

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO
SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE SANITARIA

INDIRIZZO: EMATOONCOLOGIA, GENETICA, MALATTIE RARE
E MEDICINA PREDITTIVA
CICLO XXVII

**ARRAY-CGH COME ESAME DI PRIMO LIVELLO
NELLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI RITARDO
MENTALE E ANOMALIE CONGENITE**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore :Ch.mo Prof. Maurizio Clementi

Dottorando : Claudia Pinato

INDICE

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	7
1.1. <i>COPY NUMBER VARIATIONS</i> E COMPLESSITÀ DEL GENOMA	7
1.1.1. Categorie di classificazione delle CNVs	9
1.1.2. Meccanismi di formazione delle CNVs	10
1.1.2.1. Ricombinazione omologa non allelica - NAHR	10
1.1.2.2. Ligazione non omologa delle estremità - NHEJ	12
1.1.2.3. Modello <i>Fork-Stalling and Template Switching</i> - FoSTeS	14
1.1.2.4. Cromotripsì	16
1.2. ARRAY-CGH NELL'ANALISI DI RIARRANGIAMENTI GENOMICI	18
1.3. ARRAY-CGH IN DIAGNOSI PRENATALE	21
2. SCOPO	25
3. POPOLAZIONE IN STUDIO	27
4. MATERIALI E METODI	29
4.1. ESTRAZIONE DNA GENOMICO	29
4.2. <i>ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION</i>	31
4.3. ANALISI BIOINFORMATICA E TEST STATISTICI	37
5. RISULTATI	39
5.1. CARATTERIZZAZIONE DELLE CNVs	39
5.1.1. Significato clinico delle CNVs, tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni) e pattern di ereditarietà (<i>de novo</i> vs ereditate)	41
5.1.2. Significato clinico e dimensioni delle CNVs	45
5.1.3. Meccanismo di formazione, pattern di ereditarietà (<i>de novo</i> vs ereditate) e tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni)	47
5.1.4. Meccanismo di formazione e dimensioni delle CNVs	51
5.1.5. CNVs e dimensioni cromosomiche	54
5.2. CROMOTRIPSÌ	59
5.3. MOSAICISMI	63
5.4. CAMPIONI FETALI	69
6. DISCUSSIONE	73
7. BIBLIOGRAFIA	109

ABSTRACT

La tecnica di array-CGH si è affermata negli ultimi anni come un potente strumento per l'identificazione delle cause molecolari alla base di fenotipi complessi caratterizzati da disabilità intellettive, autismo, epilessia, disordini psichiatrici e anomalie congenite multiple. Negli ultimi 10 anni, infatti, è emerso sempre più chiaramente che l'analisi citogenetica convenzionale non è in grado di rilevare riarrangiamenti inferiori alle 5-10 Mb che possono essere responsabili di tali fenotipi clinici. Questo limite è stato superato dall'array-CGH che ha aumentato del 15-20% la *detection rate* di sbilanciamenti cromosomici criptici (delezioni o duplicazioni).

La possibilità di avere una tecnica di tipo *genome wide* ad elevata risoluzione ha portato alla proposta, nel 2010, da parte dell'*International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium*, dell'utilizzo di tale tecnica come esame di primo livello in individui con disabilità intellettive e anomalie congenite.

Dagli studi effettuati con tecnologia *microarray* è risultato evidente che esistono regioni cromosomiche in cui sono particolarmente frequenti ricombinazioni aberranti, dovute alla presenza di segmenti con un'elevata omologia di sequenza che causano un alto grado di instabilità genomica.

L'utilizzo dell'array-CGH ha inoltre rivelato la presenza nel genoma di un elevato numero di variazioni strutturali, di dimensioni maggiori di 1Kb, chiamate *copy number variations (CNVs)*, le quali, essendo state identificate anche in individui sani, non sempre rappresentano una causa diretta di malattia. Questa difficoltà nell'interpretazione della patogenicità delle CNVs è ancora più rilevante in diagnosi prenatale poiché si traduce in una incertezza in termini prognostici sulla salute del feto. Per questo motivo, nonostante i vantaggi dati dalla tecnica, l'array-CGH in diagnosi prenatale viene, al momento, considerato un test di secondo livello da utilizzare in associazione all'analisi citogenetica convenzionale.

In questo studio sono stati valutati, mediante array-CGH, 1051 pazienti che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dimorfismi. L'obiettivo principale è stato quello di verificare la

presenza di riarrangiamenti cromosomici criptici in modo da dimostrare l'utilità dell'impiego di *microarray* genomici come esame di primo livello per la caratterizzazione delle cause molecolari alla base del fenotipo patologico degli individui.

Sono stati poi ipotizzati i meccanismi di formazione delle anomalie verificando, mediante l'analisi dei *breakpoints*, la presenza di regioni di omologia che possano aver predisposto al riarrangiamento. Quindi è stato valutato se il meccanismo di formazione e il significato clinico delle CNVs identificate possano essere correlati al pattern di ereditarietà, al tipo o alle dimensioni dello sbilanciamento.

I risultati ottenuti mostrano che il 15.8% dei casi analizzati è portatore di una anomalia patologica o VOUS (*variant of uncertain significance*) verosimilmente patologica, e che queste sono più frequentemente delezioni e CNVs insorte *de novo*. È stato inoltre evidenziato che sia il significato clinico delle CNVs sia il loro meccanismo di formazione possano essere correlati alle dimensioni degli sbilanciamenti.

È stata successivamente analizzata la distribuzione delle CNVs nei diversi cromosomi ed è emerso che in alcuni di essi la densità di anomalie riscontrate è maggiore rispetto agli altri.

L'applicazione dell'array-CGH in un elevato numero di pazienti ha permesso, inoltre, di stimarne la sensibilità nell'identificazione di mosaicismi, sebbene abbiano una frequenza inferiore all'1% in individui con disabilità intellettive. È stato osservato che la tecnica è in grado di rilevare anomalie che coinvolgono anche un numero limitato di cellule, fino al 10%.

Infine sono stati analizzati alcuni campioni fetali di villi coriali e liquido amniotico per valutare il possibile utilizzo dei *microarray* genomici in diagnosi prenatale. Il numero esiguo di campioni analizzati non ci ha permesso di trarre delle conclusioni, tuttavia, per le difficoltà che si riscontrano nell'interpretazione del significato clinico delle CNVs, è da ritenere al momento un test di secondo livello da utilizzare in associazione al cariotipo standard.

The array-CGH technique has emerged in recent years as a powerful tool for the identification of molecular causes underlying complex phenotypes characterized

by intellectual disability, autism, epilepsy, psychiatric disorders and multiple congenital anomalies. Over the past 10 years, it has become clear that the conventional cytogenetic analysis is unable to detect rearrangements less than 5-10Mb which can be responsible for these clinical phenotypes. This limit has been exceeded with array-CGH technique which has increased by 15-20% the detection rate of cryptic chromosomal imbalances (deletions or duplications).

