. Należy jednak zaznaczyć, że w rodzinie chłopca występują przypadki autyzmu. W piśmiennictwie odnotowano duplikacje genu *UBE3A* u innych pacjentów, natomiast regiony objęte tą zmianą są o wiele większe i zawierają także inne geny mogące wpływać na fenotypy opisywanych pacjentów. Co więcej, de Smith i wsp. w badaniach przeprowadzonych w grupie 50 zdrowych osób, stwierdzili u 2 osób duplikację tego regionu [140]. Zatem wykryta duplikacja prawdopodobnie jest wariantem polimorficznym.

### **Pacjentka B-3**

U pacjentki wystąpiła delecja *de novo* w chromosomie X (Xq21.1), o wielkości 170,1 kb. Delecja obejmuje gen *ATRX*, który koduje helikazę. Białko to zaangażowane jest w szereg procesów dotyczących DNA takich jak rekombinacja, naprawa czy regulacja transkrypcji [54]. Mutacje genu *ATRX* prowadzą do zespołu ATR-X (zespół alfa talasemia-NI o dziedziczeniu sprzężonym z chromosomem X, ang. *Alpha thalassaemia-*

*mental retardation, X linked*) – rzadkiej choroby uwarunkowanej genetycznie. Fenotyp ATR-X jest bardzo zmienny. Na obraz kliniczny zespołu składa się wiele różnorodnych cech. Sposób dziedziczenia tej choroby nie wskazuje na to by pacjentka była chora na zespół ATR-X. Należy jednak wspomnieć, że kobieta ma brata, który jest również niepełnosprawny intelektualnie w stopniu znacznym oraz posiada bardzo podobne cechy fenotypowe. Przeprowadzone badanie qPCR nie wykazało jednak u niego delecji genu *ATRX*. Wobec powyższego, wykryta zmiana u pacjentki najprawdopodobniej nie ma znaczenia klinicznego. W kolejnym etapie diagnostyki należałoby wykonać sekwencjonowanie eksomu (wszystkich odcinków kodujących w DNA). Być może przyczyną NI oraz cech dysmorfii u pacjentki są mniejsze zmiany w DNA.

#### **Pacjent B-4**

U pacjenta wykryto duplikację w chromosomie 5, o wielkości 1,99 Mb. Ze względu na brak dostępności rodziców do przeprowadzenia badania, pochodzenie zmiany jest nieznane. W obszarze wykrytej duplikacji zlokalizowanych jest około 30 genów. Większość z nich to geny, których funkcji nie można powiązać z cechami dysmorfii u pacjenta lub ich rola nie jest jeszcze poznana albo które nie kodują białek. Dlatego też według dotychczasowej wiedzy trudno jest im przypisać jakikolwiek udział w patogenezie NI oraz innych cech występujących u pacjenta. Na uwagę zasługuje gen *SILI*, którego mutacje prowadzą do zespołu Marinesco-Sjogren (MSS; ang. *Marinesco-Sjogren Syndrome*). Zespół charakteryzuje się miopatią, atrofią i ataksją mózdkową, zaćmą oraz NI [9].

Biorąc pod uwagę, że u chłopca poza NI nie występują żadne z powyższych objawów oraz fakt, że w piśmiennictwie medycznym nie odnotowano patogennego charakteru duplikacji genu *SILI*, nie można jednoznacznie określić charakteru wykrytej zmiany. Ponadto u siostry pacjenta, również wykazującej opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, nie stwierdzono powyższej duplikacji. Być może przyczyną NI u obojga rodzeństwa jest inna zmiana w materiale genetycznym, nie wykryta zastosowanymi metodami. Istnieje także możliwość obecności zupełnie różnych mutacji u obojga rodzeństwa. Na potencjalnie patogenny charakter duplikacji u pacjenta może wskazywać jej wielkość, tj. prawie 2 Mb, brak obecności zmiany u rodziców oraz niewystępowanie podobnej zmiany w populacji osób zdrowych (wg bazy danych DGV).

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników badań genetycznych u pacjenta B-4 nie można jednoznacznie określić podłoża NI oraz współistniejących wad.

### **Pacjent B-5**

U pacjenta zidentyfikowano delecję w chromosomie 16 o wielkości 1,93 Mb. Zmiana ma nieznaną pochodzenie ze względu na brak dostępności rodziców chłopca do badania. W regionie wykrytej zmiany zlokalizowanych jest kilkanaście genów. Gen *A2BPI* koduje białko wiążące się z produktem genu *ATXN2*, którego mutacje dynamiczne prowadzą do ataksji rdzeniowo-mózdkowej. Wskazuje to, iż gen *A2BPI* może uczestniczyć w patogenezie zaburzeń neurologicznych [136]. Natomiast Martin i wsp. zaproponowali gen *A2BPI* jako kandydujący w rozwoju autyzmu [98]. Kolejnym genem mogącym mieć związek z NI jest gen *ROGDI*. Mutacje w tym genie są przyczyną zespołu Kohlschuttera-Tonza (KTZS; ang. *Kohlschutter-Tonz Syndrome*). Zespół ten charakteryzuje się ciężkim opóźnieniem rozwoju, drgawkami oraz spastycznością i związany jest z dużo cięższym fenotypem, niż jest obserwowany u pacjenta. Poza tym w zespole KTZS nie występuje opóźnienie rozwoju mowy, a pacjent ma kłopoty z artykulacją [39]. Na uwagę zasługuje też gen *ALGI*, ponieważ defekty w nim prowadzą do wrodzonych zaburzeń glikozylacji (CDGs; ang. *Congenital disorders of glycosylation, type I*). Choroba cechuje się opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego oraz NI [73].

Doniesienia piśmiennictwa na temat zaangażowania wyżej wymienionych genów w patogenezę zaburzeń neurologicznych, mogą wskazywać, iż ich delecje mogą być przyczyną NI u pacjenta. Ponadto wielkość zmiany oraz brak występowania aberracji w tym regionie w populacji osób zdrowych (wg bazy DGV), sugeruje patogenny charakter wykrytej delecji.

### **Pacjentka B-6**

U pacjentki wykryto delecję w chromosomie 22 o wielkości 2,99 Mb, nieznanego pochodzenia. Delecja obejmuje region 22q11.21, krytyczny dla zespołu DiGeorge'a (DGS). U kobiety nie przeprowadzono wcześniej badań w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji, ponieważ jej fenotyp jednoznacznie nie wskazywał na podejrzenie zespołu DGS. Przede wszystkim, u pacjentki stwierdzono wadę serca, która występuje u około 97% pacjentów z zespołem DGS. Należy jednak wspomnieć, że przez pierwszych 10 dni życia u pacjentki występowała niewydolność krążeniowo-oddechowa.



Mogło to być jednak związane z ciężkim ogólnym stanem noworodka po urodzeniu (otrzymał 3 punkty w skali Apgar). U pacjentki nie obserwuje się też innych wyraźnych i ważnych klinicznie cech występujących w przebiegu zespołu DGS, ale biorąc pod uwagę, że u pacjentów z zespołem DGS stwierdzono ponad 180 różnych cech fenotypowych, możliwa jest obecność takiego zestawu wad. Co charakterystyczne dla zespołu DGS, pacjentka od najmłodszych lat wykazywała opóźniony rozwój psychomotoryczny. Mikrodelecje w regionie chromosomowym 22q11 są związane z około z 30-krotnym wzrostem ryzyka zachorowania na schizofrenię [13], a pacjentka ma brata dotkniętego tą chorobą, natomiast drugi brat jest również niepełnosprawny intelektualnie.

Podsumowując należy stwierdzić, że pacjentka jest rzadkim przykładem nosicielstwa delecji 22q11, nie manifestującej się obecnością wad serca, natomiast obecnością znacznej NI (najczęściej występuje NI w stopniu lekkim). Ponieważ pacjentka przebywała w domu dziecka, brak jest jakichkolwiek danych na temat wywiadu rodzinnego a także możliwości przeprowadzenia badań u pozostałych członków rodziny. Wielkość delecji oraz dane z piśmiennictwa mówiące o patogenności podobnej delecji u innych pacjentów sugerują patogeny charakter wykrytej zmiany u pacjentki B-6.

### **Pacjent B-7**

U chłopca stwierdzono delecję w chromosomie 1 o wielkości 2 Mb, nieznanego pochodzenia. Cechy fenotypowe obecne u pacjenta B-7 są prawie identyczne z opisywanymi u innych pacjentów z zespołem delecji 1q43-q44 (ang. *Chromosome 1q43-q44 Deletion Syndrome*). Zespół ten charakteryzuje się znaczną lub głęboką NI, małą głowicą, brakiem mowy, drgawkami, agenezją ciała modzelowatego oraz zmiennymi cechami dysmorfii twarzy (cienkie wargi, duże małżowiny uszne, wydatne czoło, szeroki nos) [39,158]. W bazie Decipher opisano także podobne przypadki delecji 1q43-q44, charakteryzujące się zbliżonym fenotypem do pacjenta B-7, jednakże obejmujące mniejszy region chromosomowy. Boland i wsp. w przeprowadzonych badaniach u pacjentów z małą głowicą i agenezją ciała modzelowatego, zaobserwowali, że u większości przebadanych pacjentów, wspólnym obszarem pęknięcia jest region obejmujący gen *AKT3*. Wysłanęli oni wniosek, iż gen ten jest odpowiedzialny za małą głowicę oraz agenezję ciała modzelowatego. Hipotezę tę potwierdziły badania przeprowadzone na modelu mysim, udowadniając, że gen *AKT3* jest wymagany do normalnego rozwoju ciała modzelowatego a także uczestniczy w powstawaniu mózgu o

prawidłowych rozmiarach [23]. Natomiast Ballif i wsp. zbadali 22 pacjentów z delecjami w obszarze 1q43-q44, korelując fenotyp z wielkością delecji. Stwierdzili, że u pacjentów z małogłowiec, agenezją ciała modzelowatego oraz drgawkami jest obecna delecja krytycznego regionu, obejmująca geny *AKT3*, *ZNF238*, *FAM36A*, *C1ORF199*, *HNRNPU* [11]. Pacjent B-7 ma delecję obejmującą wszystkie wymienione geny oprócz *C1ORF199*, sugerując, iż gen ten nie jest niezbędny do rozwoju głównych cech fenotypowych obecnych w zespole delecji 1q43-q44.

Biorąc pod uwagę zbieżność fenotypu pacjenta B-7 z danymi z piśmiennictwa odnoszącymi się do znanej jednostki chorobowej, można uznać delecję 1q43-q44 za przyczynę nieprawidłowego fenotypu pacjenta.

