

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΝΕΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΉ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

ΜΕΛΙΚΙΔΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2011

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Τσέζου Ασπασία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή : Τσέζου Ασπασία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Ιατρικής Γενετικής, Βαμβακόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής Βιολογίας, Ανυφαντής
Γεώργιος Σπυρίδων Κλινικός Εμβρυολόγος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
• ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
• ΤΕΧΝΙΚΗ.....	6
• CNVs.....	7
• ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	10
• ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	12
• ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	18
• ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	22

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός που βασίζεται σε μικροσυστοιχίες (a – CGH) είναι μια πρωτοποριακή τεχνική που υιοθετήθηκε πριν από μερικά χρόνια στα εργαστήρια. Η τεχνολογική αυτή ανακάλυψη επιτρέπει τον εντοπισμό και την αξιολόγηση των αλλαγών των αντιγράφων στην αλληλουχία του γενωμικού DNA (CNVs), που σχετίζονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες αλλά και πολυμορφισμούς, με υψηλή αποτελεσματικότητα και ακρίβεια. Η μέθοδος αυτή έχει ως αρχή την εξέταση διαφορικά σημασμένων δειγμάτων DNA από «ασθενή» και άτομο αναφοράς, τα οποία έχουν υβριδοποιηθεί σε DNA στόχους (μικροσυστοιχίες) πάνω σε ειδικές πηγές, σε μια υάλινη επιφάνεια ή σταθερή πλατφόρμα. Σ' αυτήν την εργασία γίνεται αναδρομή σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες για να διαπιστώσουμε με ποιόν τρόπο η νέα αυτή εφαρμογή μετατρέπεται σταδιακά από ένα απλό ερευνητικό εργαλείο σε κατεξοχήν διαγνωστικό μέσο στον προγεννητικό έλεγχο. Τέλος παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής και γίνεται σύγκριση με την κλασική κυτταρογενετική σε μορφή συζήτησης. Παρόλα αυτά πριν καθιερωθεί δεν μπορεί να θεωρηθεί ως αποκλειστική μεθοδολογική προσέγγιση προγεννητικού ελέγχου και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την δεκαετία του '70 σε ζευγάρια με εγκυμοσύνες αυξημένου κινδύνου που μπορεί να οφείλονται σε οικογενειακό ιστορικό, προχωρημένη ηλικία μητέρας, παθολογικά βιοχημικά αποτελέσματα ή διάφορες δυσμορφίες που εντοπίστηκαν στον υπέρηχο, προσφερόταν η παραδοσιακή κυτταρογενετική ανάλυση για διάγνωση τυχόν γενετικών ανωμαλιών. Εν συντομία γίνεται λήψη και καλλιέργεια κυττάρων από αμνιακό υγρό (A.Y.) ή χοριακές λάχνες (CVs) και συλλογή τους μετά την διαίρεση στο στάδιο της μετάφασης. Τα μεταφασικά χρωμοσώματα αναλύονται από έμπειρους επιστήμονες οι ακολουθούν μεθόδους ενζυμικής πέψης και χρώσης (Ward *et al*, 1993; Evans *et al*, 1999; Terpperberg *et al*, 2001; Leug *et al*, 2004; Shaffer and Bui, 2007).

Η συμβατική μέθοδος κυτταρογενετικής, με τις G- ταινίες, παραμένει το 'golden standard' στην προγεννητική διάγνωση, όμως είναι μια διαδικασία χρονοβόρα και κοπιαστική. Απαιτούνται συνήθως 10 με 14 μέρες για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων, γεγονός που μπορεί να εντείνει το άγχος των γονέων. Η ανάγκη για αυξημένη ταχύτητα και ακρίβεια όσον αφορά την λήψη αποτελεσμάτων της χρωμοσωμικής ανάλυσης, χωρίς να απαιτείται καλλιέργεια κυττάρων οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνικών όπως ο ταχύς φθορίζον υβριδισμός (FISH), η ποσοτική φθορίζουσα PCR (QF- RCR) και Multiplex ligation- dependent probe amplification (MLPA), για να δοθούν συγκεκριμένες απαντήσεις στο πεδίο αυτό (Park *et al*, 2010). Οι εξελιγμένες αυτοί μέθοδοι χρησιμοποιούνται εκτενώς και σε συνδυασμό με την κλασική κυτταρογενετική για τον εντοπισμό κοινών χρωμοσωματικών ανευπλοειδιών όπως τρισωμία 21, 13, 18, και φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y. Το μειονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι μπορούν να εξεταστούν, κάθε φορά μόνο μερικές περιοχές και ότι η εφαρμογή τους απαιτεί φαινοτυπικές ενδείξεις π.χ. υπερηχογραφικά ευρήματα (Park *et al*, 2010).

Παρόλη την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της συμβατικής καρυοτύπισης, η κλασική κυτταρογενετική μπορεί να εντοπίσει αναδιατάξεις μεγέθους 5-10 Mb (με εξαίρεση τη G- banding, ανάλυση από 1-5 Mb) και όχι μικρές ελλείψεις ή διπλασιασμούς, στους οποίους οφείλονται σοβαρές κλινικές καταστάσεις όπως συγγενείς ανωμαλίες, νοητική στέρση και καθυστέρηση στην ανάπτυξη είτε στα εμβρυϊκά στάδια είτε μετά τη γέννηση (Hillman *et al*, 2010).

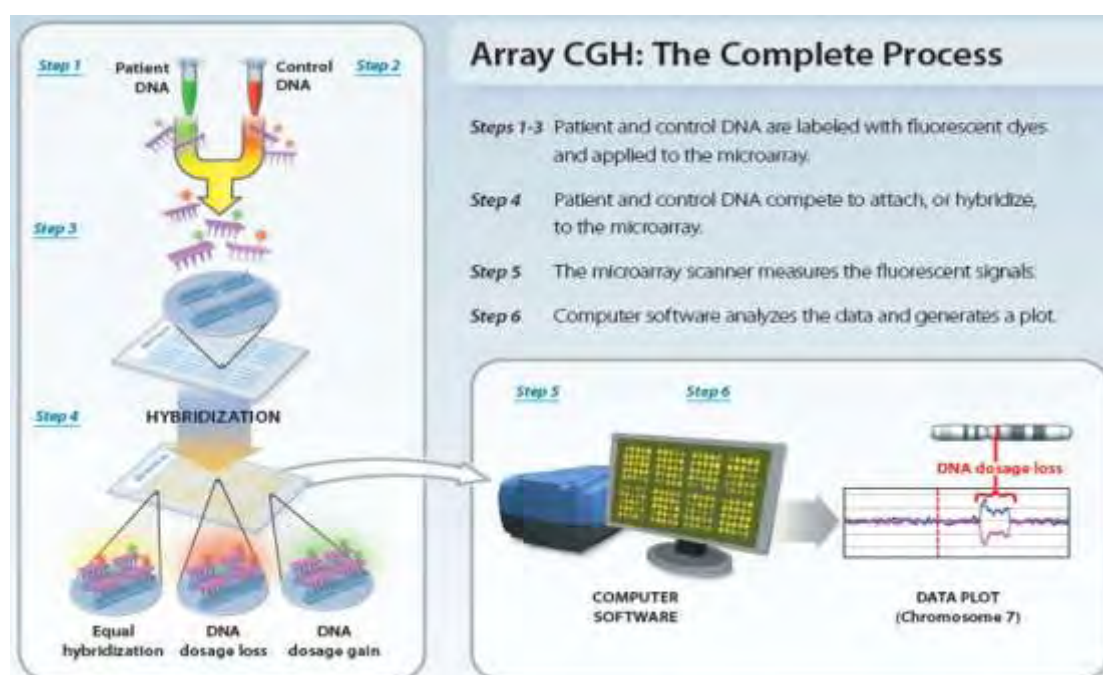
Για να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί στον προγεννητικό έλεγχο και να μπορούν να δοθούν γρήγορα αποτελέσματα με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, μια νέα τεχνική έχει εισαχθεί στον τομέα της προγεννητικής διάγνωσης, ο συγκριτικός υβριδισμός με μικροσυστοιχίες (array- Comparative Genomic Hybridization).

Η τεχνολογική αυτή καινοτομία επιτρέπει την αναγνώριση και τον εντοπισμό υποмикροσκοπικών ελλείψεων και διπλασιασμών οπουδήποτε στο γονιδίωμα, τόσο προγεννητικά όσο και μετά τη γέννηση (AGOG 2001,2009, Maya *et al*, 2010). Η a-CGH περιλαμβάνει την απομόνωση και την διαφορική, φθορισήμαση του γενωμικού DNA ενός 'ασθενή' και ενός δείγματος αναφοράς ενός υγιούς αρσενικού ή θηλυκού ατόμου με ταυτόχρονη υβριδοποίηση τους σε ισόποσα τμήματα DNA τα οποία αντιπροσωπεύουν το ανθρώπινο γονιδίωμα (Friedman, 2008). Η διαφορετική σήμανση αποκαλύπτει αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων τμημάτων του γονιδιώματος στο 'πάσχον' DNA σαν περιοχές μη ισότιμες όσον αφορά το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται σε σχέση με αυτό του δείγματος αναφοράς.