The possibility to have a genome wide technique with a high resolution led to the proposal, in 2010, by the International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium, to use this technique as the first-line test in individuals with intellectual disabilities and congenital anomalies.

From studies with microarray technology it has become clear that there are chromosomal regions in which aberrant recombination are particularly frequent, due to the presence of segments with elevated sequence homology, that cause a high degree of genomic instability.

Moreover the use of the array-CGH showed the presence in the genome of a large number of structural variations, larger than 1Kb, defined copy number variation or CNVs, that does not always represent a direct cause of disease because they have also been identified in healthy individuals. This complexity in the interpretation of pathogenic CNVs is even more relevant in prenatal diagnosis because it leads to uncertainty in terms of prognosis for the fetal health. For this reason, despite the advantages of the technique, the array-CGH analysis in prenatal diagnosis is considered as a second-line test to be used in association to conventional cytogenetics analysis.

In this study were evaluated with array-CGH analysis, 1051 patients with mental and / or developmental disabilities, autism, multiple congenital anomalies and dimorphisms. The main purpose was to verify the presence of cryptic chromosomal rearrangements in order to demonstrate the utility of genomic microarray as first-line test for the characterization of the molecular causes underlying the phenotype of individuals.

Then the mechanisms of formation of anomalies were hypothesized by the analysis of the breakpoints, to verify the presence of regions of homology that may have predisposed to the rearrangement. So it was examined whether the mechanism of formation and the clinical significance of the identified CNVs

could be related to the pattern of inheritance, the type or the size of the imbalance.

The results show that 15.8% of the patients has at least one pathological anomaly or VOUS (variant of uncertain significance) that is likely pathological, and that these are more frequently deletions and CNVs arisen de novo. It was also highlighted that both the clinical significance of CNVs and their mechanism of formation may be related to the size of the imbalance.

It was later analyzed the distribution of CNVs in different chromosomes and it was found that in some of them the density of anomalies is greater than the others.

The application of the array-CGH in a high number of patients has also allowed to estimate the sensitivity to detect mosaicism, although they have a frequency less than 1% in individuals with learning disabilities. It was observed that the technique is able to detect anomalies present in up to 10% of cells.

Finally some fetal samples of chorionic villi and amniotic fluid were analyzed to evaluate the possible use of genomic microarray in prenatal diagnosis. The small number of analyzed samples did not allow us to draw conclusions, but the difficulties in the interpretation of the clinical significance of CNVs, make it a second-line test to be used in association with standard karyotype.

1. INTRODUZIONE

1.1. COPY NUMBER VARIATIONS E COMPLESSITÀ DEL GENOMA

Una delle maggiori scoperte del progetto Genoma Umano è stata l'identificazione di un gran numero di variazioni strutturali submicroscopiche chiamate *copy number variation* (CNV). Il termine CNV è stato introdotto nel 2006 da Redon per definire un segmento di DNA maggiore o uguale a 1Kb presente in un numero variabile di copie rispetto ad un genoma di riferimento (Redon et al. 2006).

Gli studi effettuati con tecnologia *microarray* hanno stimato che più del 12% del genoma umano sia interessato da CNVs di dimensioni intermedie, comprese tra 1Kb e 3Mb, e ciò rappresenta la maggiore causa di variabilità genetica tra gli individui (Feuk et al. 2006).

Poiché tali variazioni strutturali hanno dimensioni anche di diverse megabasi e quindi coprono interi geni e regioni regolatrici, possono influenzare la variabilità biochimica, fisiologica, morfologica e patologica tra gli individui. Alcune modifiche strutturali possono avere effetti deleteri sulla capacità riproduttiva, essendo in alcuni casi mutazioni letali. In queste circostanze, le CNVs sarebbero destinate a scomparire o a rimanere in forma eterozigote. In altri casi, i cambiamenti comportano un vantaggio e, dunque, potrebbero essere oggetto di selezione positiva. Tuttavia, la maggior parte delle CNVs sono variazioni neutre, senza apparenti implicazioni nel fenotipo patologico e perciò possono essere ricorrenti nelle popolazioni umane.

È noto che le variazioni strutturali possono influire sull'espressione genica e la variabilità fenotipica, e studi recenti stanno mettendo in luce il loro possibile coinvolgimento come fattori di suscettibilità di malattie complesse ad eziologia ignota quali ad esempio le disabilità intellettive, disturbi dello spettro autistico, epilessia e schizofrenia (Greyton et al. 2012, Chong et al. 2014). Le CNVs potrebbero, infatti, alterare geni dosaggio-sensibili, interrompere sequenze codificanti, generare geni di fusione, modificare la regolazione genica a lungo

raggio o, in presenza di una delezione, rivelare un allele recessivo (Feuk 2006; Colnaghi 2011).

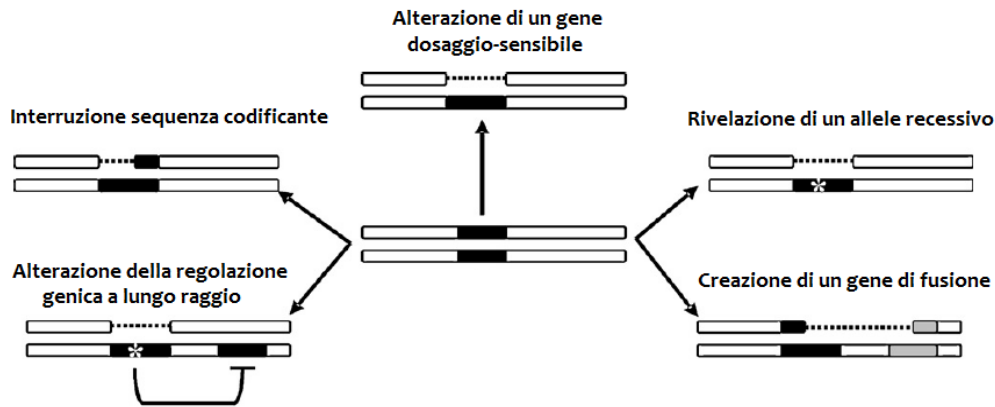


Figura 1: Possibili conseguenze delle *Copy Number Variations* (modificata da Colnaghi et al. 2011)

La comprensione delle implicazioni delle variazioni strutturali nelle malattie umane richiede studi di tipo *genome-wide* che esaminino la reale frequenza delle CNVs negli individui. I dati finora ottenuti sono stati raccolti in *database* pubblici come il Database delle Varianti Genomiche (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), in cui vengono classificate tutte le CNVs identificate in individui normali. Analogamente sono stati sviluppati dei *database* per raccogliere le CNVs che probabilmente sono alla base del fenotipo patologico osservato, come il *database* di DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*, <https://decipher.sanger.ac.uk/>).

Al momento l'interpretazione del significato clinico delle variazioni strutturali rappresenta una grossa sfida poiché sulla base delle attuali conoscenze scientifiche non risulta sempre possibile stabilire un'associazione diretta tra la CNV individuata e il quadro clinico presente nel paziente. Va inoltre considerato che alcune CNVs sono descritte in associazione a patologie ad espressività variabile e penetranza incompleta o a loci di suscettibilità.