### **Pacjent B-8**

U pacjenta zidentyfikowano duplikację regionu subtelomerowego 15q, o wielkości 250,4 kb. Z powodu braku dostępności materiału genetycznego od rodziców chłopca, nie znane jest pochodzenie zmiany. W obrębie wykrytej duplikacji nie znajdują się geny, których funkcje miałyby związek z fenotypem pacjenta. Jednakże rearanżacje regionów subtelomerowych są przyczyną NI u 3-8% pacjentów z tym schorzeniem [40]. Cechą typową dla rearanżacji subtelomerowych jest bardzo szerokie spektrum objawów współwystępujących z NI. Tak też było w tym przypadku, w którym fenotyp pacjenta nie pozwalał na wysunięcie podejrzenia konkretnego zespołu lub aberracji, dlatego też lekarz genetyk zlecił badanie SNP-array. Duplikacja została potwierdzona przy użyciu techniki MLPA (zestawy P036 oraz P070).

W związku z tym, że nie zbadano rodziców pacjenta, nie wiadomo czy zmiana ma charakter patogeny czy też jest odziedziczona po zdrowym rodzicu. W takim przypadku należałoby się spodziewać istnienia innej zmiany u pacjenta, która byłaby przyczyną NI. W kolejnym etapie diagnostyki należałoby przeprowadzić badanie u rodziców pacjenta.

### **Pacjentka B-9**

U dziewczynki stwierdzono delecję długiego ramienia chromosomu 15, o wielkości 3,40 Mb, pochodzenia *de novo*. Delecja obejmuje region zawierający kilkadziesiąt genów, głównie kodujących mikro-RNA oraz niekodujących RNA. Na szczególną uwagę zasługują jednak dwa geny obecne w obszarze delecji: *NDN* i *NIPA2*. Pierwszy koduje nekdyne, białko ulegające ekspresji w neuronach, wykazujące ojcowsko

specyficzną ekspresję. Niektórzy autorzy podają, że rearanżacje genu *NDN* mogą wywoływać fenotyp PWS-podobny. Lee i wsp. udowodnili, że myszy z delecją genu *NDN* mają zaburzony rozwój aksonów, sugerując, że utrata funkcji tego genu prowadzi do neurologicznego fenotypu w zespole PWS [88]. Fakt ten potwierdzałby wcześniejsze podejrzenie zespołu PWS i zlecone przez lekarza genetyka badanie metylacji *locus SNRPN* u pacjentki. Drugi gen *NIPA2* koduje transporter magnezowy. Stwierdzono korelacje pomiędzy mutacjami w tym genie a występowaniem dziecięcej padaczki z napadami nieobecności (CAE; ang. *childhood absence epilepsy*) [80]. Dotyczy ona przede wszystkim dziewczynek. Napady występują u zdrowych dotychczas dzieci, najczęściej między 3 a 13 rokiem życia. Zaburzenia świadomości pojawiają się szybko i szybko ustępują. Trwają 5–15 sekund i powtarzają się około 200 razy dziennie. Rzadziej napadom towarzyszą mruganie powiek czy cmokanie. Napady te mogą tłumaczyć obecność u pacjentki nadmiernej ruchliwości oraz stereotypie ruchowe. Rozwój umysłowy w CAE pozostaje prawidłowy, chociaż mogą występować zaburzenia zachowania. Należy jednak zauważyć, iż u pacjentki występuje NI w stopniu znacznym, co może wynikać z delecji innych genów (w tym *NDN*) w regionie 15q11.2. Konkludując, wydaje się, że delecja 15q11.2 a w szczególności genów *NDN* i *NIPA2* może być przyczyną NI oraz innych cech klinicznych występujących u pacjentki.

### **Pacjentka B-10**

W badaniu cytogenetycznym u dziecka stwierdzono kariotyp żeński z nieprawidłowym chromosomem 22 (46,XX,der(22) *de novo*). W celu dokładniejszego określenia charakteru aberracji chromosomu 22, przeprowadzono badanie SNP-array. U pacjentki wykryto delecję o wielkości 1,03 Mb, pochodzenia *de novo*. Delecja zlokalizowana jest w regionie 22q13.33, krytycznym dla zespołu Phelan-McDermida. W regionie tym zlokalizowanych jest kilkanaście różnych genów, w tym gen *SHANK3* związany z opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego a w szczególności opóźnieniem rozwoju mowy oraz chorobami spektrum autystycznego [44]. Wysoce prawdopodobne jest wskazanie genu *SHANK3* jako głównego czynnika etiologicznego NI oraz współwystępujących wad u dziecka, gdyż u dziewczynki występuje afazja semantyczna, nadaktywność i nadwrażliwość a także opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Innymi genami mogącymi mieć związek z występowaniem NI są *ALG12* i *TYMP*. Gen *ALG12* koduje enzym - mannozotransferazę. Jego upośledzona funkcja jest przyczyną

wrodzonych zaburzeń glikozylacji (CDG1G; ang. *Congenital disorders of glycosylation, type Ig*) charakteryzujących się opóźnieniem psychomotorycznym, drgawkami, małowłóciem, obniżonym napięciem mięśniowym oraz dysmorfia twarży. W piśmiennictwie można znaleźć opisy pacjentów z CDG1G, u których identyfikuje się w badaniu MRI poszerzenie komór bocznych [153]. U pacjentki B-10 badanie MRI wykazało jednak torbiel pajęczynówki, hipoplazję ciała modzelowatego oraz ogniska hiperintensywne w obrębie istoty białej. Także pozostałe cechy kliniczne opisywane u innych pacjentów z CDG1G nie są obecne u naszej pacjentki. Wskazuje to, iż delecja genu *ALG12* prawdopodobnie nie ma związku z fenotypem pacjentki. Gen *TYMP* natomiast koduje fosforylaze tymidynową a jego mutacje prowadzą do MTDPS1 (ang. *Mitochondrial DNA Depletion Syndrome-1*). Uważa się, że białko TYMP odgrywa ważną rolę w rozwoju i regeneracji ośrodkowego układu nerwowego, a także pobudza angiogenezę i tworzenie bariery krew-mózg [10]. Często u pacjentów z MTDPS1 opisywane są zmiany w MRI (ogniska hiperintensywne w obrębie istoty białej), tak jak w przypadku pacjentki B-10 [55].

Porównując dane z piśmiennictwa z fenotypem pacjentki, można przypuszczać, że delecja w regionie 22q13.33 przyczyniła się do powstania nieprawidłowego fenotypu pacjentki.

### **Pacjent B-11**

U pacjenta zidentyfikowano delecję w chromosomie 11 o wielkości 815 kb, pochodzenia *de novo*. W regionie, który uległ delecji zlokalizowanych jest kilkanaście genów, z tego kilka powiązanych jest ze znanymi zespołami chorobowymi manifestującymi się NI, a także genami, których funkcja może mieć związek z występowaniem NI. Do tych genów zaliczamy *BBS1*, którego mutacje są przyczyną zespołu Bardeta-Biedla (BBS; ang. *Bardet-Biedl Syndrome*). Zespół ten charakteryzuje się otyłością, retinopatią barwnikową, polidaktylią, NI, hipogonadyzmem i niekiedy niewydolnością nerek. U pacjenta B-11 nie obserwuje się żadnych z wymienionych głównych kryteriów tego zespołu, dlatego też należy sądzić, że delecja genu *BBS1* nie jest przyczyną obserwowanego nieprawidłowego fenotypu pacjenta. Kolejnym genem jest *SPTBN2*, którego mutacje prowadzą do ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 5 (SCA5; ang. *Spinocerebellar ataxia 5*). Przyczyn zaburzeń występujących u pacjenta B-11 nie należy wiązać z delecją genu *SPTBN2*, gdyż nie

prezentuje on typowych objawów występujących w SCA5 (zaburzeń koordynacji ruchowej spowodowanych zmianami w obrębie mózdzku). Ponadto pierwsze symptomy występują najczęściej w wieku dojrzałym, w 3. i 4. dekadzie życia. Gen *PC* koduje karboksylazę pirogronianową – enzym biorący udział w kluczowych procesach metabolicznych takich jak glukoneogeneza, lipogeneza czy synteza neuroprzekaźników. Brak lub niedobór tego enzymu prowadzi do zespołu deficytu karboksylazy pirogronianowej (PC; ang. *Pyruvate carboxylase deficiency*). W zespole PC występuje opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, któremu w większości przypadków towarzyszy podwyższenie niektórych parametrów biochemicznych w krwi pacjenta (kwasu mlekowego, amoniaku, lizyny, cytruliny). Dane kliniczne nie wskazują jednak na podwyższone wartości wyżej wspomnianych związków u pacjenta. Wobec tego należałoby przeprowadzić badania biochemiczne krwi w celu określenia stężenia powyższych parametrów biochemicznych. Genem, który może mieć związek z obniżonym napięciem mięśniowym u pacjenta jest *ACTN3*, który ulega ekspresji głównie w mięśniach szkieletowych i bierze aktywny udział w ich skurczu [122].

W regionie delecji znajdują się geny, których rola nie jest jeszcze poznana lub dane z piśmiennictwa nie pozwalają jednoznacznie sklasyfikować charakteru aberracji. Jednocześnie w regionie wykrytej zmiany nie stwierdza się regionów polimorficznych obecnych w populacji osób zdrowych (wg bazy DGV), a wykryta zmiana nie jest obecna u rodziców pacjenta. U chłopca nie obserwujemy się specyficznych cech klinicznych, które można by powiązać z wykrytą zmianą. Dlatego też wobec cech, które prezentuje pacjent B-11, tak samo prawdopodobnym może być patogenny charakter wykrytej zmiany, jak również obecność innej dodatkowej mutacji w genomie pacjenta lub inne, niegenetyczne podłoże nieprawidłowego fenotypu chłopca.

### **Pacjentka B-12**

W badaniu cytogenetycznym u dziecka stwierdzono kariotyp żeński z nieprawidłowym chromosomem 9 (46,XX,add(9)(p24)). W celu dokładniejszego określenia aberracji chromosomu 9, przeprowadzono badanie SNP-array. Ujawniło ono dwie niezrównoważone zmiany krótkiego ramienia chromosomu 9: terminalną delecję o wielkości 18,17 Mb oraz sąsiadującą z nią interstycjalną duplikację o wielkości 23,3 Mb. Obydwie zmiany powstały *de novo*. W bazie Decipher opisano innych pacjentów z delecją w tym regionie o zbliżonej wielkości. Pacjenci ci prezentują szerokie spektrum objawów i cech dymorfii. U wszystkich występuje NI. W regionie, który uległ delecji

znajduje się też wiele genów, którym można przypisać rolę w patogenezie fenotypu zbliżonego do fenotypu naszej pacjentki [70]. Griggs i wsp. opisali dwoje niespokrewnionych pacjentów, u których zidentyfikowano delecję lub przerwanie genu *DOCK8*. U obojga występowała NI, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego oraz łagodne cechy dymorfii twarzy [60]. Innym genem mogącym mieć związek z fenotypem pacjentki jest *KANK1*. Lerer i wsp. opisali delecje genu *KANK1* u kilku osób w tej samej rodzinie, cierpiących na porażenie mózgowe. Także badanie MRI u tych osób wykazywało nieprawidłowości mózgu [89]. Kolejnym genem jest *VLDLR*, kodujący receptor dla lipoprotein o bardzo małej gęstości. Jego mutacje mogą prowadzić do wrodzonej niepostępującej ataksji mózdkowej i/lub hipoplazji mózdku, charakteryzującej się zaburzeniami równowagi i opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego, obniżonym napięciem mięśniowym oraz niedorozwojem mózdku [56].