Το πλεονέκτημα της τεχνικής a-CGH σε σχέση με την συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση των G-ταινιών είναι η υψηλή αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εντοπίσει σε καθημερινή βάση, χρωμοσωμικές ελλείψεις ή διπλασιασμούς μεγέθους 0.05- 0.1 Mb (50 - 100 Kb) οπουδήποτε στο γονιδίωμα, μεγέθη 100 φορές μικρότερα από αυτά που ανιχνεύει η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση (Friedman 2009, Maya *et al*, 2010). Εκτός από αποτελεσματική είναι και γρήγορη γιατί δεν απαιτούνται μεγάλες ποσότητες δείγματος DNA για την διεξαγωγή αποτελεσμάτων, δεν χρειάζεται καλλιέργεια κυττάρων από αμνιακό υγρό ή από τις χοριακές λάχνες με αποτέλεσμα να γίνεται εξοικονόμηση χρόνου(Wells *et al*, 1999). Ακόμη, λόγω του γεγονότος ότι δεν απαιτείται πολλαπλασιασμός του δείγματος προς εξέταση, ενισχύεται η δυνατότητα προγεννητικής διάγνωσης μη επεμβατικά σε ελεύθερο εμβρυϊκό DNA που λαμβάνεται από το μητρικό πλάσμα ή εμβρυϊκά κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας (Bischoff *et al*, 2005).

ΤΕΧΝΙΚΗ

Τα array – CGH εφαρμόζονται με υβριδισμό ίσων ποσοτήτων DNA από ασθενή και φυσιολογικού DNA αναφοράς, τα οποία έχουν σημειωθεί με διαφορετικά φθοριοχρώματα, σε μικροσυστοιχίες οι οποίες περιέχουν πολλές χιλιάδες DNA στόχους. Οι DNA στόχοι είναι συνήθως ολιγονουκλετιδικά, αλλά και BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) ή άλλα είδη DNA κομματιών. Το DNA δείγμα από άτομο που εξετάζεται, σημαίνεται με ένα φθοριόχρωμα πχ. κόκκινο και το φυσιολογικό DNA δείγμα αναφοράς με ένα άλλο πχ. πράσινο φθοριόχρωμα. Στη συνέχεια γίνεται ταυτόχρονη υβριδοποίηση των ίσων ποσοτήτων DNA σε μια πηγή που περιλαμβάνει κομμάτια DNA που αντιστοιχούν και αντιπροσωπεύουν όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα. Η διαφορετική σήμανση με φθοριοχρώματα αποκαλύπτει αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων, προσθήκες ή ελλείψεις στο DNA του ασθενή, τα οποία φαίνονται ως περιοχές με άνιση εκπομπή, όσον αφορά το φθορίζον σήμα σε σχέση με αυτό που εκπέμπει το δείγμα αναφοράς. Στη συνέχεια τα σήματα που εκπέμπονται αναλύονται σε κατάλληλο λογισμικό και τα αποτελέσματα δίνονται ως καμπύλες περιελισσόμενες σε \log_2 αναλογία. Περιοχές που εμφανίζονται ως φυσιολογικές στον ασθενή έχουν ένα ουδέτερο χρώμα (κίτρινο), οι ελλείψεις φαίνονται ως ένα πράσινο χρώμα ενώ οι διπλασιασμοί ως κόκκινο, λόγω του έξτρα φθοριοχρώματος που εκπέμπεται (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Περιγραφή της τεχνικής του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού. Βήματα 1-3: σήμανση των δύο δειγμάτων DNA διαφορετικά φθοριοχρώματα, βήμα 4: υβριδισμός των σημασμένων δειγμάτων με τις μικροσυστοιχίες, βήματα 5-6: ανάλυση του εκπεμπόμενου φθορισμού με ειδικό λογισμικό και διεξαγωγή αποτελεσμάτων.

CNVs- Copy Number Variations

Οι διάφορες αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (copy number variation- CNVs) τμημάτων του γενετικού υλικού είναι μια μεγάλη πηγή που προκαλεί γενετική ποικιλομορφία στον πληθυσμό. Οι μετατροπές αυτές μπορεί να υπάρχουν ως φυσιολογικοί πολυμορφισμοί ή να προκαλούν κλινικό φαινότυπο, γενετική διαταραχή, σποραδικές ασθένειες, και πολύπλοκα χαρακτηριστικά. Τα CNVs προκύπτουν από γενωμικές αναδιατάξεις που μπορεί να είναι απλές ελλείψεις ή διπλασιασμοί τμημάτων του γονιδιώματος ή να είναι μια πιο περίπλοκη αλλαγή. Ουσιαστικά είναι 'προσθήκες' και απώλειες (gains and losses) γενετικού υλικού σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος.

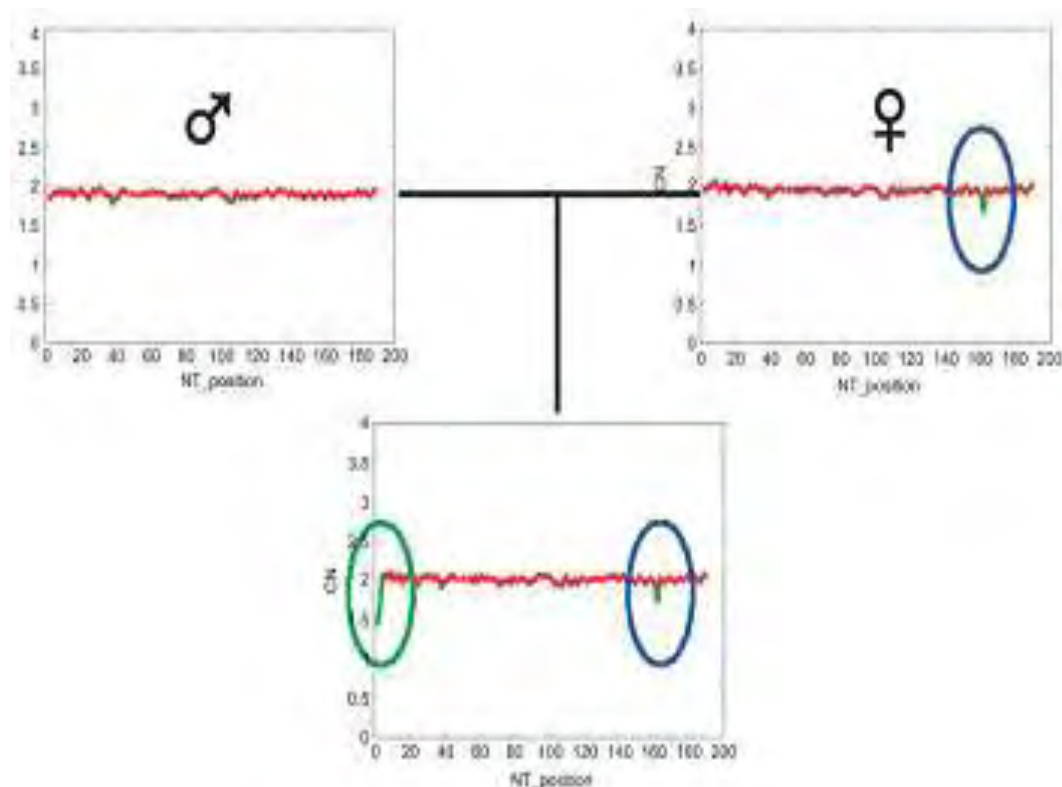
Είναι γνωστό πως το ανθρώπινο γονιδίωμα φέρει πολλές θέσεις των οποίων οι αλλαγές συμβάλλουν στην ποικιλομορφία (π.χ. SNPs). Πρόσφατα με την εξελιγμένη τεχνολογία των a-CGH βρέθηκαν νέα CNVs και σύμφωνα με τις στατιστικές αναλύσεις που έγιναν τον Μάρτιο 2009, πάνω από 38000 νέες δομικές αλλαγές που συμμετέχουν στην ποικιλομορφία, έχουν καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων (DGV)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα CNVs μπορεί να αντιπροσωπεύουν μη παθολογικούς πολυμορφισμούς ή να εμφανίζουν κλινικό φαινότυπο όπως για παράδειγμα νοητική καθυστέρηση ή άλλες δυσμορφίες που θα μπορούσαν να αποβούν μοιραίες για το έμβρυο. Για παράδειγμα, CNVs ελλείψεις που διαταράσσουν λειτουργικά γονίδια μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις που καταστρέφουν την δράση των γονιδίων αυτών.

Το ζήτημα που προκύπτει είναι πως μπορεί να γίνει διαχωρισμός των μη παθολογικών CNVs από αυτά που προκαλούν παθογένεια έτσι ώστε ο κλινικός ιατρός που παρακολουθεί μια εγκυμοσύνη υψηλού κινδύνου να έχει την δυνατότητα να δώσει ακριβείς απαντήσεις και τις κατάλληλες συμβουλές στους γονείς (Zhang *et al*, 2009). Έχει εκτιμηθεί πως το 1/50 του ανθρώπινου γονιδιώματος περιέχει αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων των DNA τμημάτων (lafrate *et al*, 2004, Carter, 2007). Θεωρητικά τα CNVs αποτελούν αλληλουχίες που το μέγεθος τους είναι τουλάχιστον 1Kb και αν όντως αποτελούν απλούς πολυμορφισμούς πρέπει να εμφανίζονται στον πληθυσμό σε ποσοστό 1% (Scherer *et al*, 2007). Συνήθως αποτελούνται από αρκετά νουκλεοτίδια και όχι ένα όπως τα SNPs (Levy *et al*, 2007; Wheeler *et al*, 2008) και έχει βρεθεί πως το κάθε άτομο μπορεί να είναι φορέας τριών ή παραπάνω τέτοιων πολυμορφισμών (de Vries BB *et al*, 2005; Sebat *et al*, 2004). Τα περισσότερα από αυτά συνήθως κληρονομούνται από τους γονείς και δεν προκαλούν παθογένεια ενώ κάποια εμφανίζονται *de novo*.