1.1.1. Categorie di classificazione delle CNVs

Le CNVs vengono suddivise in 3 classi principali (Kearney et al. 2011, Vermeesch et al. 2012):

- PATOLOGICHE quando sono ben documentate in letteratura , ad esempio note sindromi da microdelezione/microduplicazione o sono riportate in database pubblici, come Decipher e ISCA, in pazienti con fenotipo simile.
- BENIGNE quando sono state osservate in più dell'1% degli individui sani e sono descritte in almeno 3 soggetti riportati nel Database delle Varianti Genomiche (DGV) e con lo stesso orientamento (duplicazione / delezione).
- DI SIGNIFICATO INCERTO (VOUS - *variants of uncertain clinical significance*) quando non rientrano nelle due classi precedenti. Vengono a loro volta ripartite in 3 sottoclassi:
 - VOUS VEROSIMILMENTE PATOLOGICHE quando sono riportate in uno o pochi casi con fenotipo simile, o si sovrappongono parzialmente con quelle riportate in individui affetti in cui il gene causativo non è ancora stato identificato, o non sono mai state riportate ma comprendono geni la cui funzione potrebbe essere causativa del fenotipo clinico.
 - VOUS quando non sono mai state descritte e comprendono geni la cui funzione è sconosciuta, o sono state osservate sia in individui sani che affetti e non vi sono evidenze sufficienti per una classificazione più certa.
 - VOUS VEROSIMILMENTE BENIGNE quando non sono mai state descritte ma vengono ereditate da un genitore sano, o non comprendono geni, oppure si sovrappongono parzialmente con quelle riportate in individui sani o sono state osservate solo in pochi di essi, o comprendono geni la cui funzione non è verosimilmente causativa del fenotipo clinico.

1.1.2. Meccanismi di formazione delle CNVs

Le variazioni strutturali sono il risultato dell'errata riparazione di rotture cromosomiche o del malfunzionamento del meccanismo di ricombinazione. Sono stati proposti tre meccanismi molecolari per spiegare la formazione di tali anomalie: la ricombinazione omologa non allelica (NAHR - *Non Allelic Homologous Recombination*), la ligazione non omologa delle estremità (NHEJ - *Non Homologous End Joining*) e il modello FoSTeS basato sullo stallo della forcella di replicazione (FoSTeS - *Fork-Stalling and Template Switching*).

Recentemente l'identificazione di complessi riarrangiamenti strutturali con multiple variazioni nel numero di copie ed un elevato numero di *breakpoints*, ha portato alla proposta di un ulteriore modello, la cromotripsi, che coinvolge i meccanismi NHEJ e FoSTeS.

1.1.2.1. Ricombinazione omologa non allelica - NAHR

La ricombinazione omologa non allelica (NAHR - *Non Allelic Homologous Recombination*) è il meccanismo alla base della maggior parte dei riarrangiamenti ricorrenti, cioè anomalie identificate in numerosi individui e che hanno dimensioni e punti di rottura sovrapponibili. È mediata da *low copy repeats* (LCRs, chiamate anche duplicazioni segmentali), ovvero blocchi di sequenze ripetute con un'omologia di sequenza maggiore del 90% (Bailey et al. 2001; Shaffer & Lupski, 2000). Questa elevata omologia può portare, durante la meiosi e la mitosi, ad allineamenti tra copie di LCRs non alleliche le quali, andando incontro a *crossing-over*, causano la formazione di riarrangiamenti genomici nelle cellule figlie poiché il meccanismo cellulare di controllo della ricombinazione non è in grado di riconoscere l'appaiamento errato (Gu et al. 2008).

Per la ricombinazione omologa non allelica sembra sia necessaria la presenza di segmenti di DNA di lunghezza minima (300-500 bp) chiamati *minimal efficient processing segment* (MEPS) con un'identità di sequenza estremamente alta (>90%) (Reiter et al. 1998). Waldman e Liskay hanno dimostrato che l'introduzione di soli due *mismatches* a singolo nucleotide riduce di circa 20 volte la frequenza di ricombinazione (Waldman & Liskay 1988). La maggior parte delle LCRs che sono

state identificate ai punti di rottura di riarrangiamenti cromosomici hanno dimensioni comprese tra 10Kb e 400Kb e hanno un'omologia di sequenza >95% (Lupski 1998; Sharp et al. 2005).

È noto che la distanza tra LCRs sia una tra le caratteristiche dell'architettura genomica che influenza l'efficacia della ricombinazione ed è stato osservato che maggiore è la dimensione del segmento riarrangiato, maggiore è la lunghezza delle duplicazioni segmentali coinvolte. Quando due LCRs sono localizzate su cromosomi o cromatidi differenti e sono orientate in maniera diretta possono mediare la formazione di delezioni e reciproche duplicazioni del segmento genomico tra loro compreso, mentre se sono sullo stesso cromatidio solamente delezioni. Quando invece, sono sullo stesso cromatidio ma disposte in maniera inversa portano alla formazione di inversioni. Quando, infine, sono disposte su cromosomi diversi, possono causare la formazione di traslocazioni.