Wielkość drugiej zmiany obecnej u pacjentki – duplikacji, również jest znaczna (23,3 Mb). Wskutek tego dawka wielu genów w tym regionie uległa podwyższeniu. Ze względu na mnogość genów występujących w tym regionie oraz ich zaangażowanie w funkcje OUN oraz potencjalną rolę w powstawaniu innych wad obecnych u pacjentki, omówienie każdego z nich jest w tej pracy niemożliwe. W bazie danych Decipher nie opisano innych pacjentów z tak dużą duplikacją w tym regionie. Opisane są przypadki o znacznie mniejszym zasięgu aberracji w regionie 9p22.2-9p12 [70]. Pacjenci ci wykazywali NI oraz prezentowali szerokie spektrum fenotypu, w tym cechy zbieżne z pacjentką B-12. Pozwala to stwierdzić, że jeśli u innych pacjentów dużo mniejsze duplikacje w tym regionie odpowiadają za nieprawidłowy fenotyp, to tym bardziej tak duża zmiana dziecka może mieć patogenny charakter.

Obydwie zmiany zidentyfikowane u pacjentki B-12 są tak znacznych rozmiarów, iż trudno wyodrębnić poszczególne geny mogące odpowiadać za powstawanie nieprawidłowego fenotypu u dziewczynki. Funkcja wielu z tych genów może mieć potencjalne znaczenie w etiologii zaburzeń pacjentki. Pochodzenie *de novo* zmian, ich wielkość oraz opisywane podobne przypadki zmian w tym regionie u pacjentów z NI i cechami dymorfii, jednoznacznie świadczą o klinicznym znaczeniu wykrytych aberracji.

### **Pacjentka B-13**

U dziewczynki w badaniu cytogenetycznym stwierdzono kariotyp żeński z inwersją paracentryczną chromosomu 2 (46,XX,inv(2)(q36.32q37.3). W celu określenia

ewentualnego niezrównoważenia kariotypu, przeprowadzono badanie SNP-array. Wykonane badanie potwierdziło obecność niezrównoważenia kariotypu w postaci dwóch zmian: terminalnej delecji długiego ramienia chromosomu 2 (region 2q37.3) o wielkości 4,35 Mb oraz terminalnej duplikacji krótkiego ramienia chromosomu 10 (region 10p15.3-10p15.1) o wielkości 6,55 Mb. Obydwie zmiany powstały *de novo*. Zespół delecji 2q37 coraz częściej opisywany jest u pacjentów z NI oraz innymi wadami wrodzonymi. Głównymi objawami opisywanymi u pacjentów w delecją 2q37 są: NI oraz dysmorfia twarzy. Często są także brachydaktylia i problemy behawioralne. Według niektórych autorów minimalny rozmiar aberracji wynosi 3 Mb. Większość monosomii 2q37 pochodzi *de novo* [3]. W regionie, który uległ delecji znajduje się wiele genów. Kilku spośród nich można przypisać potencjalną rolę w powstaniu nieprawidłowego fenotypu u naszej pacjentki. Mutacje genu *NDUFA10* są przyczyną zespołu Leigha (LS; ang. *Leigh Syndrome*). Choroba zazwyczaj ujawnia się w wieku 3-24 miesięcy i gwałtownie postępuje. W obrazie klinicznym mogą występować objawy ze strony układu nerwowego, mięśni szkieletowych, serca, wątroby i nerek. Często obserwuje się obniżone napięcie mięśniowe [38]. Gen *KIF1A* koduje receptor synaptyczny. Hamdan i wsp. zidentyfikowali heterozygotyczną mutację w tym genie u pacjenta z idiopatyczną NI. Natomiast nie znaleźli żadnych zmian w tym genie u 285 zdrowych osób. Postawili oni hipotezę, że zmiany dotyczące tego genu mogą być przyczyną NI o dziedziczeniu autosomalnym dominującym [63]. Mutacje w genie *D2HGDH* są przyczyną neurometabolicznej choroby zwanej kwasicą D2-hydroksyglutarową (D2HGA; ang. *D-2-hydroxyglutaric aciduria*) po raz pierwszy opisaną przez Chalmersa i wsp. w 1980 roku. Choroba charakteryzuje się opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego, padaczką, obniżonym napięciem mięśniowym i cechami dysmorfii twarzy [30]. Region 2q37 powiązany jest także z dziedziczną osteodystrofią Albrighta (AHO; ang. *Albright hereditary osteodystrophy*), cechującą się opóźnieniem rozwoju oraz brachydaktylią. Za fenotyp tego zespołu odpowiadają geny *HDAC3*, *STK25* i *GPC1* [169]. Wszystkie wymienione geny znajdują się w regionie, który uległ delecji.

W badaniu SNP-array u pacjentki stwierdzono także duplikację 10p15.3-10p15.1. W regionie tym jest wiele genów, jednakże funkcja wielu z nich nie jest jeszcze poznana lub nie kodują one mRNA. Te, których rola jest opisana, nie mają związku z fenotypem pacjentki. W obszarze duplikacji występują geny predyspozycji do występowania nowotworów żołądka i prostaty, geny mające związek z odwróceniem płci oraz predysponujące do cukrzycy. W bazie danych Decipher są opisani pacjenci z nieco



mniejszymi duplikacjami w tym regionie, ale mającymi także dodatkowe aberracje na innych chromosomach. U wszystkich występuje opóźnienie rozwoju psychomotorycznego oraz szerokie spektrum cech dysmorfii [70].

U pacjentki zidentyfikowano dwie zmiany, z czego delecję 2q37, według danych z piśmiennictwa, należy uznać za patogenną. Charakter duplikacji 10p15.3-10p15.1 oraz jej wpływ na cechy kliniczne obecne u pacjentki jest niejasny. Dane z piśmiennictwa nie potwierdzają bezpośrednio jej patogenności, zwłaszcza, że geny tam zawarte nie są skorelowane z jednostkami chorobowymi manifestującymi się NI. Nie wyklucza to jednak klinicznego znaczenia tej zmiany w odniesieniu do naszej pacjentki. Być może w przyszłości rola niektórych genów w tym regionie zostanie powiązana z występowaniem NI oraz innymi wadami wrodzonymi.

#### **Pacjent B-14**

U chłopca stwierdzono delecję w chromosomie 16, o wielkości 1,16 Mb. Zmiana ma charakter *de novo*. Region objęty delecją pokrywa się częściowo z regionem krytycznym dla zespołu mikrodelecji 16p11.2. Częstość występowania tego zespołu szacowana jest na 3:10000 żywych urodzeń. Większość delecji nie jest odziedziczona od rodziców. Osoby z mikrodelecją 16p11.2 wykazują opóźnienie rozwoju psychomotorycznego i NI. U wielu z nich obserwuje się także cechy ze spektrum chorób autystycznych oraz wady serca, obecne także u pacjenta B-14. Pacjenci wykazują także opóźnienie rozwoju mowy i cechy dysmorfii twarzy [69]. Co ciekawe u chłopca wykonywano wcześniej badanie MLPA w kierunku najczęstszych zespołów mikrodelecji (zestaw P245), w tym także mikrodelecji 16p11.2. Wynik był prawidłowy, co potwierdza, że delecja, która jest obecna u pacjenta nie pokrywa się w pełni z całym obszarem mikrodelecji 16p11.2. Sondy w zestawie MLPA są zaprojektowane na miejsca, które nie uległy delecji u naszego pacjenta. Uważa się, że regionem krytycznym dla występowania typowych cech fenotypowych dla tego zespołu jest obszar o wielkości około 600 kb, zawierający 25 genów [137]. W regionie, który uległ delecji znajduje się gen *ALDOA*. Jego upośledzona funkcja jest przyczyną choroby spichrzeniowej glikogenu typu XII (GSD12; ang. *glycogen storage diseases XII*), cechującej się opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego i NI.

U pacjenta B-14 mimo obecności niepełnej delecji w regionie 16p11.2 obserwowanej u większości pacjentów z zespołem mikrodelecji 16p11.2, występują



podobne cechy fenotypowe wpisujące się w obraz kliniczny tego zespołu (opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, NI, zachowania autystyczne, wada serca). Należy zatem uznać delecję 16p11.2 za przyczynę nieprawidłowego fenotypu pacjenta.

### **Pacjent B-15**

W badaniu cytogenetycznym u dziecka stwierdzono kariotyp męski ze zrównoważoną translokacją wzajemną chromosomów 2 i 10 (46,XY,t(2;10)(q37.1;q23.2)mat. Ta sama translokacja zrównoważona obecna jest u zdrowej matki pacjenta oraz u zdrowego rodzeństwa (siostry i brata). W celu sprawdzenia występowania ewentualnego niezrównoważenia kariotypu, wykonano badanie SNP-array, w którym stwierdzono duplikację długiego ramienia chromosomu 22 (2,46 Mb). Zmiana ma charakter *de novo*. Aberracja ta została wcześniej opisana jako zespół duplikacji 22q11 i obejmuje ten sam region chromosomowy, który ulega delecji w zespole DiGeorge'a [45]. Zawiera też kluczowe geny, które ulegają delecji u pacjentów z tym zespołem (*TBX1*, *COMT*, *PRODH*, *HIRA*). W większości przypadków duplikacja jest odziedziczona po którymś z rodziców. Najczęstszymi objawami tego zespołu są: NI, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, obniżone napięcie mięśniowe oraz cechy dysmorfii twarzy [165]. Jednakże u pacjentów z duplikacją 22q11 może występować szerokie spektrum objawów, takich jak wady serca, brachydaktylia, niskorosłość, małogłowie, hpierteloryzm, dysplastyczne małżowiny uszne, drgawki oraz nieprawidłowości urologiczne [165].

Biorąc pod uwagę różnorodność cech fenotypowych mogących występować u pacjentów z mikroduplikacją 22q11 oraz fakt, że zmiana u chłopca ma charakter *de novo*, można uznać, iż duplikacja jest przyczyną nieprawidłowego fenotypu pacjenta.