Η αξιολόγηση για το αν ένα CNV είναι παθογόνο ή μη γίνεται με βάση το πρότυπο κληρονόμησης και την σύγκριση γονοτύπου με φαινότυπο (Lee *et al*, 2007). Μια

νέα χρωμοσωματική αναδιάταξη που αποκαλύπτεται με την a-CGH μέθοδο σε ένα δείγμα αρχικά συγκρίνεται με τον γονότυπο των γονέων. Αν φυσιολογικοί γονείς φέρουν την ίδια αλλαγή, το πιθανότερο είναι αυτή να είναι μη παθογόνα. Η επιβεβαίωση μπορεί να γίνει και από βάσεις δεδομένων των CNVs (DGV, DECIPHER, DatabasE, Ensemble) εφόσον έχει εξεταστεί και αναλυθεί σε άλλο δείγμα και έχει καταχωρηθεί. Υπάρχει όμως και το ενδεχόμενο το CNV να εμφανίζεται *de novo*. Αν το έμβρυο που το φέρει εμφανίζει κάποια κλινική ένδειξη π.χ. κάποια δυσμορφία και έχει γονείς υγιείς με φυσιολογικό καρυότυπο, είναι πολύ πιθανό η συγκεκριμένη αλλαγή να είναι παθογόνα και αιτία του φαινοτύπου (εικόνα 2). Φυσικά και υπάρχουν εξαιρέσεις όπου μερικά *de novo* CNVs είναι φυσιολογικά (Redon *et al*, 2006; Lupski *et al*, 2007; Scbat *et al*, 2007) και κάποια που κληρονομούνται από υγιείς γονείς και είναι παθογόνα.



Εικόνα 2. Ένα μη παθογόνο CNV, το οποίο κληρονομήθηκε από ανεπηρέαστη μητέρα (μπλε οβάλ) και ένα παθογόνο *de novo* CNV που παράγει 3.1 Mb έλλειψη του χρωμοσώματος 4p16.3 (πράσινο οβάλ) σε παιδί με νοητική στέρωση.

Αδιάσειστο στοιχείο ότι ένα CNV είναι παθογόνο αν είναι γνωστό ότι το συγκεκριμένο προκαλεί γνωστό σύνδρομο ή διαταραχή με γνωστό φαινότυπο. Είναι επίσης πολύ πιθανό ένα CNV να είναι παθολογικό αν η αλληλουχία με τις ελλείψεις/ διπλασιασμούς εμπεριέχει κάποιο γονίδιο του οποίου η λειτουργικότητα είναι γνωστή και γνωρίζουμε πως η αδρανοποίηση του (CNV loss) ή η υπερέκφρασή του (CNV gain) προκαλεί συγκεκριμένο φαινότυπο.

Η συσχέτιση γονοτύπου φαινοτύπου γίνεται με την αναγνώριση ενός κλινικού συνδρόμου ανάμεσα στα παιδιά που φέρουν τις ίδιες συγγενείς ανωμαλίες και στην συνέχεια αναγνώριση της επανεμφανιζόμενης γενετικής ανωμαλίας στους ασθενείς που φέρουν το συγκεκριμένο σύνδρομο. Έχει αποδειχτεί με την a-CGH μέθοδο πως υπομικροσκοπικές αναδιατάξεις που δεν έχουν εντοπιστεί ή αναγνωριστεί από προηγούμενη κλινική εξέταση μπορούν να τα φέρουν άτομα με τα ίδια CNVs (Friedman 2009). Τέλος, η καταφυγή στις βάσεις δεδομένων με τις υπομικροσκοπικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις βοηθά στον συσχετισμό γονοτύπου με τον φαινότυπο.

Η γενετική σύσταση της αλληλουχίας των CNVs μπορεί επίσης να δίνει πληροφορίες για την παθογένειά τους. Για παράδειγμα, αν εμπεριέχει γονίδια που η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, οι αναδιατάξεις στον αριθμό των αντιγράφων (ελλείψεις/ διπλασιασμοί) των τμημάτων DNA, μπορούν να διαταράξουν τον φυσιολογικό φαινότυπο και να προκαλέσουν παθογένεια. Τα CNVs που είναι > 1Mb γενικά είναι πιο πιθανό να προκαλούν κάποια διαταραχή σε σχέση με τα μικρά (< 0.1Mb) γιατί υπάρχει μεγαλύτερο ενδεχόμενο οι μεγάλες περιοχές να είναι πλούσιες σε γονίδια(Lee *et al*, 2007; Vermeesch *et al*, 2007). Τέλος η κλινική εμπειρία έχει δείξει πως οι ελλείψεις είναι πιο πιθανό να είναι παθογόνες από τους διπλασιασμούς (Lee *et al*, 2007).

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ- Arrays

Οι μικροσυστοιχίες (arrays) που χρησιμοποιούνται στον γενωμικό υβριδισμό (a-CGH) σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχουν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία για τον εντοπισμό των κλινικά σημαντικών μη ισορροπημένων χρωμοσωματικών ανωμαλιών, μειώνοντας ταυτόχρονα την ανίχνευση των μη παθογόνων αλλαγών ή αυτών με ασαφή κλινική αξία (Cheung *et al* 2005; Roa *et al* 2005; Sahoo *et al* 2006; Lu *et al* 2007).

Η αποτελεσματικότητα των arrays εξαρτάται από τον αριθμό και τον τύπο (μέγεθος και σύσταση) των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται και τον τρόπο που διανέμονται στο γονιδίωμα (Friedman, 2009). Σχηματίζονται από πληθώρα DNA υποστρωμάτων τα οποία μπορεί να είναι ολιγονουκλεοτίδια και BACs (Bacterial Artificial Chromosomes). Τα BACs έχουν μέγεθος περίπου 150.000bp ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια 20-60bp, συνεπώς τα φθορίζοντα σήματα που εκπέμπονται κατά τον υβριδισμό των πρώτων είναι μεγαλύτερα σε σχέση με τα δεύτερα. Το μέγεθος του σήματος εξαρτάται επίσης από την DNA σύσταση των ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές συγκεκριμένου μεγέθους που περιέχουν μοναδικές αλληλουχίες αναμένεται να έχουν υψηλή αναλογία σήματος σε σχέση με αυτά που περιέχουν σημαντικό ποσό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Τα BACs πάντα έχουν μερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια συνήθως συντίθενται με μοναδικές αλληλουχίες.

Τα BACs χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος και για χαρτογράφηση των γονιδίων (Van den Veyver *et al*, 2006). Η πρώτη γενιά των BAC arrays περιείχαν ανιχνευτές τοποθετημένους σε απόσταση συνολικά 1 Mb, τα νεότερα περιέχουν 300.000 αλληλεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές που εκτείνονται σε όλο το γονιδίωμα (de Vries BB *et al*, 2005; Ishkanian *et al*, 2004), αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των BAC arrays, τα οποία θεωρητικά μπορούν να εντοπίσουν ελλείψεις και διπλασιασμούς μεγέθους 100- 200 Kb (όσο είναι το μέγεθος ενός BAC).

Οι μικροσυστοιχίες που αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια στην αρχή χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση των SNPs στην χαρτογράφηση γονιδίων και σύμφωνα με στατιστικές αναλύσεις μπορούν επίσης να εντοπίσουν με μεγάλη αξιοπιστία CNVs προσθήκες και απώλειες (Nannya Y *et al*, 2005; Huang J *et al*, 2004; Janne PA *et al*, 2004). Μπορούν να αναλυθούν > 100.000 SNPs τοποθετημένους σε απόσταση 26 Kb (Slater HR *et al*, 2005) και πρόσφατα αναπτύχθηκαν μικροσυστοιχίες με 500.000 SNPs, με μέσο διάστημα 6 Kb, μειώνοντας ακόμη παραπάνω το μέγεθος των ελλείψεων και διπλασιασμών που ανιχνεύονται. Οι μικροσυστοιχίες αυτές εκτός από απώλειες και διπλασιασμούς στο γονιδίωμα μπορούν να ανιχνεύσουν μονογονεϊκές δισωμίες , εφόσον ελέγχονται και οι γονείς (Slater HR *et al*, 2005; Baptista J *et al*, 2005) και μητρική κυτταρική

πρόσμιξη εφόσον υπάρχει. Λειτουργεί και σαν τεστ πατρότητας αν το CNV του εμβρύου είναι *de novo* ή κληρονομείται από υγιή γονέα. Αν σχεδιαστούν οι μικροσυστοιχίες αυτές με τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να αποκαλυφθούν *de novo* σημειακές μεταλλάξεις για γνωστές γενετικές ασθένειες (π.χ. αχονδροπλασία). Δεν μπορούν ακόμα να ανιχνευθούν αλλαγές σε μέγεθος ενός εξωνίου ή μικρών γονιδίων. Μπορούν όμως, με τα κατάλληλα arrays, ειδικά για συγκεκριμένα γνωστά γονίδια, να αναγνωριστούν ασθένειες όπως Duchenne μυϊκή δυστροφία (Dhami P *et al*, 2005).