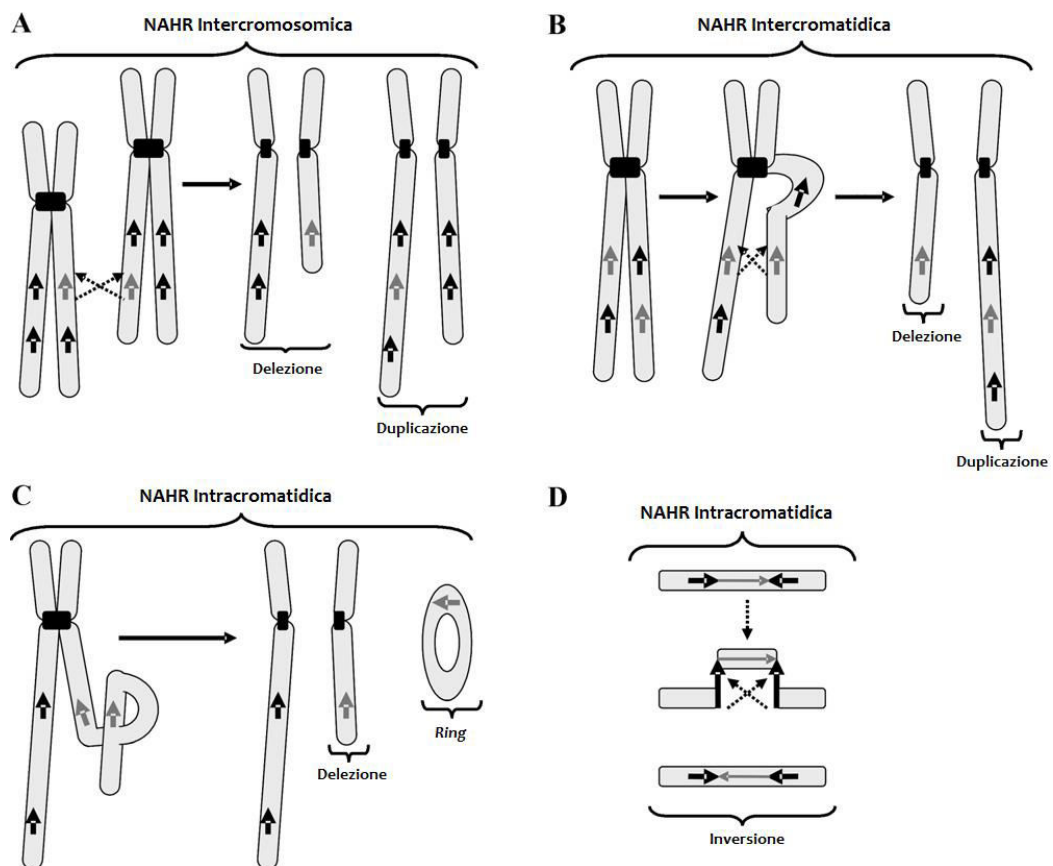


Figura 2: Ricombinazione omologa non allelica (NAHR) tra LCRs. (A) NAHR intercromosomica e (B) NAHR intercromatidica tra LCRs orientate in maniera diretta. (C) NAHR intracromatidica tra LCRs orientate in maniera diretta. (D) NAHR intracromatidica tra LCRs orientate in maniera inversa (Modificato da Colnaghi 2011).

La ricombinazione omologa non allelica può avvenire sia nelle cellule germinali sia in quelle somatiche. Nel primo caso porta a riarrangiamenti genomici costituzionali che possono manifestarsi come disordini genomici, ad esempio la CMT1A e l'HNPP causati da una duplicazione/delezione ricorrente di 1.4Mb in 17p12, o le sindromi di Potocki-Lupski e Smith-Magenis causate da duplicazione e reciproca delezione in 17p11.2. Nel caso in cui la NAHR avvenga in mitosi, solo una sottopopolazione di cellule somatiche presenteranno il riarrangiamento e quindi si verificherà una condizione di mosaicismo.

Alcuni casi di ricombinazione omologa non allelica possono essere mediati anche da sequenze ripetitive diverse dalle LCRs, tra cui Alu e LINE, ma tali eventi sono stati osservati soprattutto in riarrangiamenti non-ricorrenti (Choi et al. 2011). Inoltre i tratti di omologia tra due sequenze ripetute intersperse hanno dimensioni minori rispetto a quelli presenti nelle LCRs e ciò potrebbe spiegare una più bassa frequenza di eventi di ricombinazione mediati da tali sequenze (Gu et al. 2008).

1.1.2.2. Ligazione non omologa delle estremità - NHEJ

La ligazione non omologa delle estremità (NHEJ - *Non Homologous End Joining*) è un meccanismo utilizzato dalle cellule eucariote per riparare le rotture a doppio filamento del DNA (*double strand break* - DSB) e si pensa sia implicato nell'unione delle estremità dei cromosomi coinvolti nelle traslocazioni caratteristiche delle cellule tumorali (Lieber et al. 2010).

La NHEJ è un meccanismo che può avvenire in qualsiasi momento del ciclo cellulare e non necessita di lunghe sequenze omologhe. Sono sufficienti, infatti, delle regioni di micro-omologia (solitamente 1-3 nucleotidi) che permettano l'appaiamento e la ligazione del DNA. Quando queste regioni non sono presenti, le proteine coinvolte nella riparazione dei DSBs sono in grado di processare le estremità in modo da renderle compatibili (Lieber, 2010).

Per questi motivi la NHEJ viene definita come un meccanismo *template independent* ed *error-prone*, poichè unisce due estremità di DNA introducendo variazioni rispetto alla sequenza originaria.

È stato stimato che ogni giorno si verificano circa dieci DSBs per cellula e che tali rotture siano normalmente riparate attraverso dei meccanismi di risposta e riparo del danno. Tuttavia un'errata riparazione può portare alla formazione di riarrangiamenti genomici, sia bilanciati che sbilanciati. In quest'ultimo caso, la NHEJ, in quanto meccanismo di semplice ligazione delle estremità che non comporta la sintesi di sequenze, si associa più spesso alla formazione di delezioni. Per le duplicazioni invece è necessario il coinvolgimento di due cromatidi fratelli o di cromosomi omologhi in cui avvengono simultanee rotture a doppio filamento e la formazione di due cromosomi derivativi. Per questo motivo la NHEJ non è in grado di spiegare riarrangiamenti in cui il numero di copie è maggiore di 3 (Chen et al 2010).

Il meccanismo molecolare può essere descritto in 4 passaggi: identificazione di un DSB, formazione di un ponte molecolare per tenere unite le due estremità libere del DNA, processamento delle estremità danneggiate, unione e ligazione (Weterings & van Gent 2004).

Il *pathway* di riparazione inizia dal legame di un eterodimero Ku70-Ku80 alle estremità del DNA danneggiato. Questo complesso Ku70-Ku80 attira la subunità catalitica di una proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs) e la attiva creando un ponte molecolare. Dopodichè, si forma un complesso sinaptico in cui la nucleasi Artemide e le polimerasi pol μ o pol λ processano le estremità del DNA in modo da renderle compatibili, ed, infine, il complesso DNA ligasi IV-XRCC4, in presenza della proteina XLF, ne catalizza la ligazione.

È stato osservato che, quando sono presenti regioni di micro-omologia, la formazione del complesso Ku non è più indispensabile. Inoltre la nucleasi, la polimerasi e la ligasi coinvolte hanno funzioni indipendenti l'una dall'altra, e anche da Ku, perciò, in assenza del complesso Ku, ciascun enzima riesce comunque a mantenere un certo livello di attività (Malhotra & Sebat 2010; Gu et al. 2008; Mani & Chinnaiyan, 2010).

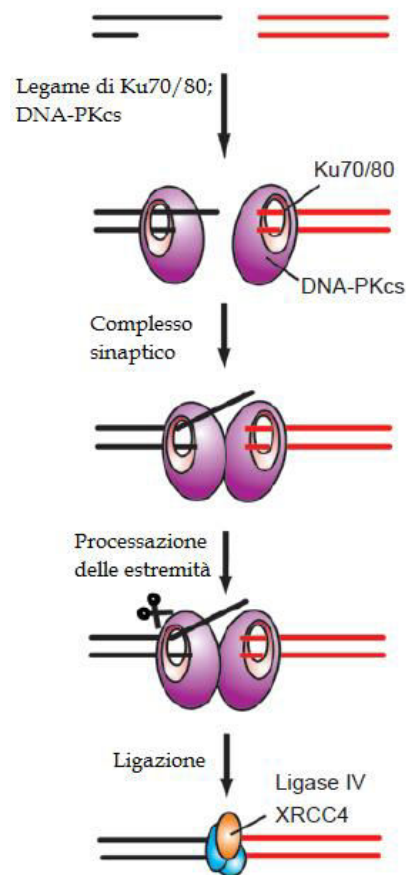


Figura 3: meccanismo di *Non homologous end joining* (NHEJ) (Modificato da Weterings et al 2008).