### **Pacjent B-16**

U pacjenta w badaniu aCGH wykryto dwie zmiany: delecję długiego ramienia chromosomu 1 (1q21.1) o wielkości 1,19 Mb oraz delecję długiego ramienia chromosomu 9 (9q34.11-9q34.13) o wielkości 1,81 Mb. Ze względu na brak możliwości przebadania rodziców pacjenta, pochodzenie obu zmian jest nieznanne. Delecja regionu 1q21.1 pokrywa się z regionem krytycznym dla zespołu delecji 1q21.1 (ang. *Chromosome 1q21.1 Deletion Syndrome*). Delecja charakteryzuje się zmiennymi cechami klinicznymi. Najczęstsze objawy obejmują małogłowie, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego oraz

łagodną NI, a także dyskretne cechy dysmorfii twarzy i wady oczu. Sporadycznie odnotowywano spektrum zaburzeń autystycznych, schizofrenię, zaburzenia uwagi i nadaktywność. Uważa się, że minimalna wielkość delecji w tym zespole wynosi 1,35 Mb (145 – 146,35 Mb, wg HG19) i zawiera co najmniej 7 genów [102]. Do tej pory opisano 46 pacjentów z mikrodelecją 1q21.1.

U pacjenta B-16 zidentyfikowano także delecję w chromosomie 9. W regionie delecji zlokalizowanych jest kilkanaście różnych genów, z których większość nie ma związku z fenotypem chłopca. Genem, który może mieć znaczenie kliniczne w przypadku naszego pacjenta jest *POMT1*. Produkt tego genu koduje O-mannozylotransferazę 2 i uczestniczy w szlaku glikozylacji białek. Jego mutacje mogą prowadzić do trzech zespołów chorobowych: MDDGA1 (ang. *Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 1*), objawiającym się upośledzeniem pracy mózgu oraz narządu wzroku, a także wodogłowiem, MDDGB1 (ang. *Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with mental retardation), type B, 1*), w którym występuje NI oraz MDDGC1 (ang. *Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (limb-girdle), type C, 1*), manifestującym się obniżonym napięciem mięśniowym, dystrofią mięśniową, małogłowiem oraz NI [73]. W regionie delecji nie opisano miejsc polimorficznych. Brakuje też opisów innych pacjentów, u których podobna delecja miałaby związek z ich nieprawidłowym fenotypem. Dane z piśmiennictwa jednoznacznie potwierdzają patogenność delecji 1q21.1, która została opisana również u innych pacjentów z NI i podobnymi cechami klinicznymi. W przypadku drugiej delecji w chromosomie 9 nie można jednoznacznie określić jej wpływu na fenotyp naszego pacjenta. Aktualny stan wiedzy nie pozwala powiązać powyższej delecji z zespołami chorobowymi oraz funkcjami genów, które można uznać za istotne w etiologii NI.

Rearanżacje submikroskopowe (CNV – ang. *copy number variations*), czyli delecje i duplikacje powyżej 1 kb dotyczą około 12% ludzkiego genomu. W zależności od miejsca ich występowania, w sekwencjach kodujących, regulatorowych lub niekodujących, mogą mieć różny wpływ na fenotyp pacjenta. Część z nich charakteryzuje się znanym fenotypem opisanym w bazie OMIM (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*), w której znaleźć można kilka tysięcy chorób genetycznych, powiązanych z NI [72]. Sporą grupę tego typu zmian stanowią też rearanżacje regionów polimorficznych, które są obecne w populacji osób zdrowych i nie mają znaczenia klinicznego. Trzecią grupę stanowią zmiany submikroskopowe o nieznanym wpływie na funkcjonowanie

organizmu człowieka. W przypadku pierwszej grupy zmian, podejrzenie konkretnego zespołu genetycznego pozwala na dobranie odpowiedniej diagnostyki w kierunku aberracji submikroskopowej będącej jego przyczyną. Przykładem takiej diagnostyki jest wykorzystanie metody MLPA w kierunku znanych zespołów mikrodelecji. Pozostałe typy zmian można zidentyfikować w badaniu aCGH lub SNP-array. Zaletą tego typu analizy jest to, że nie ma konieczności wcześniejszego precyzowania podejrzenia klinicznego u pacjenta. Liczba zmian, które można wykryć przy użyciu tych technik jest bardzo duża i nieporównywalna z innymi metodami. Badania te najczęściej zlecane są u pacjentów, u których przyczyna NI i wad rozwojowych, które fenotypowo nie odpowiadają określonym zespołom genetycznym, pozostaje nieznana. W pracy zbadano 63 pacjentów przy użyciu technik SNP-array/aCGH. U 15 pacjentów wykryto 17 zmian w badaniu SNP-array, natomiast u 1 pacjenta uzyskano nieprawidłowy wynik badania aCGH w postaci 2 delecji. Łącznie zmiany wykryto u 16 na 63 badanych pacjentów (25,4%). Spośród tych zmian 11 (u 10 pacjentów - 15,9%) można uznać za patogenne, 2 są prawdopodobnie polimorficzne a 6 z nich ma niewyjaśniony charakter. Większość wykrytych zmian stanowiły delecje – 63,2% (12 delecji). Spośród nich 9 zostało uznanych za patogenne, co stanowi 81,8% wszystkich patogennych zmian wykrytych w tej pracy. Inni autorzy również potwierdzają, że delecje dużo częściej niż duplikacje są genetyczną przyczyną NI i wad wrodzonych [49,152]. Rozmiar wszystkich wykrytych zmian był w zakresie 170,1 kb – 23,3 Mb. Wielkość zmian patogennych wahała się między 1,03 - 23,3 Mb, a siedem z nich (63,6%) mieściło się w przedziale 1 - 3Mb. Wszystkie zidentyfikowane zmiany zlokalizowane były na 10 różnych chromosomach. Z tego 9 z 11 wykrytych zmian patogennych (81,8%) było zlokalizowanych na chromosomach: 1. (2 zmiany), 9. (2 zmiany), 16. (2 zmiany) oraz 22. (3 zmiany). Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy patogennością zmian, a stopniem NI występującym u pacjentów, co przedstawiono w tabeli 15. Natomiast większość pacjentów (68,7%), u których zidentyfikowano zmiany, było pacjentami sporadycznymi (Tab. 15). Podobne badania wykonane przy użyciu techniki aCGH (44 K, 244 K) w grupie 150 pacjentów z prawidłowym badaniem kariotypu, umożliwiły wyjaśnienie etiologii NI i wad wrodzonych u 18% z nich, co koreluje z danymi uzyskanymi w tej pracy [138]. Zastosowanie techniki SNP-array (Genome-wide human SNP-array 6.0, 50Kb) przez Mannik i wsp. pozwoliło wykryć zmiany, które mogą być przyczyną nieprawidłowego fenotypu u 23% badanych z prawidłowym kariotypem [96]. Natomiast Bernardini i wsp. przeprowadzili analizę SNP-array (Genome-wide human SNP-array 6.0, 75 Kb) u 35

pacjentów z prawidłowymi wynikami badania kariotypu i aCGH. Zidentyfikowali oni zmiany patogenne lub potencjalnie patogenne jedynie u 6% badanych [19]. W innym badaniu z użyciem metody aCGH, wykonanym w grupie 84 dzieci z NI i wrodzonymi wadami rozwojowymi, wyniki były podobne. Badacze ci wcześniej wykluczyli znane aberracje chromosomowe mogące być przyczyną nieprawidłowości za pomocą techniki MLPA i FISH. Stwierdzili oni 14 zmian. U 9 pacjentów (11%) zmiany były odziedziczone po jednym z rodziców. Tylko 3 aberracje (3%) powstały *de novo* i stanowiły przyczynę nieprawidłowego fenotypu tych dzieci [97]. Tak niski procent wykrytych aberracji (3 i 6%) jest prawdopodobnie spowodowany przez wstępne wykluczenie pacjentów ze zmianami wykrytymi w badaniach MLPA oraz FISH. W niniejszej rozprawie doktorskiej u 26 pacjentów również przeprowadzono uprzednio analizę MLPA, natomiast u 37 z nich nie zlecono badania MLPA, gdyż ich cechy kliniczne nie wskazywały na występowanie u nich znanych zespołów genetycznych. Należy wspomnieć, że w niniejszej pracy każda zmiana wykryta w badaniach SNP-array/aCGH była weryfikowana za pomocą metody qPCR. Piśmiennictwo wskazuje tę technikę jako wiarygodny sposób potwierdzania zidentyfikowanych zmian w badaniach SNP-array/aCGH [172]. Technika qPCR ma szczególne znaczenie w weryfikacji wykrytych wcześniej zmian, w przypadku, gdy wygenerowane wyniki za pomocą metod SNP-array/aCGH, odbiegają od ustalonych norm i parametrów. Pozwala to na odrzucenie zmian, które są artefaktami [172]. Według wielu autorów, co potwierdzają wyniki tej pracy, SNP-array/aCGH są dobrymi i skutecznymi technikami umożliwiającymi poznanie wielu genetycznych przyczyn opóźnienia rozwoju psychomotorycznego i NI o nieznanym etiologii. U każdego dziecka z zaburzeniem rozwoju i/lub NI o nieznanym pochodzeniu oraz z prawidłowym wynikiem badania kariotypu, powinno być wykonywane badanie SNP-array lub aCGH, nawet, jeżeli nie występuje obciążony wywiad rodzinny. Niestety w Polsce tego typu badania są kosztowne i wykonywane odpłatnie. Dlatego też w wielu przypadkach wykonuje się tylko badanie kariotypu, a następnie analizę MLPA lub FISH. Być może w przyszłości wraz z rozwojem technologii metod molekularnych zmniejszą się koszty diagnostyki i będzie możliwe rutynowe wykonywanie badań SNP-array/aCGH u wszystkich pacjentów z NI oraz wadami wrodzonymi o nieustalonej etiologii.

Tab. 15. Typ NI stwierdzanej u pacjentów, u których wykryto zmiany w badaniach SNP-array/aCGH

<b>Pacjent</b>	<b>Stopień NI</b>	<b>Przypadek</b>
B-1	opóźnienie rozwoju	rodzinny
B-2	lekki	rodzinny
B-3	znaczny	rodzinny
B-4	opóźnienie rozwoju	rodzinny
B-5	lekki	sporadyczny
B-6	znaczny	rodzinny
B-7	głęboki	sporadyczny
B-8	umiarkowany	sporadyczny
B-9	znaczny	sporadyczny
B-10	lekki	sporadyczny
B-11	umiarkowany	sporadyczny
B-12	opóźnienie rozwoju	sporadyczny
B-13	lekki	sporadyczny
B-14	opóźnienie rozwoju	sporadyczny
B-15	opóźnienie rozwoju	sporadyczny
B-16	opóźnienie rozwoju	sporadyczny

## 6 Wnioski

1. Niepełnosprawność intelektualna może być powodowana zmianami o charakterze rearanżacji submikroskopowych, zatem badania w ich kierunku muszą być częścią diagnostyki genetycznej u pacjentów z idiopatyczną NI.
2. Większość wykrytych zmian powstało *de novo*. Znajomość tego faktu pozwala postawić rozpoznanie i udzielić porady genetycznej pacjentom i ich rodzinom.
3. Tylko w części przypadków udaje się wskazać korelacje pomiędzy wykrytymi rearanżacjami, a zmianami fenotypowymi pacjentów.
4. Technika MLPA w większości przypadków pozwala na wstępne wykluczenie aberracji będących przyczyną znanych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji oraz rearanżacji regionów subtelomerowych.
5. Badania SNP-array i aCGH są wiarygodnymi i skutecznymi metodami umożliwiającymi poznanie wielu genetycznych przyczyn opóźnienia rozwoju psychomotorycznego i NI o nieznannej etiologii.
6. Metoda qPCR potwierdziła obecność wszystkich zmian wykrytych w badaniach SNP-array/aCGH, co sugeruje, że weryfikacja wyników badań SNP-array/aCGH być może nie jest konieczna.