Οι μικροσυστοιχίες χωρίζονται σε αυτές που σαρώνουν όλο το γονιδίωμα (whole – genome), όπου περιέχουν κλώνους που παρέχουν εκτενή κάλυψη, έστω και αυθαίρετα, σε όλο το γονιδίωμα (Snijders AM *et al*, 2001; Shaw Smith C *et al*, 2004) και στις στοχευμένες (targeted- arrays) οι οποίες σχεδιάζονται για κάλυψη συγκεκριμένων περιοχών με γνωστή κλινική σημασία (Park *et al*, 2010). Τα whole – genome είναι πολύτιμα για screening του γονιδιώματος όσον αφορά την εξερεύνηση για ελλείψεις ή διπλασιασμούς, με πρωτοφανή αποτελεσματικότητα. Μπορούν να αναγνωρίσουν όχι μόνο παθογόνα CNVs αλλά και πολυμορφισμούς ή CNVs που δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα (Van den Veyver *et al*, 2009). Τα targeted- arrays σχεδιάζονται για μελέτη συγκεκριμένου χρωμοσώματος (Buckley *et al*, 2002; Veltman *et al*, 2004) ή χρωμοσωμικού τμήματος (Ballif *et al*, 2003; Saw *et al*, 2004) ή για αναγνώριση και αξιολόγηση συγκεκριμένης DNA δοσολογίας σε άτομα με υποψία για μικροελλείψεις (Bejjani *et al*, 2005) ή υποτελομερικές αναδιατάξεις (Veltman *et al*, 2002). Με τα targeted- arrays μειώνεται ο εντοπισμός των μη παθογόνων και με ασαφή κλινική σημασία CNVs και περιορίζεται στις περιοχές για τις οποίες σχεδιάστηκε.

Οι παραπάνω μικροσυστοιχίες που εξερευνούν όλο το γονιδίωμα, ναι μεν έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα και δυνατότητα να εντοπίζουν μεγάλο αριθμό CNVs όμως αυξάνουν και τον κίνδυνο λήψης αποτελεσμάτων με αδιευκρίνιστων με αποτέλεσμα να απαιτείται παραπάνω χρόνος για την ερμηνεία τους εντείνοντας παράλληλα την αγωνία των γονέων που τα αναμένουν. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως μια πιο στοχευμένη προσέγγιση στην διερεύνηση του γονιδιώματος για άτομα με υποψία για χρωμοσωματική ανωμαλία, θα ήταν καταλληλότερη και πιο εφαρμόσιμη στην προγεννητική κλινική διάγνωση.

ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Η τεχνική a-CGH, αρχικά εφαρμόστηκε στην ανάλυση των αλλαγών του αριθμού των αντιγράφων σε όγκους και καρκινικά κύτταρα για την εύρεση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την παθογένεια των καρκίνων (Albetson *et al* 2003). Πρόσφατα ωστόσο, οι μικροσυστοιχίες αυτές άρχισαν να εφαρμόζονται στην κλινική κυτταρογενετική για να εντοπιστούν οι περιοχές και το μέγεθος των υπομικροσκοπικών CNVs με σκοπό την συσχέτιση των αναγνωρισμένων μικροελλειψεων/ μικροδιπλασιασμών με τον κλινικό φαινότυπο που έχει παρατηρηθεί (Klein *et al*,2004; Saw- Smith *et al*, 2004; Vissers *et al*, 2003).

Διαπιστώνοντας πόσο αποτελεσματική είναι η μέθοδος αυτή προσπάθησαν οι διάφορες επιστημονικές ομάδες, να την χρησιμοποιήσουν στο προγεννητικό έλεγχο, για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών ανωμαλιών που δεν μπορούσαν να αναγνωριστούν με τις προηγούμενες τεχνικές κυτταρογενετικής και μοριακής ανάλυσης. Οι πρώτες έρευνες έγιναν σε 41 δείγματα από ιστό αποβληθέντων εμβρύων (Schaeffer *et al*, 2004). Χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες συμπληρωματικές για όλα τα τελομερή, όλες τις γνωστές μικροελλείψεις που προκαλούν γνωστά σύνδρομα και για περιοχές τυχαίες, σκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα. Οι ιστοί αυτοί είχαν προηγουμένως καρυοτυπηθεί με G-banding. Τα αποτελέσματα των a-CGH ήταν ίδια με την κλασική καρυοτύπηση και βρέθηκαν επιπλέον υπομικροσκοπικές αναδιατάξεις(9.8%) σε σχέση με την πρώτη, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν με FISH (Schaeffer *et al*, 2004).

Τα CGH arrays χρησιμοποιήθηκαν και σε γυναίκες που παρουσιάζουν υψηλού κινδύνου εγκυμοσύνες με ενδείξεις την ηλικία της μητέρας, παθολογικές βιοχημικές εξετάσεις ή υπερηχογραφικά ευρήματα (Sahoo *et al*, 2006) και που υποβλήθηκαν σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (98 δείγματα από αμνιακό υγρό και χοριακές λάχνες) με την κλασική καρυοτύπηση. Η έρευνα αυτή διεξήχθη για να δείξουν την αποτελεσματικότητα της a- CGH και την δυνατότητα της να αποτελέσει μελλοντικά το βασικότερο εργαλείο προγεννητικού ελέγχου. Σχεδιάστηκαν μικροσυστοιχίες με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για περιοχές που η διαταραχή τους προκαλεί γνωστά σύνδρομα και έχουν αποκλειστεί περιοχές που αποφέρουν αβέβαια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σε GenePix Pros software και log2 αναλογία. Οι μικροσυστοιχίες στην αρχή εφαρμόστηκαν σε 1500 δείγματα από αίμα (Cheung *et al*, 2005) και μετά σε 12 δείγματα από αμνιακό υγρό ή χοριακές λάχνες, με παθολογικό καρυότυπο. Πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε μικροποσότητες (WGA- Whole Genome Amplification) και τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με την προηγούμενη εξέταση. Βρέθηκαν 4 περιπτώσεις με τρισωμία 21 και μια μη ισορροπημένη μετάθεση, επίσης ανιχνεύτηκαν 43% CNVs φυσιολογικά και άγνωστης κλινικής σημασίας, για την ερμηνεία των τελευταίων απαιτήθηκε εξέταση γονέων.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε δείγματα χωρίς κάποια προηγούμενη ένδειξη. Τα αποτελέσματα και εδώ συμφωνούσαν με την κλασική μέθοδο. Για την a-CGH τεχνική δείγμα λήφθηκε από Α.Υ. και Χ.Λ. τα κύτταρα των οποίων δεν είχαν καλλιεργηθεί με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί σημαντική μείωση του χρόνου διεξαγωγής των αποτελεσμάτων (6 μέρες) σε σχέση με G-banding (16 μέρες). Για τα επιπλέον CNVs που βρέθηκαν έγινε επαλήθευση με FISH. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει την ικανότητα των μικροσυστοιχιών να παρέχουν προγεννητική διάγνωση, σε καλλιεργημένα και μη κύτταρα και θεωρείται προς το παρόν κατάλληλο για έλεγχο μόνο των εγκυμοσυνών υψηλού κινδύνου (Sahoo *et al*, 2004).

Το 2009 ο Coppinger *et al* διεξήγαγαν έρευνα χρησιμοποιώντας a-CGH, σε γυναίκες με εγκυμοσύνες που παρουσίαζαν ενδείξεις για ανωμαλία (αυξημένη ηλικία της μητέρας, μη φυσιολογικές εξετάσεις 1^{ου} τριμήνου) αλλά όχι γνωστή γενετική ασθένεια ή κάποιο οικογενειακό ιστορικό. Χρησιμοποίησαν whole –genome arrays και targeted- arrays (BAC ή oligo-based μικροσυστοιχίες) για εντοπισμό μικροελλείψεων, μικροδιπλασιασμών, ανευλοειδιών, μη ισορροπημένων μεταθέσεων και υποτελομερικών και περικεντρομερικών αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων. Περιοχές για μη παθολόνα CNVs αποκλείστηκαν. Τα αποτελέσματα και σε αυτή την περίπτωση επαληθεύτηκαν με FISH. Με τις μικροσυστοιχίες σάρωσης όλου του γονιδιώματος αναγνωρίστηκαν 7/182 (3.8%) κλινικής σημασίας αναδιατάξεις(πίνακας 1), 2/7 περιπτώσεις εντοπίστηκαν και με την συμβατική καρυοτύπηση επομένως το ποσοστό ανίχνευσης των μικροσυστοιχιών, αποκλειστικά, έπεσε στο 2.7% (5/182).