1.1.2.3. Modello *Fork-Stalling and Template Switching* – FoSTeS

Il modello FoSTeS basato sullo stallo della forcella di replicazione è stato introdotto da Lee nel 2007 per spiegare i riarrangiamenti non ricorrenti associati alla malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale PMD (morbo di Pelizaeus-Merzbacher) e per dimostrare che per la maggior parte essi avvengono durante la replicazione (Lee et al. 2007).

Secondo il modello, durante la replicazione, una forcella attiva può bloccarsi in corrispondenza di LCRs, per la loro instabilità genomica, o in seguito ad un danno al DNA; il filamento lento si stacca dal filamento stampo e, tramite una regione di micro-omologia, si appaia al 3' di un'altra forcella replicativa ricominciando la sintesi di DNA. Il processo di invasione, appaiamento ed estensione può avvenire numerose volte in serie riflettendo, probabilmente, la scarsa processività della DNA polimerasi coinvolta e causando così complessi

riarrangiamenti. A seconda che sia il filamento lento o il filamento stampo ad essere invaso e copiato, e a seconda della direzione di progressione della forca, il frammento incorporato erroneamente dalla nuova forcella di replicazione sarà orientato in modo diretto o inverso rispetto alla sua posizione originale. Lo spostamento verso una posizione a monte risulterà in una duplicazione, a valle in una delezione, mentre quello verso un altro cromosoma in una traslocazione (Lee et al. 2007, Zhang et al. 2009).

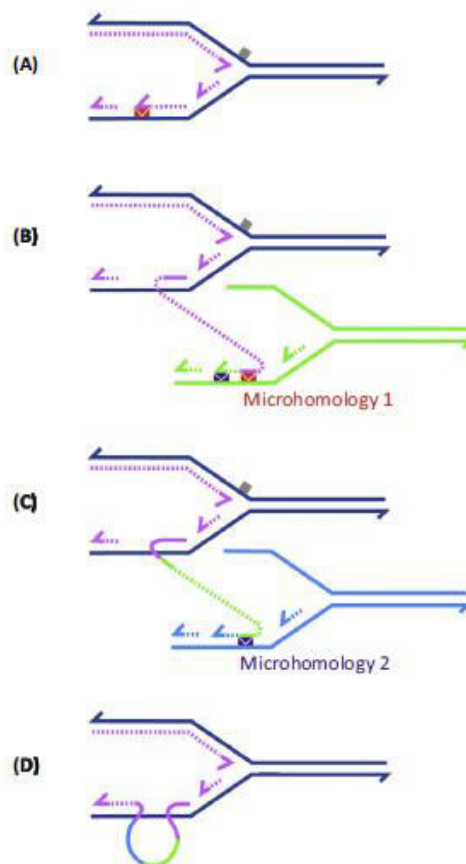


Figura 4: Modello *Fork-Stalling and Template Switching* (FoSTeS). (A) Stallo della forcella, (B) invasione di una forcella in prossimità, appaiamento tramite micro-omologia ed estensione, (C e D) Ripetizione del processo, il quale può avvenire numerose volte in serie (Modificato da Ottaviani et al. 2014)

1.1.2.4. Cromotripsi

Il fenomeno della cromotripsi è stato descritto recentemente da Stephens et al. 2011 nelle cellule tumorali come un evento catastrofico in cui avvengono numerose e simultanee rotture a carico di uno o più cromosomi e i frammenti che si formano vengono conseguentemente riassemblati in modo aberrante (Stephens et al. 2011). Alcuni studi ne hanno poi confermato l'esistenza anche in linee germinali e in cellule non cancerogene in pazienti con disordini del neurosviluppo (Kloosterman et al. 2011, Liu et al. 2011).

Inizialmente si pensava che il meccanismo alla base della cromotripsi fosse la NHEJ poiché era stato osservato che l'unione dei frammenti richiedeva una piccola o nulla omologia di sequenza. Tuttavia l'osservazione di alcuni pazienti con ritardo dello sviluppo e anomalie congenite, che presentavano riarrangiamenti complessi in cui erano presenti non solo delezioni e duplicazioni, ma anche triplicazioni, ha suggerito che anche il modello FoSTeS potesse essere coinvolto (Jones & Jallepalli, 2012; Forment et al. 2012; Kloosterman et al. 2012).

Secondo l'ipotesi di cromotripsi basata sulla NHEJ, vi è un primo step in cui il DNA genomico viene frammentato tramite DSB, dopodiché viene riassemblato in maniera disordinata sfruttando regioni di micro-omologia o in maniera *random* in base alla vicinanza fisica dei segmenti di DNA (Kloosterman et al. 2011).

L'altra ipotesi, invece, basata sul modello FoSTeS si fonda non più sulla frammentazione del DNA ma sul blocco di una forcella di replicazione con conseguente invasione e sintesi di un'altra, a monte o a valle, per numerose volte in serie.