## 7 Streszczenie

Opóźnienie rozwoju psychomotorycznego i niepełnosprawność intelektualna (NI), dotyczące 1-3% populacji ogólnej, stanowią ważny problem medyczny i diagnostyczny. W ponad połowie przypadków przyczyny tych zaburzeń pozostają nieokreślone.

Celem niniejszej pracy była próba identyfikacji przyczyn i korelacji genotypowo-fenotypowych u pacjentów z NI. Badania przeprowadzono u 162 pacjentów z idiopatyczną NI, u których wcześniej przeprowadzono badanie przedmiotowe i analizę rodowodu. Po wstępnych badaniach cytogenetycznych oraz metabolicznych, przeprowadzono badania molekularne w kierunku mutacji dynamicznej w genie *FMR1* oraz badanie techniką MLPA w kierunku znanych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji (zestaw P245 MRC-Holland) i/lub rearanżacji regionów subtelomerowych (zestawy SALSA P036 and P070). Przy użyciu metody MLPA analizowano 21 najczęstszych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji. W badaniach przy użyciu techniki MLPA analizowano 96 pacjentów w kierunku rearanżacji regionów subtelomerowych oraz 69 pacjentów w kierunku znanych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji. Dzięki badaniu MLPA, u dwóch pacjentów (2,1%) zidentyfikowano aberracje regionów subtelomerowych: 4p i 19p. Dzięki zastosowaniu badania MLPA w kierunku znanych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji wykryto mikrodelecje: 22q11.2 i 7q11.23, które są przyczyną odpowiednio zespołu DiGeorge'a i zespołu Williama, oraz mikrodelecję 1p36. W sytuacji, gdy cechy fenotypowe pacjenta nie wskazywały jednoznacznie na występowanie znanego zespołu genetycznego, wykonano badania SNP-array lub aCGH. Wysoka rozdzielczość tych technik umożliwiła wykrycie zmian typu CNV (ang. *copy number variations*). U 24 pacjentów zastosowano SNP-array (Genome-Wide Human SNP Array 6.0, Affymetrix, 1M). Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania *Genotyping Console*. 34 pacjentów analizowano dzięki zastosowaniu HumanCytoSNP-12 BeadChips, Illumina Inc., 300k). U 5 pacjentów przeprowadzono badanie aCGH (Nimblegen, 135k). Aberracje submikroskopowe o potencjalnym znaczeniu klinicznym zidentyfikowano u 10 pacjentów spośród 63 zbadanych (15,9%) a rozmiar wykrytych zmian wynosił od 170.1 kb do 23.3 Mb. Zastosowane techniki molekularne wliczając mikromacierze całogenomowe i metodę MLPA, są rekomendowane w celu poszerzenia diagnostyki u pacjentów z NI. Pozwalają one często na identyfikację przyczyn NI, chociaż określenie korelacji genotypowo-fenotypowej rzadko jest możliwe.

## 8 Summary

Psychomotor developmental delay and mental retardation (MR) are significant medical and social problems which concern 1-3% of population. The etiology of these problems remains unknown in over half of the cases.

The aim of this study was an attempt to identify the causes of MR. 162 Polish patients with idiopathic MR have been included in this study. Initially, they were examined clinically and screened using routine cytogenetic and metabolic investigations. Then, the molecular analyses were performed, including *FMR1* gene test and MLPA method for common microdeletion/microduplication syndromes (SALSA kit P245 MRC-Holland) and/or subtelomeric rearrangements (SALSA P036-E1 and P070-B1 kits). Using MLPA method, we investigated deletions and duplications responsible for 21 different microdeletions/microduplications syndromes. Using MLPA technique, the subtelomeric abnormalities were investigated in 96 patients and microdeletion/microduplication syndromes in 69 patients with MR. The MLPA screening revealed two subtelomeric chromosome rearrangements: 4p and 19p (2.1%). MLPA for common microdeletion/microduplication syndromes showed 22q11.2 and 7q11.23 microdeletions that are associated with DiGeorge syndrome and Williams syndrome, respectively, and 1p36 microdeletion. In these cases, in which clinical findings were not completely compatible with the microdeletions syndromes or in patients with complex chromosomal rearrangements, SNP-array and aCGH was performed. High resolution SNP-array/aCGH technology has provided insights into a type of genomic variations known as copy number variations (CNV). To screen the CNVs in 24 patients, we used the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, 1M). The analysis was performed using the Affymetrix Genotyping Console software. In 34 patients, the InfiniumHD whole-genome genotyping assay with the HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina Inc., 300k) was done. In 5 patients aCGH (Nimblegen, 135k) was performed. Potentially pathogenic rearrangements were found in 10 (15,9%) out of 63 investigated individuals and their size varied from 170.1 kb to 23.3 Mb. Molecular techniques, including whole genomic microarrays and multiplex-ligation probe amplification (MLPA) are recommended to extend the diagnostics of patients with MR. They frequently enable to identify the cause of MR but delineation of genotype-phenotype correlation is rarely possible.



## 9 Spis skrótów

- aCGH** – porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (ang. *array-CGH, comparative genomic hybridization*)
- ADHD** – zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*)
- AHO** – dziedziczna osteodystrofia Albrighta (ang. *Albright hereditary osteodystrophy*)
- ALB** – albumina
- AS** – zespół Angelmana (ang. *Angelman Syndrome*)
- ASDII** – ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej typu II (ang. *atrial septal defect*)
- ATR-X** – zespół alfa talasemia-NI o dziedziczeniu sprzężonym z chromosomem X (ang. *Alpha thalassaemia-mental retardation, X-linked*)
- BAC** – sztuczny chromosom bakteryjny (ang. *bacterial artificial chromosome*)
- BBS** – zespół Bardeta-Biedla (ang. *Bardet-Biedl Syndrome*)
- CAE** – dziecięca padaczka z napadami nieobecności (ang. *childhood absence epilepsy*)
- CDC** – zespół krzyku kota (fr. *cri-du-chat*)
- CDG** – wrodzone zaburzenia glikozylacji (ang. *Congenital disorders of glycosylation*)
- CLS** – zespół Coffina-Lowry’ego (ang. *Coffin-Lowry Syndrome*)
- CNV** – zmienność liczby kopii (ang. *copy number variations*)
- CREB** – białko wiążące cAMP (ang. *cAMP response element-binding protein*)
- Cy3, Cy5** – cyjanina 3, cyjanina 5; barwniki fluorescencyjne stosowane w technice mikromacierzy
- DAPI** – 4’-6’-diamino-2-fenylindol dihydrochlorku; barwnik fluorescencyjny stosowany w technice FISH
- DGS** – zespół DiGeorge’a (ang. *DiGeorge Syndrome*)
- DGV** – baza danych (ang. *database of genomic variants*)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- dNTP** – trifosforan deoksyrybonukleotydu (ang. *deoxyribonucleotide triphosphate*)
- DSM-IV** – klasyfikacja zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego, IV edycja (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IV edition*)
- EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EEG** – elektroencefalografia
- EIEE1** - wczesniemowlęca encefalopatia padaczkowa (ang. *early infantile epileptic encephalopathy*)
- F8** – czynnik VIII krzepnięcia
- FISH** – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. *fluorescence in situ hybridization*)
- FMRP** – białko kodowane przez gen FMR1 (ang. *fragile X mental retardation protein*)
- FraX** – zespół łamliwego chromosomu X (ang. *Fragile X Syndrome*)
- FRAXE** – miejsce łamliwe w chromosomie X, typu E (ang. *fragile X syndrome type E*)
- GSD** – choroba spichrzeniowa glikogenu, glikogenoza (ang. *glycogen storage diseases*)
- HindIII, StyI, NspI** – endonukleazy restrykcyjne
- HRT** – techniki wysokiej rozdzielczości (ang. *high resolution techniques*)
- inv** – inwersja
- IQ** – iloraz inteligencji (ang. *intelligence quotient*)
- KCl** – chlorek potasu
- KTZS** – zespół Kohlschuttera-Tonza (ang. *Kohlschutter-Tonz Syndrome*)
- LS** – zespół Leigha (ang. *Leigh Syndrome*)

**mat** – pochodzenia matczynego (ang. *maternal*)  
**MDDGA1** – ang. *Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 1*  
**MDDGB1** – ang. *Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with mental retardation), type B, 1*  
**MDDGC1** – ang. *Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (limb-girdle), type C, 1*  
**MDGCR1** – minimalny region krytyczny zespołu DiGeorge'a (ang. *minimal DiGeorge critical region 1*)  
**MDS** – zespół Millera-Diekera (ang. *Miller-Dieker Syndrome*)  
**MgCl<sub>2</sub>** – chlorek magnezu  
**MLPA** – multipleksowa amplifikacja zależna od ligacji sond (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*)  
**MR** – niepełnosprawność intelektualna (ang. *mental retardation*)  
**MRI** – obrazowanie techniką rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*)  
**MSS** – zespół Marinescu-Sjogrena (ang. *Marinescu-Sjogren Syndrome*)  
**MTDPS1** – ang. *Mitochondrial DNA Depletion Syndrome-1*  
**NaCl** – chlorek sodu  
**NaOH** – wodorotlenek sodu  
**NF-1** – nerwiakowłókniakowatość typu 1, choroba von Recklinghausena (ang. *Neurofibromatosis Type 1*)  
**NI** – niepełnosprawność intelektualna  
**NMR** – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)  
**NS** – zespół Noonan (ang. *Noonan Syndrome*)  
**NS-XLMR** – niespecyficzna niepełnosprawność intelektualna sprzężona z chromosomem X (ang. *Nonsyndromic X-linked Mental Retardation*)  
**OMIM** – baza danych (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*)  
**OUN** – ośrodkowy układ nerwowy  
**pat** – pochodzenia ojcowskiego (ang. *paternal*)  
**PC** – deficyt karboksylazy pirogronianowej (ang. *Pyruvate carboxylase deficiency*)  
**PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)  
**PKU** – fenyloketonuria (ang. *Phenylketonuria*)  
**PMS** – zespół Phelan-McDermida (ang. *Phelan-McDermid Syndrome*)  
**PWS** – zespół Pradera-Willi'ego (ang. *Prader-Willi Syndrome*)  
**qPCR** – ilościowy PCR (ang. *quantitative PCR*)  
**RNA** – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)  
**rpm** – obroty na minutę (ang. *revolutions per minute*)  
**RSK2** – kinaza rybosomalna S6 (ang. *ribosomal S6 kinase 2*)  
**RSTS** – zespół Rubinsteina-Taybi'ego (ang. *Rubinstein-Taybi Syndrome*)  
**RTG** – badanie rentgenowskie  
**RTT** – zespół Retta (ang. *Rett Syndrome*)  
**SCA** – ataksja rdzeniowo-mózdkowa (ang. *Spinocerebellar ataxia*)  
**SMS** – zespół Smitha-Magenisa (ang. *Smith-Magenis Syndrome*)  
**SNP** – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)  
**SNP-array** – mikromacierze SNP (ang. *single nucleotide polymorphism array*)  
**S-XLMR** – zespołowa niepełnosprawność intelektualna sprzężona z chromosomem X (ang. *Syndromic X-linked Mental Retardation*)  
**t** – translokacja  
**TK** – tomografia komputerowa