CNVs	Οικ. Ιστορικό N=17	Άγχος N=3	Ανώμαλο U/S N=155	Ηλικία μητέρας N=5	Μη φυσιολ. Βιοχημικές N=2	Όλα N=182	%
Κλινικής σημασίας	0	0	6	0	1	7	3.8
Άγνωστης κλινικής σημασίας	0	0	1	0	0	1	0.5
Φυσιολογικά	0	0	13	3	0	16	8.8

Πίνακας 1. Αριθμός και είδος των χρωμοσωμικών αλλαγών που εντοπίστηκαν ανά ένδειξη προς μελέτη σε 182 προγεννητικά δείγματα που υποβλήθηκαν για ανάλυση με μικροσυστοιχίες σάρωσης όλου του γονιδιώματος.

Με τις στοχευμένες μικροσυστοιχίες, σε συνδυασμό με πληροφορίες από προηγούμενες μελέτες, το ποσοστό ανίχνευσης των κλινικά σημαντικών αναδιατάξεων ήταν 0.9% και αυτών με άγνωστη κλινική σημασία 0.5% (πίνακας 2) Το συμπέρασμα της έρευνας είναι πως τα a-CGH έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα με την κλασική καρυοτύπηση μόνο που παρέχουν επιπλέον πληροφορίες και ευρήματα. Ακόμη, τα αποτελέσματα δίνονται με πιο σαφή τρόπο, διεξάγονται γρήγορα και υπάρχει ακριβής πληροφορία για το μέγεθος της αλλαγής.

Είδος χρωμοσ. Αλλαγής	Coppinger 2009 N=62	Shaffer 2008 N=151	Συνδυασμός N=213	%
Καμία αλλαγή	57	136	193	90.6
Κλινικής σημασίας	0	2	2	0.9
Άγνωστης κλινικής σημασίας	0	1	1	0.5
Φυσιολογική	5	12	17	8.0

Πίνακας 2. Περιπτώσεις χρωμοσωμικών ανωμαλιών από δύο μελέτες σε δείγματα για προγεννητικό έλεγχο με στοχευμένες μικροσυστοιχίες.

Παρόμοια έρευνα πραγματοποιήσαν και οι Van den Veyner *et al* 2009. Εφάρμοσαν την a-CGH μέθοδο σε 300 δείγματα για προγεννητικό έλεγχο από τα οποία τα 58 (19.3%) εμφάνισαν CNVs. Από αυτά, τα 40 (13.3%) ερμηνεύτηκαν ως μη παθολογικά, με τα 39 να έχουν κληρονομηθεί από έναν φυσιολογικό γονέα και το ένα να έχει εμφανιστεί *de novo*, το οποίο ήταν γνωστό και έχει συναντηθεί πολλές φορές σε άλλα δείγματα. Από τα υπόλοιπα CNVs που απομείνανε τα 15(5%) ήταν σημαντικής κλινικής αξίας: 1/15 είχαν μη φυσιολογικό καρυότυπο, το οποίο ήταν γνωστό πριν την a-CGH ανάλυση είτε επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα από a-CGH με άλλη τεχνική και τα 4/15 που απομένουν, κληρονομήθηκαν από γονείς που ήταν φορείς μιας αναδιάταξης. Τα 2/58 είχαν *de novo* CNVs τα οποία δεν είχαν καταχωρηθεί ούτε βρέθηκαν στις βάσεις δεδομένων με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ερμηνευτούν αλλά υπήρχαν υπερηχογραφικά ευρήματα και 1/5 σε πολύ μεγάλη έλλειψη (5,1 Mb). Διαγνώστηκαν επίσης και χρωμοσωμικοί δείκτες: 2 δακτυλιοειδή χρωμοσώματα 12, 1 δακτυλιοειδές χρωμόσωμα 21 και ένας δείκτης με δορυφόρους που προερχόταν από το χρωμόσωμα 22. Οι δείκτες αυτοί συνέβαλαν στην εμφάνιση πολλών περιπτώσεων μωσαϊκισμού, οι οποίοι είναι

δύσκολο να αναγνωριστούν με τις γνωστές τεχνικές κυτταρογενετικής διάγνωσης. Παρόλο που το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων (59%) που εμφανίζουν χρωμοσωμικούς δείκτες είναι μωσαϊκά (Crolla *et al*, 2005), όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές, οι μικροσυστοιχίες μπορούν να ανιχνεύσουν το 15% αυτών (Ballif *et al*, 2006; Ballif *et al*, 2007; Cheung *et al*, 2007).

Η εφαρμογή της a-CGH αναλύσεις σε έμβρυα με υπερηχογραφικά ευρήματα μπορεί να βελτιώσει την διάγνωση των γενετικών διαταραχών γιατί βρέθηκε ότι, σε έμβρυα με πολλές δυσπλασίες, η a-CGH ανάλυση βοηθά στην αναγνώριση γενετικών αναδιατάξεων που δεν έχουν παρατηρηθεί με την κλασική καρυοτύπηση (Le Caignec *et al* 2005, Shaffer *et al* 2008). Θεωρήθηκε πως η a-CGH μέθοδος θα μπορούσε να προσφέρει παραπάνω πληροφορίες για κάθε διαταραχή που αναγνωρίστηκε με τον υπέρηχο εάν εφαρμοστεί σε έμβρυα με φυσιολογικό καρυότυπο και υπερηχογραφικά ευρήματα, συγκεκριμένα οι μικροσυστοιχίες έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν 10% επιπλέον αναδιατάξεις στις περιπτώσεις αυτές (Coppinger *et al*, 2009; Van den Veyver *et al*, 2009; Evagelidou *et al*, 2010; Tyreman *et al*, 2009). Θεωρείται η καταλληλότερη τεχνική διάγνωσης για εγκυμοσύνες με υπερηχογραφικά ευρήματα και φυσιολογικό καρυότυπο (πίνακας 3).

	U/S Ευρήματα	Κλινικής σημασίας	Άγνωστης σημασία/φυσιολογικά
Coppinger <i>et al</i> 2009	155/182 85.2%	6/155 3.9%	14/155 9%
Van den Veyver 2009	84/300 28%	4/84 4.8%	0
Tyreman <i>et al</i>	35/106 33%	10/35 28%	25/35 71%
Maya <i>et al</i> 2010	102/254 38%	2/102 2%	0
Evagelidou <i>et al</i> 2010	15/25 60%	2/25 8%	13/25 52%

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικός πίνακας με μελέτες σε δείγματα με φυσιολογικό καρυότυπο και υπερηχογραφικά ευρήματα

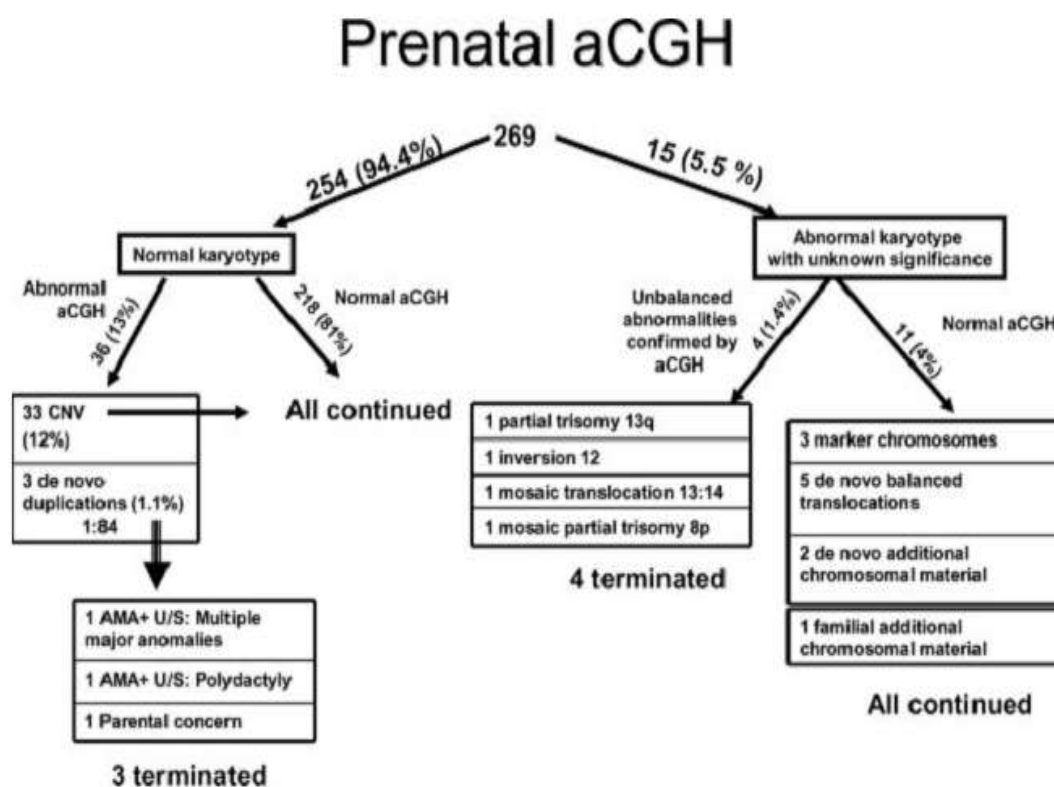
Η αξία της a-CGH μεθόδου στον προγεννητικό έλεγχο αποσαφηνίζεται και με την διαγνωστική της ικανότητα στις περιπτώσεις με πολλαπλές δυσμορφίες, το ποσοστό των οποίων ανέρχεται στο 3% των ζώντων νεογνών (πίνακας 4). Η συμβατική