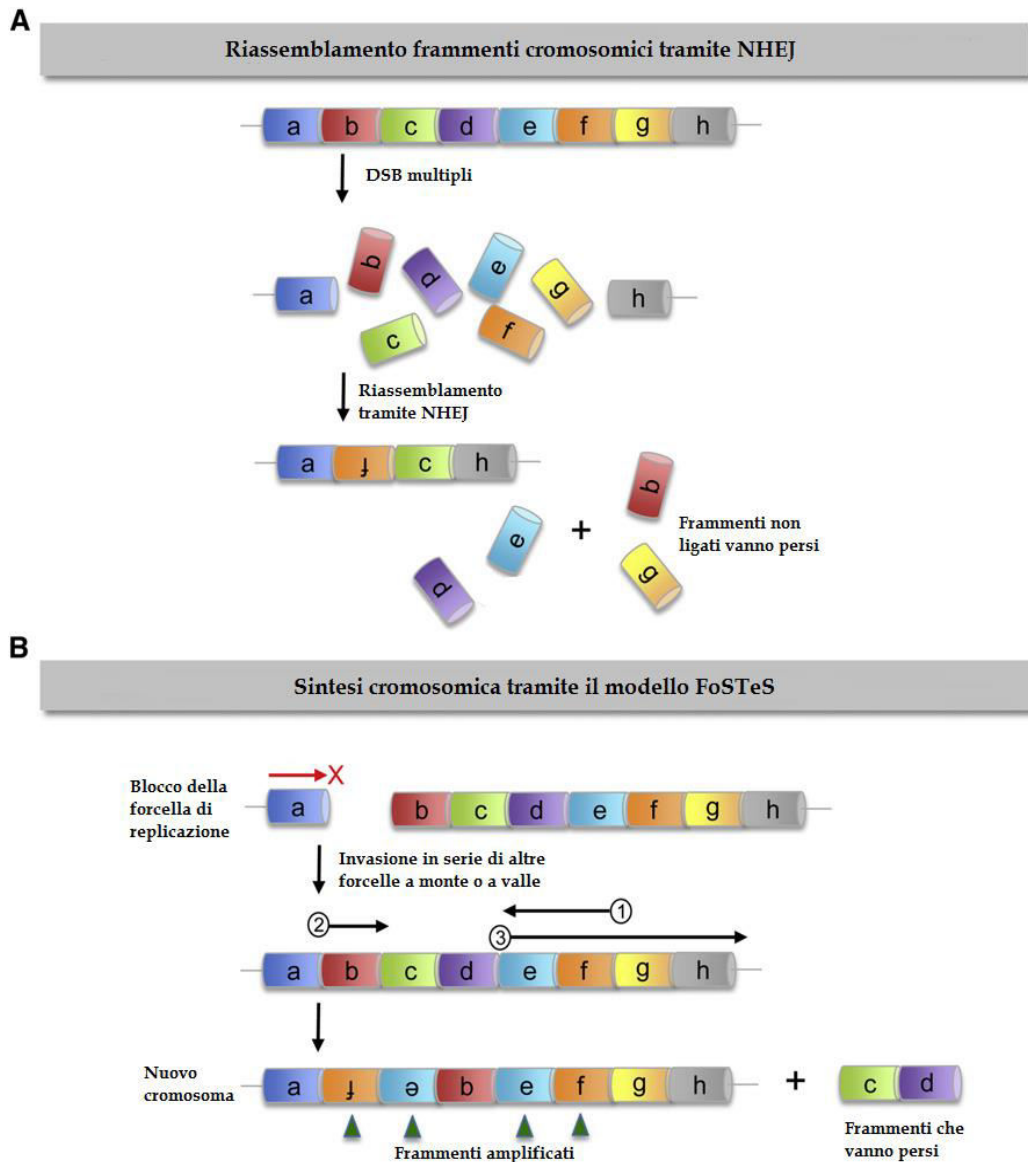


Figura 5: Fenomeno della Cromotripsis (A) mediata da NHEJ o (B) dal modello FoSTeS (Modificato da Jones et al. 2012).

1.2. ARRAY-CGH NELL'ANALISI DI RIARRANGIAMENTI GENOMICI

Dalla caratterizzazione nel 1958 da parte di Lejeune della trisomia 21 mediante l'analisi del cariotipo, i test genetici per identificare le anomalie cromosomiche si sono evoluti enormemente. Mediante l'utilizzo di tecniche di bandeggio, infatti, si è iniziato a comprendere che alterazioni nel numero e nella struttura dei cromosomi sono spesso causa di fenotipi clinici associati a ritardo mentale, autismo e anomalie congenite multiple. Tuttavia, la citogenetica tradizionale, pur utilissima nell'identificare un gran numero di anomalie cromosomiche, numeriche e strutturali, è limitata nelle sue possibilità diagnostiche dal potere di risoluzione del microscopio (Bruce R. K. 2000, 2001).

Lo sviluppo della *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), che consente di individuare specifiche sequenze di DNA a livello cromosomico, ha sicuramente costituito un passo in avanti nello screening dei riarrangiamenti genomici. A fronte di un notevole incremento di risoluzione rispetto all'analisi del cariotipo (circa 100 volte), la FISH presenta lo svantaggio di dover necessariamente disporre di un'indicazione clinica o di un preciso sospetto che indirizzi verso un locus genico specifico, in modo da poter selezionare la sonda da utilizzare nelle varie circostanze (Emanel & Saitta, 2007).

La messa a punto negli anni Novanta di una nuova tecnica di citogenetica molecolare, definita "Ibridazione Genomica Comparativa" (*Comparative Genomic Hybridization-CGH*) ha risolto la necessità di avere un mezzo di analisi in grado di valutare la presenza di eventuali anomalie cromosomiche a livello dell'intero genoma, senza sapere in anticipo cosa cercare. La CGH è stata introdotta nel 1992 da Kallionemi e inizialmente è stata applicata allo studio di cellule tumorali ma si è poi rivelata di utile impiego nella diagnosi di aberrazioni cromosomiche costituzionali, sia in epoca postnatale che prenatale (Lapierre et al. 1998). Il principio su cui si basa la tecnica è una ibridazione in situ modificata, che sfrutta la competizione tra due campioni di DNA genomico marcati con fluorocromi diversi: un campione è quello del paziente, l'altro è costituito da un pool di DNA genomico di riferimento. Nella tecnica convenzionale i DNA marcati vengono

coibridati simultaneamente su preparati metafasici normali. Il vantaggio di tale tecnica è che in un'unica ibridazione si possono ottenere informazioni sulla dimensione e sulla localizzazione di tutti gli sbilanciamenti cromosomici, tuttavia, ha un potere di risoluzione limitato, circa 5-10 Mb.

L'avvento dell'*Array Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH), descritta per la prima volta nel 1997, ha incrementato notevolmente la possibilità di individuare delezioni o duplicazioni, sia patologiche che polimorfiche, consentendo di esaminare l'intero genoma umano in un singolo esperimento con una risoluzione molto più elevata rispetto alle tecniche di bandeggio, fino a poche decine di kilobasi (Carter 2007).

La tecnologia basata sui *microarray*, infatti, ha permesso di individuare numerosi casi di sbilanciamenti cromosomici criptici, non identificati dalla citogenetica classica, responsabili del fenotipo clinico e di caratterizzare nuove sindromi da microdelezione/microduplicazione (Galasso et al. 2010, Liang et al. 2008).

L'array-CGH si basa sugli stessi principi della CGH classica, ma anziché utilizzare matrici su cui sono ibridati preparati metafasici normali, utilizza piattaforme in cui sono spottati cloni BAC (di 150-160 Kb, BAC-arrays), oligonucleotidi (di 10-100 bp, oligo-arrays), o sonde di oligonucleotidi contenenti SNPs (di 21-25 bp, SNP-arrays).

La risoluzione genomica dipende dalla lunghezza delle sonde utilizzate e dalla distanza tra una sonda e l'altra. Il risultato consiste nell'emissione di due distinti segnali e il rapporto tra le due emissioni normalmente è bilanciato e vale 1. Qualora vi siano nel DNA in esame delle delezioni o amplificazioni di materiale cromosomico, il valore di questo rapporto cambia scendendo o salendo sotto tale valore. L'utilizzo di queste piattaforme permette l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione e una precisa posizione del riarrangiamento nel genoma, e di definire i geni che mappano all'interno di tale regione, permettendo così di valutare la relazione esistente tra l'anomalia cromosomica riscontrata e la patologia.

Rispetto ad altri metodi diagnostici, l'array-CGH offre il vantaggio di essere altamente sensibile, veloce ed automatizzabile (Oostlander et al., 2004). Per tale motivo la sua applicazione ha avuto un rapido incremento nello studio di

malattie genetiche e, negli ultimi anni, ha portato ad una rivoluzione nella citogenetica dei soggetti con ritardo mentale e dello sviluppo (DD/ID), disturbi dello spettro autistico (ASD), dismorfismi e/o malformazioni (MCA), che presentano cariotipo normale poiché sta dimostrando che molti di questi sono in realtà portatori di uno sbilanciamento cromosomico responsabile per la loro condizione. In particolare, in questo gruppo di pazienti, ha aumentato del 15-20% la *detection rate* delle anomalie cromosomiche criptiche (delezioni o duplicazioni), non identificabili mediante tecniche di citogenetica standard (Chong et al. 2014, Riggs et al. 2014).