**TS** – stwardnienie guzowate (ang. *Tuberous Sclerosis*)  
**TSH** – hormon tyreotropowy (ang. *Thyroid-stimulating hormone*)  
**UPD** – disomia jednorodzicielska (ang. *uniparental disomy*)  
**USG** – badanie ultrasonograficzne  
**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)  
**WHS** – zespół Wolfa-Hirschhorna (ang. *Wolf-Hirschhorn Syndrome*)  
**WS** – zespół Williama (ang. *Williams Syndrome*)

## 10 Spis tabel

- Tab. 1. Klasyfikacja NI według WHO
- Tab. 2. Wybrane geny odpowiedzialne za niespecyficzną postać NI (NS-XLMR) (za <http://xlmr.interfree.it>, zmienione)
- Tab. 3. Wybrane geny odpowiedzialne za zespołową (S-XLMR) i niespecyficzną postać NI (NS-XLMR) (za <http://xlmr.interfree.it>, zmienione)
- Tab. 4. Techniki cytogenetyczne i cytogenetyczno-molekularne stosowane w diagnostyce NI (za [113], zmienione)
- Tab. 5. Liczbowy rozkład pacjentów z różnymi stopniami NI
- Tab. 6. Sekwencje starterów użytych do oceny liczby kopii badanych regionów wykonywanych metodą qPCR
- Tab. 7. Wykaz ważniejszych odczynników
- Tab. 8. Wykaz buforów sporządzanych przez autora
- Tab. 9. Lista wykrytych zmian u pacjentów w badaniu MLPA
- Tab. 10. Lista wykrytych zmian u pacjentów w badaniach aCGH i SNP-array
- Tab. 11. Charakterystyka pacjentów z prawidłowymi wynikami MLPA i aCGH/SNP-array
- Tab. 12. Liczbowy wykaz badań przeprowadzonych u pacjentów z NI
- Tab. 13. Porównanie cech fenotypowych i behawioralnych pacjentki A-1, charakterystycznych dla zespołu delecji 1p36, z częstością ich występowania u innych pacjentów (za [134])
- Tab. 14. Porównanie cech dysmorfii pacjentów z duplikacją 19p (za [8], zmienione)
- Tab. 15. Typ NI stwierdzanej u pacjentów, u których wykryto zmiany w badaniach SNP-array/aCGH

# 11 Spis rycin

- Ryc. 1. Interfazowe jądro limfocytu wybarwione DAPI z sygnałami fluorescencyjnymi z chromosomu 13 (zielony, sonda znakowana fluoresceiną) i 21 (czerwony, sonda znakowana rodaminą) (za [http://www.ask.com/wiki/Fluorescence\\_microscope](http://www.ask.com/wiki/Fluorescence_microscope))
- Ryc. 2. Procedura MLPA (za <http://www.mlpa.com>, zmienione)
- Ryc. 3. Procedura badania techniką mikromacierzy SNP-array (za <http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/site/genomicscore/section/1919>, zmienione)
- Ryc. 4. Algorytm postępowania u pacjentów z NI
- Ryc. 5. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-1. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 11q13.3-q13.4
- Ryc. 6. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-2. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 15q11.2
- Ryc. 7. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-3. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie Xq21.1
- Ryc. 8. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-4. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 5q31.2
- Ryc. 9. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-5. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 16p13.3
- Ryc. 10. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-6. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 22q11.21
- Ryc. 11. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-7. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 1q43-1q44
- Ryc. 12. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-8. Widoczna terminalna duplikacja w chromosomie 15q26.3
- Ryc. 13. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-9. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 15q11.2
- Ryc. 14. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-10. Widoczna terminalna delecja w chromosomie 22q13.33
- Ryc. 15. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-11. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 11q13.1

- Ryc. 16. Obraz zmian wykrytych u pacjentki B-12. Widoczna terminalna delecja (9p24.3-9p22.2) oraz interstycjalna duplikacja (9p22.2-9p12)
- Ryc. 17. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-13. Widoczna terminalna delecja w chromosomie 2q37.3
- Ryc. 18. Obraz zmiany wykrytej u pacjentki B-13. Widoczna terminalna duplikacja w chromosomie 10p15.3-10p15.1
- Ryc. 19. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-14. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 16p11.2
- Ryc. 20. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-15. Widoczna interstycjalna duplikacja w chromosomie 22q11.21
- Ryc. 21. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-16. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 1q21.1
- Ryc. 22. Obraz zmiany wykrytej u pacjenta B-16. Widoczna interstycjalna delecja w chromosomie 9q34.11-9q34.13
- Ryc. 23. Wyniki badania qPCR. Porównanie względnej ilości kopii badanych regionów u pacjentów B-1 – B-16 do kontroli (K). Wartość 1 oznacza występowanie 2 kopii badanego regionu.

## 12 Piśmiennictwo

- [1] Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet* 2007; 8: 9.
- [2] Ahuja A, Thapar A, Owen MJ. Genetics of mental retardation. *Indian Journal of Medical Sciences* 2005; 59: 407-417.
- [3] Aldred MA, Sanford ROC, Thomas NS, Barrow M, Wilson L, Brueton L, Bonaglia M, Hennekam R, Eng C, Dennis N, Trembath R. Molecular analysis of 20 patients with 2q37.3 monosomy: definition of minimum deletion intervals for key phenotypes. *J Med Genet* 2004; 41: 433-439.
- [4] Altered A, Farook MF, Decuypere M, Hyland K, Takumi T, LeDoux MS, Reiter LT. Altered serotonin, dopamine and norepinephrine levels in 15q duplication and angelman syndrome mouse models. *PLoS One* 2012; 7: e43030.
- [5] Amenta S, Sofocleous C, Kolialexi A, Thomaidis L, Giouroukos S, Karavitakis E, Mavrou A, Kitsiou S, Kanavakis E, Fryssira H. Clinical manifestations and molecular investigation of 50 patients with Williams syndrome in the Greek population. *Pediatr Res* 2005; 57: 789-795.
- [6] American Academy of Pediatrics. Health care supervision for children with Williams syndrome. *Pediatrics* 2001; 107: 1192-1204.
- [7] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genet* 1999; 23: 185-188.
- [8] Andries S, Sartenaer D, Rack K, Rombout S, Tuerlinckx D, Gillerot Y, Van Maldergem L. Pure terminal duplication of the short arm of chromosome 19 in a boy with mild microcephaly. *J Med Genet* 2002; 39: e60.
- [9] Anttonen AK, Siintola E, Tranebjaerg L, Iwata NK, Bijlsma EK, Meguro H, Ichikawa Y, Goto J, Kopra O, Lehesjoki AE. Novel SIL1 mutations and exclusion of functional candidate genes in Marinesco-Sjogren syndrome. *Europ J Hum Genet* 2008; 16: 961-969.
- [10] Asai K, Nakanishi K, Isobe I, Eksioglu YZ, Hirano A, Hama K, Miyamoto T, Kato T. Neurotrophic action of gliostatin on cortical neurons: identity of gliostatin

- and platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 1992; 267: 20311-20316.
- [11] Ballif BC, Rosenfeld JA, Traylor R, Theisen A, Bader PI, Ladda RL, Sell SL, Steinraths M, Surti U, McGuire M, Williams S, Farrell SA, and 18 others. High-resolution array CGH defines critical regions and candidate genes for microcephaly, abnormalities of the corpus callosum, and seizure phenotypes in patients with microdeletions of 1q43q44. *Hum Genet* 2012; 131: 145-156.
- [12] Bartsch O, Kress W, Kempf O, Lechno S, Haaf T, Zechner U. Inheritance and variable expression in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* 2010; 152A: 2254-2261.
- [13] Bassett AS, Chow EW, Abdel-Malik P, Gheorghiu M. The schizophrenia phenotype in 22q11 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 1580-1586.
- [14] Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. Natural history of Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. *Pediatrics* 1999; 103: 830-836.
- [15] Battaglia A, Filippi T, Carey JC. Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet* 2008; 148C: 246-251.
- [16] Benjamin CM, Colley A, Donnai D. NF1: Knowledge, Experience and Reproductive Decisions of affected Patients and Families. *J Med Genet* 1993; 30: 567-594.
- [17] Bergemann AD, Cole F, Hirschhorn K. The etiology of Wolf -Hirschhorn syndrome. *Trends Genet* 2005; 21: 188-195.
- [18] Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer SW, Rappold GA. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature Genet* 2010; 42: 489-491.
- [19] Bernardini L, Alesi V, Loddo S, Novelli A, Bottillo I, Battaglia A, Digilio MC, Zampino G, Ertel A, Fortina P, Surrey S, Dallapiccola B. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 178-185.
- [20] Bi W, Yan J, Stankiewicz P, Park SS, Walz K, Boeroel CF, Potocki L, Shaffel LG, Devriendt K, Kowalczyk MMJ, Inoue K, Lupski JR. Genes in a refined Smith-



- Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Res* 2002; 12: 713-728.
- [21] Bilikiewicz A. *Psychiatria. Wydawnictwo Lekarskie PZWL* 1998.
- [22] Bodzioch M. Kompendium chorób neurogenetycznych. Zespół Retta. *Medycyna Praktyczna Neurologia* 2010.
- [23] Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, McKee S, Manson FDC, Medne L, Zackai E, Swanson EA, Fitzpatrick D, Millen KJ, Sherr EH, Dobyns WB, Black GCM. Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 292-303.
- [24] Borg K, Bocian E, Bernaciak J, Nowakowska B, Derwińska K, Obersztyn E, Szczaluba K, Śmigiel R, Kostyk E, Mazurczak T. Zrównoważone rearanżacje chromosomowe jako przyczyna niepełnosprawności intelektualnej. Analiza 22 przypadków z wykorzystaniem technik CGH oraz FISH. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 2009; 2: 81-93.
- [25] Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 516-525.
- [26] Burd L, Vesley B, Martsolf JT, Kerbeshian J. Prevalence study of Rett syndrome in North Dakota children. *Am J Med Genet* 1991; 38: 565-568.
- [27] Butler MG. Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet* 1990; 35: 319-332.
- [28] Campos M Junior, Pestana CP, Dos Santos AV, Ponchel F, Churchman S, Abdalla-Carvalho CB, Dos Santos JM, Dos Santos FL, Gikovate CG, Santos-Rebouças CB, Pimentel MM. A MECP2 missense mutation within the MBD domain in a Brazilian male with autistic disorder. *Brain Dev* 2011; 33: 807-809.
- [29] Carrozzo R, Rossi E, Christian SL, Kittikamron K, Livieri C, Corrias A, Pucci L, Fois A, Simi P, Bosio L, Beccaria L, Zuffardi O, Ledbetter DH. Inter- and intrachromosomal rearrangements are both involved in the origin of 15q11-q13 deletions in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 228-231.
- [30] Chalmers RA, Lawson AM, Watts RWE, Tavill AS, Kamerling JP, Hey E, Ogilvie D. D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* 1980; 3: 11-15.
- [31] Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Cherif B, Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 701-713.