καρυοτύπηση μπορεί να εντοπίσει το 6% (Kalter *et al*, 1983) αυτών των χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Στην προγεννητική διάγνωση, 9-35% των περιπτώσεων με δυσμορφίες, εμφανίζει παθολογικό καρυότυπο (Wilson *et al*, 1992; Rizzo *et al*, 1996; Tseng J-J *et al*, 2006) και παρόλο που έχουν εξελιχθεί αρκετά οι μέθοδοι διάγνωσης, η εύρεση της ακριβούς αιτιολογίας πολλών από αυτές τις περιπτώσεις παραμένει αδύνατη (Knight SJ *et al*, 1999; Moore KL *et al*, 2008). Το 10-12% των ατόμων με δυσμορφίες παρουσιάζουν υπομικροσκοπικές αναδιατάξεις που μπορούν να αναγνωριστούν από τις μικροσυστοιχίες (Miller DT *et al*, 2010; Sagoo GS *et al*, 2009). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως οι μικροσυστοιχίες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν περίπου 8% παραπάνω δομικές και ανατομικές ανωμαλίες σε στάδιο προγεννητικού ελέγχου (Kleeman *et al*, 2009; Vialard *et al*, 2009; Valduga *et al*, 2010; Faas *et al*, 2010; D'Amours *et al*, 2011). Παρόλο που οι Valduga *et al* συμμερίζονται τα παραπάνω και συνέβαλλαν μάλιστα στον εμπλουτισμό των βάσεων δεδομένων όσον αφορά τα CNVs, συμπέραναν πως για να σχεδιαστούν οι κατάλληλες μικροσυστοιχίες αποκλειστικά για εφαρμογή στον προγεννητικό έλεγχο χρειάζονται παραπάνω έρευνες. Οι Evangelidou *et al* 2010 κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα παρόλο που απαρίθμησαν τα πλεονεκτήματα της a-CGH τεχνικής.

Μελέτη	Καρυό τυπος	Κριτήρια	Μικ/χιες	Παθογόνα	Άγνωστης σημαν.
Kleeman 2009	Φυσιολογικό	Συγκεκ.δομικές δυσμορ.	targeted	2% (1/50)	2% (1/50)
Vialard 2009	Φυσιολογικό	> 2 δυσμορφίες	targeted	8.1% (3/37)	2.7% (1/37)
Valduga 2010	Φυσιολογικό	>3 συγκεκριμένες δυσμορφίες	whole	10% (5/50)	0%(0/50)
Faas 2010	Φυσιολογικό	Συγκεκ. Δομ. Ανωμαλία	whole	12.5% (4/32)	3.1%(1/32)
D'Amours 2011	Φυσιολογικό	> 1 δυσμορφία u/s	whole	8.2% (4/49)	12.2%(6/49)

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας με μελέτες στον προγεννητικό έλεγχο σε δείγματα από νεογνά και έμβρυα με πολλαπλές δυσμορφίες.

Οι Maya *et al* 2010 εφάρμοσαν τα a-CGH arrays σε δείγματα από γυναίκες με υψηλού και χαμηλού κινδύνου εγκυμοσύνες, σε δείγματα με φυσιολογικό και σε μη φυσιολογικό καρυότυπο. Έχει προηγηθεί εξέταση των δειγμάτων με G- banding. (εικόνα 3). Η υπεροχή της a-CGH έναντι των συντηρητικών μεθόδων της κυτταρογενετικής και μοριακής ανάλυσης ήταν εμφανής. Εντόπισε σε όλο το δείγμα 13% CNVs με φυσιολογικό καρυότυπο από τα οποία 1.1% εμφάνιζαν κλινικής σημασίας αναδιατάξεις. Από τα δείγματα με μη φυσιολογικό καρυότυπο (5.5%) το 4% εμφάνισε φυσιολογικά αποτελέσματα από την ανάλυση με μικροσυστοιχίες. Το γεγονός αυτό έδωσε τη δυνατότητα στους κλινικούς να διαβεβαιώσουν τις οικογένειες πώς οι κυήσεις είναι φυσιολογικές, με αποτέλεσμα να μην διακοπούν. Ωστόσο και εδώ κατέληξαν στο συμπέρασμα πως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες και έρευνες για την καθιέρωση της a-CGH τεχνικής ως μοναδικού εργαλείου προγεννητικής διάγνωσης.



Εικόνα 3. Δείγματα που αναλύθηκαν με μικροσυστοιχίες, με φυσιολογικό καρυότυπο και γνωστό μη φυσιολογικό καρυότυπο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υψηλή διαγνωστική αξία της a-CGH οδήγησε στην επιθυμία να χρησιμοποιηθεί στο προγεννητικό έλεγχο (Rickman *et al*, 2006; Sahoo *et al*, 2006; Lapaire *et al*, 2007). Τα γεγονότα που την κάνουν αποτελεσματική, ως μέθοδο, όσο και η συμβατική κυτταρογενετική, στο να εντοπίζει ανευπλοειδίες, είναι ότι πρώτον, είναι πιο αξιόπιστη στο να ανιχνεύει μικρές χρωμοσωματικές αναδιατάξεις που πιθανόν να βρίσκονται δύσκολα με συμβατικές κυτταρογενετικές μεθόδους (π.χ. μικρές τελομερικές απώλειες ή διπλασιασμοί) και δεύτερον εντοπίζει ανωμαλίες που δεν μπορούν να βρεθούν ακόμα και με τον πιο βελτιστοποιημένο καρυότυπο (π.χ. κρυφές τελομερικές ελλείψεις ή ελλείψεις που προκαλούν σύνδρομο όπως Di George και Williams (Van den Veyver and Beaudet, 2006). Αυτά τα πλεονεκτήματα της τεχνικής μειώνουν την πιθανότητα μια υπομικροσκοπική αναδιάταξη να μην αποκαλυφθεί κατά τη διάρκεια προγεννητικής διάγνωσης. Επιπλέον η ανάλυση με τις μικροσυστοιχίες είναι αρκετά πιο γρήγορη από την συμβατική καρυοτύπηση, εφόσον εφαρμόζεται απευθείας σε δείγματα αμνιακού υγρού ή χοριακών λαχνών και δεν απαιτείται καλλιέργεια κυττάρων και επιδέχεται αυτοματοποίησης (Wells *et al*, 1999; Wells and Delhanty, 2000). Είναι μια μέθοδος που απαιτεί ελάχιστη παρέμβαση κλινικού ή εργαστηριακού δυναμικού για την διεξαγωγή αποτελεσμάτων.

Αυτό που δίνει καθαρό προβάδισμα στην a-CGH ανάλυση σε σύγκριση με τη FISH, η οποία είναι πιο αποτελεσματική από της G-ταινίες, είναι ότι η πρώτη ανιχνεύει αναδιατάξεις σε όλο το γονιδίωμα, χωρίς να απαιτείται προηγούμενη ένδειξη, δηλαδή ψάχνει στα τυφλά όλο το γονιδίωμα και εντοπίζει υπομικροσκοπικές διαταραχές στον αριθμό των αντιγράφων των DNA τμημάτων (Bejjani *et al*, 2005; Shaffer *et al*, 2007a, 2007b; Emanuel and Saitta, 2007). Ενώ με τη FISH αναλύονται συγκεκριμένες περιοχές στα χρωμοσώματα, ανάλογα με τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται, οι οποίοι σχεδιάζονται σύμφωνα με τις ενδείξεις των προηγούμενων εξετάσεων (βιοχημικές εξετάσεις στον ορό της μητέρας, διάφορα ευρήματα στον υπέρηχο, ηλικία της μητέρας ή οικογενειακό ιστορικό). Επιπλέον η FISH δεν μπορεί να εκτιμήσει το μέγεθος των αναδιατάξεων (διπλασιασμών ή ελλείψεων) εφόσον υπάρχουν, ενώ τα arrays δίνουν ακριβές μέγεθος (Ballabio *et al*, 1986; Gohlke *et al*, 2000; Kent *et al*, 2008).

Άλλος ένας λόγος για τον οποίο τα array CGH θα πρέπει να θεωρηθούν βασικό όργανο προγεννητικού ελέγχου είναι ότι μπορούν να ανιχνεύσουν υπεράριθμα marker χρωμοσώματα άγνωστης προέλευσης και δομικές ανωμαλίες οι οποίες δεν μπορούν να ταξινομηθούν ως πολυμορφισμοί χωρίς κλινική συνάφεια. Για παράδειγμα σε μια περίπτωση αμνιοπαρακέντησης με FISH βρέθηκε ένα σήμα για το σύνδρομο Prader Willi/ Angelman (15q+) ενώ στην ίδια περίπτωση βρέθηκε με a-CGH πως ένα κομμάτι (1,4 Mb) με ψευδογονίδια πολλαπλασιάστηκε τόσες φορές

που πλέον ήταν ορατό με το μικροσκόπιο. Το marker αυτό είχε εμφανιστεί σε πολλά υγιή άτομα με φυσιολογικό καρυότυπο (Fantès *et al*, 2002).