Conlin e colleghi, nel 2010, hanno osservato che il ritardo mentale può essere associato anche alla presenza di mosaicismi costituzionali, sebbene con una frequenza inferiore all'1% (Conlin et al. 2010). Nonostante l'array-CGH abbia una risoluzione molto maggiore rispetto alle tecniche di citogenetica classica, la sua sensibilità nel rilevarli non è tuttora pienamente stimata (Vermeesch et al. 2007). I dati finora riportati dimostrano che gli oligo-array sono in grado di caratterizzare mosaicismi che coinvolgono almeno il 20-30% delle cellule (Ballif et al. 2006, Neill et al. 2010, Valli et al. 2011). Tuttavia è stato osservato che tale capacità è proporzionale alla dimensione del frammento cromosomico interessato perciò maggiore è l'ampiezza dell'anomalia, maggiore è la possibilità che la tecnica rilevi il mosaicismo anche se questo coinvolge un numero limitato di cellule (Miller et al. 2010).

L'elevata sensibilità della tecnica di array-CGH nel rilevare sbilanciamenti cromosomici ha portato nel 2010 alla proposta, da parte dell'*International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium*, dell'utilizzo di *microarray* genomici come esame di primo livello in individui con disabilità intellettive e anomalie congenite (Miller et al. 2010).

1.3. ARRAY-CGH IN DIAGNOSI PRENATALE

L'analisi citogenetica convenzionale è il metodo *gold standard* nella diagnosi genetica prenatale da più di trent'anni, da quando sono state sviluppate le tecniche di bandeggio nel 1970. Negli ultimi anni, tuttavia, grazie all'introduzione dell'array-CGH nella diagnosi postnatale, è emerso sempre più chiaramente che l'analisi del cariotipo non è in grado di rilevare gran parte dei riarrangiamenti associati a ritardo mentale e anomalie congenite, in quanto inferiori al limite di risoluzione della tecnica (circa 5-10Mb) (Galasso et al. 2010, Liang et al. 2008).

Per questo si è iniziato a pensare che l'utilizzo dell'array-CGH anche in diagnosi prenatale potrebbe permettere di superare alcuni limiti legati sia all'analisi del cariotipo sia alla FISH. Vi sarebbero, infatti, la possibilità di utilizzare il campione fetale senza la necessità di allestire colture cellulari, che diminuirebbe il tempo di attesa per la diagnosi, e una maggiore sensibilità della tecnica la quale consentirebbe di rilevare sbilanciamenti cromosomici criptici anche dell'ordine di poche chilobasi (SIGU e SIEOG, 2014).

Tuttavia, poiché l'analisi mediante *microarray* genomici è di tipo quantitativo, non è possibile rilevare aberrazioni cromosomiche bilanciate, quali traslocazioni e inversioni, né determinare l'ordine e l'orientamento dei segmenti riarrangiati. Inoltre non vengono individuate le alterazioni strutturali che coinvolgono le regioni eterocromatiche dei cromosomi né mosaicismi che coinvolgano meno del 20-30% delle cellule. A questi limiti tecnici si aggiunge una difficoltà interpretativa dei risultati, con particolare riferimento alle varianti di significato clinico incerto (VOUS) e alla disomogeneità nel definire le CNVs patologiche. Molte variazioni strutturali, infatti, sono state associate a patologie con espressività variabile e penetranza incompleta, oltre che a patologie ad insorgenza tardiva (Vermeesch et al. 2007, Hillman et al. 2011), altre invece, possono essere considerate verosimilmente patogenetiche per quadri clinici non correlati alle specifiche indicazioni per le quali era stata richiesta l'analisi mediante *microarray* (*incidental findings*).

Inoltre quasi tutti i dati disponibili in letteratura e nei *database* riguardano casistiche analizzate in epoca postnatale, in base a specifiche indicazioni mediche, e quindi presentano possibili *bias* di selezione (Riggs et al, 2012, 2013). Analogamente i *database* che raccolgono popolazioni “apparentemente sane” non contengono spesso i dati clinici dei soggetti analizzati e, pertanto, sono poco attendibili, in particolare per interpretare risultati ottenuti in epoca prenatale (Duclos et al. 2011). Tutto ciò contribuisce ulteriormente a rendere difficile l’assimilazione delle CNVs in rigide categorie e porta ad una incertezza in termini prognostici sulla salute del feto.

Senza trascurare questi importanti limiti, recentemente è stato riportato che l’utilizzo di *microarray* in epoca prenatale aumenterebbe dell’1% la *detection rate* di anomalie genomiche in campioni analizzati per motivi di screening, come ansia materna ed età materna superiore a 35 anni, e fino al 7% nei casi analizzati in base al riscontro di anomalie ecografiche (Callaway et al. 2014).

Le criticità inerenti l’utilizzo prenatale dell’analisi cromosomica molecolare, sia dal punto di vista tecnico, sia per l’impatto psicologico che i risultati possono avere sulla coppia, sono state ampiamente discusse a livello internazionale e hanno prodotto conclusioni controverse (SIGU e SIEOG, 2014, Novelli et al. 2012, Wapner et al. 2012, Ganesamoorthy et al. 2013, Kan et al. 2014).

In Italia non esiste attualmente una regolamentazione che stabilisca in maniera precisa l'utilizzo dell'array-CGH in diagnosi prenatale, tuttavia la Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) e la Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica (SIEOG), nelle linee guida pubblicate nel 2014, lo considerano un test di secondo livello in associazione al cariotipo classico e raccomandano una strategia condivisa nell’analisi cromosomica mediante *microarray* in epoca prenatale.

In particolare vengono considerate indicazioni all’analisi mediante *microarray*:

- anomalie ecografiche, in particolare nei casi in cui non è possibile formulare una specifica diagnosi;
- riarrangiamenti cromosomici *de novo* apparentemente bilanciati e sbilanciati;
- caratterizzazione di un cromosoma marcatore.

Inoltre viene suggerito di utilizzare una risoluzione di almeno 200Kb per le regioni responsabili di sindromi da microdelezione/microduplicazione e/o contenenti geni malattia, mentre una risoluzione di 500Kb per tutte le altre regioni del genoma.