- [32] Chiang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jänisch R. BDNF Ameliorates Rett Syndrome in Mice. *Neuron* 2006; 49:341-348.
- [33] Chiurazzi P, Tabolacci E, Neri G. X-linked mental retardation (XLMR): from clinical conditions to cloned genes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 117-158.
- [34] Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletion causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent probe amplification vs. fluorescent in situ hybridization. *Korean J Lab Med* 2009; 29: 71-76.
- [35] Colombo E, Galli R, Cossu G, Gecz J, Broccoli V. Mouse orthologue of ARX, a gene mutated in several X-linked forms of mental retardation and epilepsy, is a marker of adult neural stem cells and forebrain GABAergic neurons. *Dev Dyn* 2004; 231: 631-639.
- [36] Connor M, Fergusom-Smith M. Podstawy genetyki medycznej, Warszawa: PZWL 1997.
- [37] Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *New Eng. J Med* 2006; 355: 1345-1356.
- [38] Dahl HH. Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome. (Editorial) *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1594-1597.
- [39] De Vries BBA, Knight SJL, Homfray T, Smithson SF, Flint J, Winter RM. Submicroscopic subtelomeric 1qter deletions: a recognisable phenotype? *J Med Genet* 2001; 38: 175-178.
- [40] De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; 40: 385-398.
- [41] Dimitropoulos A, Schultz RT. Autistic-like symptomatology in Prader-Willi syndrome: a review of recent findings. *Current Psychiatry Reports* 2007; 9: 159-164.
- [42] Driscoll DA, Salvin J, Sellinger B, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Emanuel BS. Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1993; 30: 813-817.
- [43] Du HY, Idol R, Robledo S, Ivanovich J, An P, Londono-Vallejo A, Wilson DB, Mason PJ, Bessler M. Telomerase reverse transcriptase haploinsufficiency and telomere length in individuals with 5p- syndrome. *Aging Cell* 2007; 6: 689-697.

- [44] Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H and 11 others. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genet* 2007; 39: 25-27.
- [45] Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RSK, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Molec Genet* 1999; 8: 1157-1167.
- [46] Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 1993; 5: 11-16.
- [47] Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 310-316.
- [48] Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1947-1954.
- [49] Friedman J, Adam S, Arbour L, Armstrong L, Baross A, Birch P, Boerkoel C, Chan S, Chai D, Delaney AD, Flibotte S, Gibson WT, Langlois S, Lemyre E, Li HI, MacLeod P, Mathers J, Michaud JL, McGillivray BC, Patel MS, Qian H, Rouleau GA, Van Allen MI, Yong SL, Zahir FR, Eydoux P, Marra MA. Detection of pathogenic copy number variants in children with idiopathic intellectual disability using 500 K SNP array genomic hybridization. *BMC Genomics* 2009; 10: 526.
- [50] Friedmann JM, Birch P, Greene C and NNFF International Database Participants. National Neurofibromatosis Foundation International Database. *Am J Med Genet* 1993; 45: 88 -91.
- [51] Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet* 2002; 62: 423-432.
- [52] Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008; 1-7.
- [53] Gelb BD, Tartaglia M. Noonan syndrome and related disorders: dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. *Hum Mol Genet* 2006;

2: 220-226.

- [54] Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 1995; 80: 837-845.
- [55] Giordano C, Sebastiani M, De Giorgio R, Travaglini C, Tancredi A, Valentino ML, M, Cossarizza A, Hirano M, d'Amati G, Carelli V. Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion. *Am J Path* 2008; 173: 1120-1128.
- [56] Glass HC, Boycott KM, Adams C, Barlow K, Scott JN, Chudley AE, Fujiwara TM, Morgan K, Wirrell E, McLeod DR. Autosomal recessive cerebellar hypoplasia in the Hutterite population. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 691-695.
- [57] Goldmuntz E, Driscoll D, Budarf ML, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Biegel JA, Emanuel BS. Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patient with congenital conotruncal cardiac defects. *J Med Genet* 1993; 30: 807-812.
- [58] Goldmuntz E, Emanuel BS. Genetic disorders of cardiac morphogenesis. The DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Circ Res* 1997; 80: 437-443.
- [59] Goodship J, Cross I, LiLing J, Wren C. A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child* 1998; 79: 348-351.
- [60] Griggs BL, Ladd S, Saul RA, DuPont BR, Srivastava AK. Deducator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics* 2008; 91: 195-202.
- [61] Gurrieri F, Accadia M. Genetic imprinting: the paradigm of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Endocr Dev* 2009; 14: 20-28.
- [62] Hagberg B. Rett syndrome: Swedish approach to analysis of prevalence and cause. *Brain Dev* 1985; 7: 277-280.
- [63] Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzeniecka S, Piton A, Tomitori H, Daoud H and 22 others. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 306-316.
- [64] Hanauer A, Young D. Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *J Med Genet* 2002; 39: 705-713.
- [65] Harris JC. Brain and behavior in fragile x syndrome and idiopathic autism. *Arch Gen Psychiatry* 2011 Mar; 68: 230-231.

- [66] Harum KH, Alemi L, Johnston MV. Cognitive impairment in Coffin-Lowry syndrome correlates with reduced RSK2 activation. *Neurology* 2001; 56: 207-214.
- [67] Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet* 2003; 64: 310-316.
- [68] Hennekam RCM, Stevens CA, Van de Kamp JJ. Etiology and recurrence risk in Rubinstein–Taybi syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1990; 6: 56-64.
- [69] Hernando C, Plaja A, Rigola MA, Perez MM, Vendrell T, Egocue J, Fuster C. Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations. *J Med Genet* 2002; 39: e24.
- [70] <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- [71] <http://www.mlpa.com>
- [72] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [73] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- [74] Hu H, Wrogemann K, Kalscheuer V, Tzschach A, Richard H, Haas SA, Menzel C, Bienek M, Froyen G, Raynaud M, Van Bokhoven H, Chelly J, Ropers H, Chen W. Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *Hugo J* 2009 Dec; 3(1-4): 41-49.
- [75] Hunter JE, Allen EG, Abramowitz A, Rusin M, Leslie M, Novak G, Hamilton D, Shubeck L, Charen K, Sherman SL. No evidence for a difference in neuropsychological profile among carriers and noncarriers of the FMR1 premutation in adults under the age of 50. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 692-702.
- [76] Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. 1. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 1989; 11: 704-711.
- [77] Huson SM, Korf B. Phakomatoses. *Emery`s and Rimoin`s Principles and Practice of Medical Genetics* 2002; 3: 3162-3202.
- [78] Ishikawa T, Kibe T, Wada Y. Deletion of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN) in Prader-Willi syndrome detected by fluorescence in situ hybridization: two sibs with the typical phenotype without a cytogenetic deletion in chromosome 15q. *Am J Med Genet* 1996; 62: 350-352.
- [79] Jeffries AR, Curran S, Elmslie F, Sharma A, Wenger S, Hummel M. Molecular

- and phenotypic characterization of ring chromosome 22. *Am J Med Genet* 2005; 137: 139-147.
- [80] Jiang Y, Zhang Y, Zhang P, Sang T, Zhang F, Ji T, Huang Q, Xie H, Du R, Cai B, Zhao H, Wang J, Wu Y, Wu H, Xu K, Liu X, Chan P, Wu X. NIPA2 located in 15q11.2 is mutated in patients with childhood absence epilepsy. *Hum Genet* 2012; 131: 1217-1224.
- [81] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
- [82] Kerr B, Turner G, Mulley J, Gedeon A, Partington M. Non-specific mental retardation. *J Med Genet* 1991; 28: 378-382.
- [83] 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; 50: 33-42.
- [84] Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* 1997; 15: 70-73.
- [85] Kleefstra T, Hamel BC. X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet* 2005; 67: 451-467.
- [86] Kosaki K, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, Kosaki R, Nagai T, Hasegawa Y, Ogata T. *PTPN11* (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3529-3533.
- [87] Krajewska-Walasek M. Zespół Williamsa w praktyce klinicznej. *Ped Pol* 1998; LXXIII, 6: 545-552.
- [88] Lee S, Walker CL, Karten B, Kuny SL, Tennese AA, O'Neill MA, Wevrick R. Essential role for the Prader-Willi syndrome protein *necdin* in axonal outgrowth. *Hum Molec Genet* 2005; 14: 627-637.
- [89] Lerer I, Sagi M, Meiner V, Cohen T, Zlotogora J, Abeliovich D. Deletion of the *ANKRD15* gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Hum Molec Genet* 2005; 14: 3911-3920.
- [90] Lowry B, Miller JR, Fraser FC. A new dominant gene mental retardation syndrome. Association with small stature, tapering fingers, characteristic facies, and possible hydrocephalus. *Am J Dis Child* 1971; 121: 496-500.

- [91] Lu XY, Phung MT, Shaw CA. Genomic imbalance in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 2008; 122: 1310-1318.
- [92] Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, Prieur M, Jonveaux P, Phillipe A, Bourrouillou G, de Marginville B, Delobel B, Vallee L, Croquette MF, Mattei MG. Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J Med Genet* 2003; 40: 690-696.
- [93] Łaczmńska I, Jakubiak A, Ślęzak R, Pesz K, Stembalska A, Łaczmanski Ł, Szaśiadek M, Śmigiel R. Badania przesiewowe techniką Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification (MLPA) u dzieci z zaburzeniem rozwoju i niepełnosprawnością intelektualną o nieokreślonej etiologii. *Medycyna wieku rozwojowego* 2011; 2: 132-140.
- [94] Maas NMC, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid BM, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *J Med Genet* 2008; 45: 71-80.
- [95] Mainardi PC. Cri du Chat syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1: 33.
- [96] Männik K, Parkel S, Palta P, Zilina O, Puusepp H, Esko T, Mägi R, Nõukas M, Veidenberg A, Nelis M, Metspalu A, Remm M, Ounap K, Kurg A. A parallel SNP array study of genomic aberrations associated with mental retardation in patients and general population in Estonia. *Eur J Med Genet* 2011; 54: 136-143.
- [97] Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, Rapti SM, Louizou E, Garas A, Kitsos G, Vasileiadis L, Tsoplou P, Eleftheriades M, Peitsidis P, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Thomaidis L. The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay. *Mol Cytogenet* 2010; 9: 3-22.
- [98] Martin CL, Duvall JA, Ilkin Y, Simon JS, Arreaza MG, Wilkes K, Alvarez-Retuerto A, Whichello A, Powell CM, Rao K, Cook E, Geschwind DH. Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism. *Am J Med Genet* 2007; 144B: 869-876.
- [99] Martin RE, Bazan NG. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem* 1992; 59: 318-325.