Με τις μικροσυστοιχίες υπάρχει και η δυνατότητα ανίχνευσης μωσαϊκισμού σε ποσοστό 20% των κυττάρων αν χρησιμοποιηθούν ανιχνευτές που καλύπτουν όλο το γονιδίωμα και όχι στοχευόμενοι που ανιχνεύουν ελλείψεις και διπλασιασμούς συγκεκριμένων γενετικών τόπων. Τα whole- genome arrays παρόλα αυτά, έχουν το μειονέκτημα ότι εντοπίζουν και επιπλέον CNVs εκτός από αυτά που αναζητούμε με άγνωστη κλινική σημασία, και κατ' επέκταση προκαλούν αβεβαιότητα λόγω του γεγονότος ότι δεν μπορεί να ερμηνευθεί αν έχουν ή όχι κλινική σημασία. (Zuffardi 2011).

Ένας επιπρόσθετος περιορισμός, που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μειονέκτημα είναι ότι το ποσοστό ανίχνευσης μεμονωμένων συνδρόμων με τα array CGH εξαρτάται από την κυτταρογενετική και μοριακή αιτία του εκάστοτε συνδρόμου. Για παράδειγμα, μια γενετική διαταραχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις από ελλείψεις, θα είχε υψηλό ποσοστό ανίχνευσης από a-CGH, σε σχέση με μια διαταραχή που θα οφειλόταν σε σημειακές μεταλλάξεις. Άλλο ένα μειονέκτημα είναι πως τα array – CGH δεν μπορούν να ανιχνεύσουν τριπλοειδίες ή πολυπλοειδίες όλου του γονιδιώματος που θα είχε σαν αποτέλεσμα γενετική σύσταση πολλαπλάσια του χρωμοσώματος X όπως XXX, όμως θα μπορούσε να υποδείξει τριπλοειδία με γενετική σύσταση XXY ή XYY. Επίσης δεν μπορεί να αποκαλύψει ισορροπημένες μεταθέσεις π.χ. αμοιβαίες μεταθέσεις τύπου Robertson, αναστροφές ή ισορροπημένες προσθήκες (Sahoo *et al*, 2006).

Το ερώτημα που ανακύπτει είναι αν έχει σημασία στον προγεννητικό έλεγχο να εντοπίζονται οι ισορροπημένες αυτές αναδιατάξεις. Για παράδειγμα, φορέας ισορροπημένης μετάθεσης τύπου Robertson έχει μεγάλο κίνδυνο να αποκτήσει παιδιά με μονογονεϊκή δυσωμία (Shaffer *et al*, 2006). Τα array CGH δεν έχουν την δυνατότητα να εντοπίσουν μονογονεϊκή δυσωμία ενώ τα SNP arrays μπορούν να εντοπίσουν χρωμοσωμικές περιοχές με ένδειξη ισοδυσωμίας (Faas *et al* 2010). Δεν μπορούν να βρουν καταστάσεις ετεροδυσωμίας, την πιο κοινή μορφή μονογονεϊκής δυσωμίας, χωρίς την εξέταση και των γονέων μαζί με το έμβρυο. Εκτός από την ισοδυσωμία είναι σημαντική και η ανίχνευση των ισορροπημένων αναδιατάξεων, επειδή κάποιες *de novo* αμοιβαίες μεταθέσεις ή προσθήκες σαφώς προκαλούν διαταραχή λειτουργίας γονιδίων και μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικό φαινότυπο ή γενετική ασθένεια, χωρίς να είναι δυνατή η ανίχνευση του διπλασιασμού ή της έλλειψης στο σημείο της αναδιάταξης (Bodrug *et al* 1990). Τέλος εφόσον η παθολογική τους σημαντικότητα ορίζεται σπάνια στο προγεννητικό έλεγχο, η ανίχνευσή τους παρέχει σημαντικές πληροφορίες στην οικογένεια, για έναν μελλοντικό απόγονο (φορέας μη ισορροπημένων μεταθέσεων) ή για το πώς

να προγραμματίσουν τον τρόπο της αναπαραγωγικής τους διαδικασίας(Bui *et al*, 2011)

Σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της a-CGH μεθόδου παίζει και ο σχεδιασμός των κατάλληλων μικροσυστοιχιών. Πρέπει να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται στο μέγιστο η διαγνωστική ικανότητα ενώ παράλληλα θα μειώνονται στο ελάχιστο τα ψευδώς αληθή αποτελέσματα, έτσι ώστε να παρέχονται στους κλινικούς οι απαραίτητες πληροφορίες για να μπορέσουν διαχειριστούν την εκάστοτε περίπτωση χρωμοσωματικής ανωμαλίας και να προσφέρουν την κατάλληλη ενημέρωση και συμβουλή στους γονείς (Shaffer *et al* 2006).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω υπάρχουν τα whole –genome arrays που ψάχνουν CNVs σε όλο το γονιδίωμα και τα targeted arrays που μελετούν συγκεκριμένες περιοχές, οι οποίες έχουν προκαθοριστεί από τις ενδείξεις. Κατά γενική ομολογία τα targeted θεωρούνται καταλληλότερα για προγεννητικό έλεγχο λόγω του γεγονότος πως ακόμα είναι δύσκολη η ερμηνεία των CNVs άγνωστης κλινικής σημασίας που εντοπίζονται με τα whole- genome arrays. Ενώ τα πρώτα αποκαλύπτουν προσθήκες και απώλειες που σχετίζονται με πλήρως διεισδυτικές ασθένειες και περιοχές που κανονικά θεωρούνται ότι είναι σε υψηλό κίνδυνο (π.χ. υποτελιμερικές και περικεντρομερικές περιοχές) μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα να εντοπίζονται αβέβαια ευρήματα. Ωστόσο η χρήση των targeted arrays δεν μηδενίζει τη πιθανότητα να γεννηθεί παιδί με χρωμοσωμική ανωμαλία (Zufferdi 2011)

Η ανάγκη για αποσαφήνιση και ερμηνεία των CNVs με άγνωστη ή ασήμαντη κλινική αξία οδηγεί στη σύσταση να ελέγχονται και τα αίματα των γονέων για την κάθε περίπτωση. Η εξέταση αίματος των γονέων πρέπει να γίνεται σχεδόν ταυτόχρονα ή πιο νωρίς από την προγεννητική διάγνωση, για να είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες από το γονιδίωμα των γονέων κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Με τον τρόπο αυτόν διευκολύνεται η ερμηνεία των CNVs και απορρίπτονται από την λίστα των επικίνδυνων για την υγεία των εμβρύων αυτά που κληρονομούνται από φυσιολογικούς γονείς (Sahoo *et al*, 2006).

Παρόλα τα θετικά και την πρόοδο της μεθόδου αυτής, η a-CGH μπορεί μόνο να εντοπίσει γενετικά σύνδρομα που προκαλούνται από μη ισορροπημένες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και γενετικές ανωμαλίες, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, νοητική στέρωση ενώ άλλες κλινικές καταστάσεις που μπορούν να προκληθούν από πληθώρα γενετικών και μη παραγόντων ούτε η a-CGH αλλά ούτε και άλλη μέθοδος μπορεί να εντοπίσει π.χ. σημειακές μεταλλάξεις ή μονογονιδιακές ασθένειες (Darilek *et al* 2008.)

Θεωρείται πλέον δεδομένο από τους περισσότερους ερευνητές πως παρέχεται επιπλέον διασφάλιση και διαβεβαίωση ότι ένα έμβρυο είναι υγιές, αν τα

αποτελέσματα της a-CGH ανάλυσης είναι φυσιολογικά, σε συνδυασμό πάντα με φυσιολογικό καρυότυπο (Corringer *et al*, 2009).

Τέλος σχεδόν όλες οι ερευνητικές ομάδες που ασχολήθηκαν με την παραπάνω τεχνική συμφωνούν πως απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποτελέσει η a-CGH ανάλυση μεθοδολογία πρώτης γραμμής στον προγεννητικό έλεγχο. Αυτό που θα συνέβαλε στην ουσιαστική βελτίωση της προγεννητικής διάγνωσης θα ήταν η βελτιστοποίηση της a-CGH ώστε να ξεπεραστούν όλα τα παραπάνω εμπόδια, σε συνδυασμό με μη επεμβατικές μεθόδους διάγνωσης, χρησιμοποιώντας ελεύθερο εμβρυϊκό DNA απομονωμένο από το μητρικό πλάσμα (Biscoff *et al* 2005) ή εμβρυϊκό DNA από κύτταρα τροφοβλάστης στη τραχηλική βλέννη (Katz- Jaffe *et al*, 2005), τα οποία θα είναι διαθέσιμα για την διάγνωση ρουτίνας. Εξάλλου στόχος παραμένει η παροχή γρήγορης και έγκυρης διάγνωσης με όσο το δυνατόν μη επεμβατικό και ανώδυνο τρόπο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ACOG. 2007a. ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 109: 217–227.
2. ACOG. 2007b. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol* 110:1459–1467.
3. Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D: Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *NatGenet* 2000, 25:144–146
4. Ballabio A, Parenti G, Tippett P, et al. 1986. X-linked ichthyosis, due to steroid sulphatase deficiency, associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from the distal short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 72: 237–240.
5. Ballif BC, Hornor SA, Sulpizio SG, et al. 2007. Development of a high-density pericentromeric region BAC clone set for the detection and characterization of small supernumerary marker chromosomes by array CGH. *Genet Med* 9: 150–162.
6. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, et al. 2006. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* 140: 2757–2767. Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, et al. 2005. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A* 134: 259–267.
7. Ballif BC, Theisen A, Coppinger J, et al. 2008. Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication. *Mol Cytogenet* 1:8.
8. Baptista J, Prigmore E, Gribble SM, et al. Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals. *Eur J Hum Genet* 2005; 13:1205–1212. References 24 and 25 are important papers because they highlight that a proportion of translocations that appear balanced on routine karyotyping are actually associated with submicroscopic microdeletions and microduplications that could cause abnormal phenotypes.
9. Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, et al. 2005. Use of array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A* 134: 259–267.
10. Bi W, Breman AM, Venable SF, et al. 2008. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenat Diagn*, In Press.

11. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005; 11:59–67.
12. Buckley PG, Mantripragada KK, Benetkiewicz M, Tapia-Paez I, Diaz De Stahl T, Rosenquist M, Ali H, Jarbo C, De Bustos C, Hirvela C, Sinder Wilen B, Fransson I, Thyr C, Johnsson BI, Bruder CE, Menzel U, Hergersberg M, Mandahl N, Blennow E, Wedell A, Beare DM, Collins JE, Dunham I, Albertson D, Pinkel D, Bastian BC, Faruqi AF, Lasken RS, Ichimura K, Collins VP, Dumanski JP: A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet* 2002, 11:3221–3229
13. Cheung SW, Shaw CA, Scott DA, et al. 2007. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A* 143: 1679–1686.
14. Cheung SW, Shaw CA, Yu W, et al. 2005. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med* 7: 422–432
15. Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, Torchia BS, Bejjani BA, Shaffer LG. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenat Diagn* 2009; 29: 1156–1166
16. Crolla JA, Youings SA, Ennis S, Jacobs PA. 2005. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet* 13: 154–160.
17. D.G. Albertson, D. Pinkel, Genomic microarrays in human genetic disease and cancer, *Hum Mol. Genet.* (2003) R145–R152 (12 Spec No 2).
18. DarilekS, WardP, PursleyA, et al. 2008. Pre- and postnatal genetic testing by array-comparative genomic hybridization: genetic counseling perspectives. *Genet Med* 10: 13–18.
19. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA: Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005, 77:606–616
20. De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *JMedGenet* 40: 385–398.
21. Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, et al. Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005; 76:750–762. This is the first description of an exon array used for copy number analysis. This was a limited array, but the data in this paper promise that this will be a useful platform for future genome-wide arrays.
22. Emanuel BS, Saitta SC. 2007. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet* 8: 869–883.

23. Evans MI, Henry GP, Miller WA, et al. 1999. International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific chromosome specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Hum Reprod* 14: 1213–1216.
24. Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, et al. 2010. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *JMed Genet* 47: 586–594.
25. Fantes JA, Mewborn SK, Lese CM, et al. 2002. Organisation of the pericentromeric region of chromosome 15: at least four partial gene copies are amplified in patients with a proximal duplication of 15q. *JMedGenet* 39: 170–177.
26. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, et al. 2006. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 79: 500–513
27. Friedman JM. 2009. High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 29: 20–28
28. Gohlke BC, Haug K, Fukami M, et al. 2000. Interstitial deletion in Xp22.3 is associated with X linked ichthyosis, mental retardation, and epilepsy. *JMedGenet* 37: 600–602.
29. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010: 37: 6–14.
30. Huang J, Wei W, Zhang J, et al. Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics* 2004; 1: 287–299.
31. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; 36:949–951.
32. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004, 36:299–303
33. Janne PA, Li C, Zhao X, et al. High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23:2716–2726.
34. Kalter H, Warkany J. 1983b. Medical progress. congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention (first of two parts). *N Engl J Med* 308: 424–431.
35. Katz-Jaffe MG, Mantzaris D, Cram DS. DNA identification of fetal cells isolated from cervical mucus: potential for early non-invasive prenatal diagnosis. *BJOG* 2005;112:595–600.
36. Kent L, Emerton J, Bhadravathi V, et al. 2008. X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit

- hyperactivity disorder, autism and social communication deficits. *JMedGenet* 45: 519–524. Kalter H, Warkany J. 1983a. Congenital malformations (second of two parts). *N Engl J Med* 308: 491–497.
37. Kleeman L, Bianchi D, Shaffer LG, et al. 2009. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn* 29: 1213–1217.
 38. Knight SJ, Lese CM, Precht KS, et al. 2000. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67: 320–332.
 39. Knight SJ, Regan R, Nicod A et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999; 354: 1676–1681.
 40. Lapaire O, Lu XY, Johnson KL, et al. 2007. Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenat Diagn* 27: 616–621
 41. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, et al. 2005. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridization in fetuses with multiple malformations. *JMedGenet*
 42. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007; 39: S48–S54.
 43. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007, 39: S48-54
 44. Leung WC, Waters JJ, Chitty L. 2004. Prenatal diagnosis by rapid aneuploidy detection and karyotyping: a prospective study of the role of ultrasound in 1589 second-trimester amniocenteses. *Prenat Diagn* 24: 790–795.
 45. Levy S, Sutton G, Ng PC, et al. 2007. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5: e254.
 46. Lupski J. 2007. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet* 39: S43–S47.
 47. Miller DT, Adam MP, Aradhya S et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 749–764.
 48. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The developing human : clinically oriented embryology*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2008
 49. Redon R, Rio M, Gregory SG, et al. Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or "deletion with positional effect" syndrome? *J Med Genet* 2005; 42:166–171. References 26, 28 and 29 show that region-specific tiling microarrays are a powerful tool to better define boundaries of microdeletion and duplication syndromes and to study the correlation with phenotypes. Unusual phenotypes and new features of known microdeletion syndromes can be found. This is relevant for counseling about the predicted phenotype if array-CGH is used for prenatal diagnosis.

50. Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, Ng BL, Scott C, Whittaker J, Adinolfi M, Carter NP, Bobrow M: Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet* 2006, 43:353-361.
51. Rizzo N, Pittalis MC, Pilu G et al. Distribution of abnormal karyotypes among malformed fetuses detected by ultrasound throughout gestation. *Prenat Diagn* 1996; 16: 159–163.
52. Sahoo GS, Butterworth AS, 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 Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, Sullivan CM, Sahoo T, Yatsenko SA, Bacino CA, Stankiewicz P, Ou Z, Chinault AC, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW, Ward PA: Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One* 2007, 2: e327.
53. Sahoo T, Cheung SW, Ward P, et al. 2006a. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med* 8: 719–727.
54. Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, et al. 2006b. Microarray-based comparative genomic hybridization testing in deletion-bearing Angelman Syndrome patients: Genotype-phenotype correlations. *JMedGenet* 43: 512–516.
55. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316: 445–449.
56. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 305:525–528. References 21 and 22 use slightly different approaches to demonstrate that the human genome contains hundreds of segmental duplications and deletions, interpreted as normal copy number variation, but the true significance of all of them is unknown. Interestingly, there is little overlap between the identified segments in both papers, suggesting that there may be many more such regions.
57. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC: The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007, 145C:335-345.
58. Shaffer LG, Bui TH: Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007, 145C:87-98.
59. Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, Torchia BA, Theisen A, Ballif BC, Bejjani BA: Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn* 2008, 28:789-795
60. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA, Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R: Targeted genomic microarray

- analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 2006, 149:98-102.
61. Shaw CJ, Shaw CA, Yu W, et al. 2004. Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders. *JMedGenet* 41: 113–119.
 62. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, et al. 2004. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *JMedGenet* 41: 241–248.
 63. Slater HR, Bailey DK, Ren H, et al. 2005. High-Resolution Identification of Chromosomal Abnormalities Using Oligonucleotide Arrays Containing 116,204 SNPs. *Am J Hum Genet* 77: 709–726.
 64. Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG: Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001, 29:263–264
 65. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, Gersen S, White B, Schoonmaker MM: Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn* 2001, 21:293-301
 66. Tseng J-J, Chou M-M, Lo F-C, Lai H-Y, Chen M-H, Ho ES-C. Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995–2004. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006: 45: 39–41.
 67. Tyreman M, Abbott KM, Willatt LR, et al. 2009. High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings. *JMedGenet* 46: 531–541
 68. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, et al. 2008. Clinical use of array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 29: 29–39.
 69. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SE, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaud AL, et al.: Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 2009, 29:29-39
 70. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG: High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002, 70:1269–1276
 71. Veltman JA, Yntema HG, Lugtenberg D, Arts H, Briault S, Huys EH, Osoegawa K, de Jong P, Brunner HG, Geurts van Kessel A, van Bokhoven H,

- Schoenmakers EF: High resolution profiling of X chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* 2004, 41:425–432
72. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, et al. 2007. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet* 15: 1105–1114.
73. Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, et al. 2009. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther* 25: 277–284.
74. Vissers LE, De Vries BB, Osoegawa K, et al. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73: 1261–1270
75. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al. 1993. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet* 52: 854–865.
76. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. 1999. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27: 1214–1218.
77. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872–876.
78. Wilson RD, Chitayat D, McGillivray BC. Fetal ultrasound abnormalities: correlation with fetal karyotype, autopsy findings, and postnatal outcome – five-year prospective study. *Am J Med Genet* 1992; 44: 586–590.
79. Zhang F, Claudia M.B. Carvalho and James R. Lupski, 2009. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends in Genetics* Vol.25 No 7