- [100] McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: Cast a wide *FISHing* net! *Genetics in Medicine* 2001; 3: 23-29.
- [101] Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS. Hemizyosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics* 2000; 63: 157-164.
- [102] Mefford H, Sharp A, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney V, Crolla J, Baralle D, Collins A, Mercer C and 72 others. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *New Eng J Med* 2008; 359: 1685-1699.
- [103] Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. *J Med Genet* 2006; 43: 625-633.
- [104] Midro AT. Bardziej Kochani. *Z myślą o tobie*, Kwartalnik 2002.
- [105] Miyamoto A, Yamamoto M, Takahashi S, Oki J. Classical Rett syndrome in sisters: variability of clinical expression. *Brain Dev* 1997; 19: 492-494.
- [106] Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol* 2010; 105: 1617-1624.
- [107] Moss EM, Batshaw ML, Solot CB, Gerdes M, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Wang PP. Psychoeducational profile of the 22q11.2 microdeletion: A complex pattern. *J Pediatr* 1999; 134: 193-198.
- [108] Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillesen-Kaesbach G, Wiczorek D, Hinkel GK, Tinschert S, Hoeltzenbein M. Spectrum of mutation in *PTPN11* and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 2002; 11: 201-206.
- [109] Nanjiani A, Hossain A, Mahgoub N. Patau syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2007; 19. 2: 201-202.
- [110] Nora JJ, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA. The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *Am J Dis Child* 1974; 1: 48-55.



- [111] Nowakowska B, Stankiewicz P, Obersztyn E, Ou Z, Li J, Chinault AC, Smyk M, Borg K, Mazurczak T, Cheung SW, Bocian E. Application of metaphase HR-CGH and targeted chromosomal microarray analyses to genomic characterisation of 116 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Med Genet* 2008; 146: 2361-2369.
- [112] Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e128.
- [113] Paduch DA, Fine RG, Bolyakov A, Kiper J. New concepts in Klinefelter syndrome. *Curr Opin Urol* 2008 Nov; 18: 621-627.
- [114] Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, Martinez Bermejo A, Fernández L, López Pajares I. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 2006 Mar; 69: 228-233.
- [115] Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A. Gain-of-function *RAF1* mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 2007; 39: 1007-1012.
- [116] Penrose LS. A clinical and genetic study of 1 280 cases of mental defect. *Medical Research Council Special Report Series* 1938: 229.
- [117] Pérez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 781-792.
- [118] Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, Bremer HJ. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *The Journal of clinical investigation* 1991; 8: 1169-1178.
- [119] Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med* 2010; Jan 21;362: 239-52.
- [120] Potocki L, Shaw CJ, Stankiewicz P, Lupski JR. Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith-Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genet Med* 2003; 5: 430-434.
- [121] Pueschel SM, Rynders JE. Down Syndrome. *Advances in Biomedicine and the Behavioral Sciences* 1982 Cambridge: Ware Press, P 11.
- [122] Quinlan KGR, Seto JT, Turner N, Vandebrouck A, Floetenmeyer M, Macarthur DG, Raftery JM, Lek M, Yang N, Parton RG, Cooney GJ, North KN. Alpha-

- actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. *Hum Molec Genet* 2010; 19: 1335-1346.
- [123] Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002; 25: 191-199.
- [124] Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2006; 43: 478-489.
- [125] Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, Kamisago M, Momma K, Katayama H, Nakagawa M. Germline gain-of-function mutations in *RAFI* cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39: 1013-1017.
- [126] Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, Li L, Yassin Y, Tamburino AM, Neel BG, Kucherlapati RS. Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39: 70-74.
- [127] Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, van den Ende J, Biervliet M, Eyskens F, van Goethem G, Laridon A, Ceulemans B, Courtens W, Kooy RF. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet* 2006 Jan; 69: 58-64.
- [128] Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2005 Jan; 6: 46-57.
- [129] Sagoo G, Butterworth A, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med* 2009; 11: 139-146.
- [130] Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, Yersak JM, Chakraborty PK, Hacker AM, Zackai EH, Ashley T, Emanuel BS. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Molec Genet* 2004; 13: 417-428.
- [131] Scambler PJ, Mari A, Diglio MC, Mingarelli R, Marino B, Giannotti A, Novelli G, Dallapiccola B. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2421-2426.
- [132] Schneider A, Hagerman RJ, Hessler D. Fragile X syndrome – from genes to recognition. *Dev Disabil Res Rev* 2009; 15: 333-342.

- [133] Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE. Germline *KRAS* mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2006; 38: 331-336.
- [134] Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000; 34: 297-329.
- [135] Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; 3: 642-650.
- [136] Shibata H, Huynh DP, Pulst SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 1303-1313.
- [137] Shimojima K, Inoue T, Fujii Y, Ohno K, Yamamoto T. A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. *Europ J Med Genet* 2009; 52: 433-435.
- [138] Siggberg L, Ala-Mello S, Jaakkola E, Kuusinen E, Schuit R, Kohlhase J, Bohm D, Ihnatus J, Knuutila S. Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients. *Am J Med Genet* 2010; 152A: 1398-1410.
- [139] Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M. Molecular cloning and mapping of human semaphorin F from the Cri-du-chat candidate interval. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 26: 242: 685-691.
- [140] Smith SEP, Zhou YD, Zhang G, Jin Z, Stoppel DC, Anderson MP. Increased Gene Dosage of Ube3a Results in Autism Traits and Decreased Glutamate Synaptic Transmission in Mice. *Sci Transl Med* 2011; 3(103): 103ra97.
- [141] Snow K, Doud LK, Hagerman R, Pergolizzi RG, Erster SH, Thibodeau SN. Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1217-1228.
- [142] Strelau J. Inteligencja człowieka. *Wydawnictwo „Żak”*, wydanie drugie poprawione 1997.
- [143] Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K., Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 2002; 17: 269-271.
- [144] Sucov HM. Molecular insights into cardiac development. *Ann Rev Physiol* 1998; 60: 287-308.
- [145] Suzuki M, West C, Beutler E. Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population. *Hum Genet* 2001; 109: 210-215.

- [146] Szczaluba K, Obersztyn E, Mazurczak T. Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia* 2010; 3: 108-116.
- [147] Szczapa J. *Neonatologia*. Warszawa: PZWL 2000
- [148] Śmigiel R, Stembalska A. Niepełnosprawność intelektualna uwarunkowana genetycznie - wybrane aspekty. *Nowa Pediatria* 2007; 4: 89-96.
- [149] Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, Brunner HG, Bertola DR, Crosby A, Ion A. *PTPN11* mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1555-1563.
- [150] Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, Pandit B, Oishi K, Martinelli S, Schackwitz W. Gain-of-function *SOS1* mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39: 75-79.
- [151] Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis* 2010; 11: 5-8.
- [152] Taylor MR, Jirikowic J, Wells C, Springer M, McGavran L, Lunt B, Swisshelm K. High prevalence of array comparative genomic hybridization abnormalities in adults with unexplained intellectual disability. *Genet Med* 2010; 12: 32-8.
- [153] Thiel C, Schwarz M, Hasilik M, Grieben U, Hanefeld F, Lehle L, von Figura K, Korner C. Deficiency of dolichyl-P-Man:Man-7-GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ig. *Biochem J* 2002; 367: 195-201.
- [154] Thompson PW, Devies SJ. Frequency of inherited deletions of 22q11.2. *J Med Genet* 1998; 35: 789-791.
- [155] Touraine RL, Zeniou M, Hanauer A. A syndromic form of X-linked mental retardation: the Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Pediatr* 2002; 161: 179-187.
- [156] Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ayala R, Tsai LH, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. 14-3-3-epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature Genet* 2003; 34: 274-285.
- [157] Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196-197.
- [158] Van Bon BWM, Koolen DA, Borgatti R, Magee A, Garcia-Minaur S, Rooms L, Reardon W, Zollino M, Bonaglia MC, De Gregori M, Novara F, Grasso R, and 19

- others. Clinical and molecular characteristics of 1qter microdeletion syndrome: delineating a critical region for corpus callosum agenesis/hypogenesis. *J Med Genet* 2008; 45: 346-354.
- [159] Van Buggenhout GJ, Trommelen JC, Brunner HG, Hamel BC, Fryns J. The clinical phenotype in institutionalised adult males with X-linked mental retardation (XLMR). *Ann Genet* 2001; 44: 47-55.
- [160] Van Buggenhout GJ, van Ravenswaaij-Arts C, Mieloo H, Syrrou M, Hamel B, Brunner H, Fryns JP. Dysmorphology and mental retardation: molecular cytogenetic studies in dysmorphic mentally retarded patients. *Ann Genet* 2001; 44: 89-92.
- [161] Van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet* 2002; 39: 546-553.
- [162] Vasconelos MM. Mental retardation. *J Pediatr* 2004; 80: 71-82.
- [163] Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1261-1270.
- [164] Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 995-1013.
- [165] Wentzel C, Fernstrom M, Ohrner Y, Anneren G, Thuresson AC. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Europ J Med Genet* 2008; 51: 501-510.
- [166] Williams CA. Neurological aspects of the Angelman syndrome. *Brain Dev* 2005; 27: 88-94.
- [167] Wilson DI, Cross IE, Wren C, Scambler PJ, Burn J, Goodship J. Minimum prevalence of chromosome 22q11 deletions. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 975.
- [168] Wilson HL, Wong AAC, Shaw SR, Tse W-Y, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall H, McDermid HE. Molecular characterization of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the

- major neurological symptoms. *J Med Genet* 2003; 40: 575-584.
- [169] Wilson LC, Leverton K, Oude Luttikhuis MEM, Oley CA, Flint J, Wolstenholme J, Duckett DP, Barrow MA, Leonard JV, Read AP, Trembath RC. Brachydactyly and mental retardation: an Albright hereditary osteodystrophy-like syndrome localized to 2q37. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 400-407.
- [170] Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 2003; 362: 1366-1373.
- [171] Yamagishi H. The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med* 2002; 51: 77-88.
- [172] Yu S, Kiehl M, Stegner AL, Kibiryeveva N, Bittel DC, Cooley LD. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the verification of genomic imbalances detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009; 13: 751-60.
- [173] Zhu JL, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Basso O, Olsen J: Paternal age and congenital malformations. *Hum Reproduction* 2005; 11: 3173-3177.
- [174] Zoll B, Wolf J, Lensing-Hebben D, Pruggmayer M, Thorpe B. Trisomy 13 (Patau syndrome) with an 11-year survival. *Clin Genet* 1993; 43. 1: 46-50.