2. SCOPO

Gli scopi di questo progetto sono:

- verificare la presenza di riarrangiamenti cromosomici criptici in pazienti con ritardo mentale e anomalie congenite multiple, in modo da dimostrare l'utilità dell'impiego di *microarray* genomici come esame di primo livello per la caratterizzazione delle cause molecolari alla base del fenotipo patologico;
- analizzare i *breakpoints* degli sbilanciamenti cromosomici identificati per verificare la presenza di regioni di omologia che possano aver predisposto al riarrangiamento;
- valutare se il meccanismo di formazione e il significato clinico delle CNVs identificate possano essere correlati al pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditate), al tipo (delezione/duplicazione) o alle dimensioni dello sbilanciamento;
- analizzare la distribuzione delle CNVs nel genoma per valutare l'esistenza di una correlazione significativa tra dimensioni dei cromosomi e numero di anomalie rilevate;
- stimare la sensibilità dell'array-CGH nell'identificazione di mosaicismi;
- valutare se l'array-CGH possa essere utilizzato come test di primo livello in diagnosi prenatale in sostituzione al cariotipo standard

3. POPOLAZIONE IN STUDIO

Sono stati valutati 1051 soggetti afferenti al servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dismorfismi.

Sono stati, inoltre, analizzati 12 campioni fetali di villi coriali o liquido amniotico, 10 dei quali presentavano anomalie ecografiche e/o sbilanciamenti cromosomici non completamente caratterizzati mediante cariotipo, mentre in 2 casi è stata eseguita una ricerca diretta di sbilanciamenti già identificati in altri membri della famiglia.

Tutti i soggetti candidati allo studio hanno fornito il consenso a procedere all'analisi e al trattamento dei loro dati genetici.

4. MATERIALI E METODI

4.1. ESTRAZIONE DNA GENOMICO

4.1.1. Estrazione DNA genomico da sangue periferico

Il DNA genomico è stato estratto da linfociti, a partire da un prelievo di sangue periferico trattato con EDTA, secondo il protocollo del kit commerciale *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Sono stati utilizzati buffer di reazione per lisare le cellule e denaturare le proteine, proteasi K per digerire le proteine ed etanolo assoluto per la precipitazione del DNA. Dopodiché è stato utilizzato un sistema a colonnine in cui il DNA genomico è stato purificato da sali, proteine ed altre impurità cellulari mediante soluzioni di lavaggio, ed infine eluito.

4.1.2. Estrazione DNA genomico da villi coriali e amniociti

L'estrazione di DNA da villi coriali e amniociti è stata eseguita facendo riferimento al protocollo *Gentra Puregene Handbook* (Qiagen). In presenza di campioni di liquido amniotico fresco sono state precedentemente allestite colture cellulari per ottenere un numero di cloni sufficienti all'analisi genetica.

Brevemente, i campioni sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi con PBS1X, dopodiché sono stati utilizzati buffer di reazione per la lisi cellulare e la precipitazione delle proteine. È stato poi utilizzato isopropanolo per la precipitazione del DNA ed etanolo 70% per purificare da sali e altre impurità. Infine il DNA genomico è stato eluito in TE1X.

4.1.3. Controllo della qualità del DNA genomico estratto

Una prima verifica della qualità del DNA estratto è stata fatta mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Sono stati valutati sia l'integrità del materiale ottenuto sia l'eventuale presenza di RNA poiché entrambi sono fattori che possono inficiare la successiva analisi mediante array-CGH. I campioni in cui è

stata riscontrata la presenza di molecole di RNA sono stati trattati con RNasi secondo il protocollo *Gentra Puregene Handbook* (Qiagen).

Successivamente è stato utilizzato lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 UV-Vis per determinare la concentrazione e il grado di purezza del DNA. Lo strumento è impostato in modo che ad una lunghezza d'onda di 260 nm, una assorbanza pari a 1 sia indice di una concentrazione di 50 ng/ μ l di dsDNA. Il campione viene letto a differenti lunghezze d'onda (260, 280 e 230 nm) per fornire rapporti di assorbanza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} come indice della contaminazione da proteine e da solventi rispettivamente. Valori di purezza ottimali sono compresi tra 1,8 e 2.

4.2. ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

L'analisi molecolare mediante array-CGH è stata eseguita utilizzando *microarray* 44K (*Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 44A*) con una risoluzione di circa 100 Kb. In alcuni casi sono stati utilizzati anche *microarray* 244K che hanno una copertura genomica cinque volte superiore a quella dei 44K, in quanto composti da 244.000 sonde e con una risoluzione media di 50Kb.

Il protocollo utilizzato per l'array-CGH è costituito da 10 step (Figura 6).

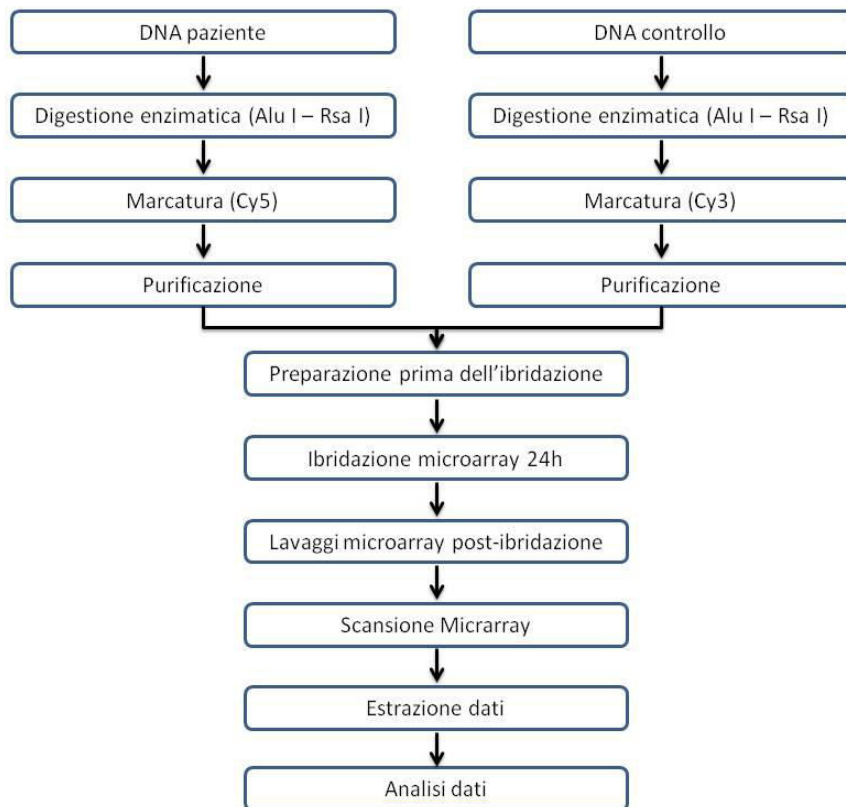


Figura 6: workflow array-CGH

4.2.1.Estrazione DNA

4.2.2.Digestione enzimatica

1µg di DNA (1,2µg nel caso di *microarray* 244K) del paziente e del controllo vengono sottoposti a digestione enzimatica, secondo il protocollo riportato di seguito, con gli enzimi di restrizione Alu I e Rsa I (Agilent Technologies) che, riconoscendo le sequenze 5'-AG $\overline{\sim}$ CT-3', 3'-TC $\overline{\sim}$ GA-5' (AluI) e 5'-GT $\overline{\sim}$ AC-3', 3'-CA $\overline{\sim}$ TG-5' (RsaI) rispettivamente, creano estremità piatte.

Mix di reazione	Quantità (µl) x1
H2O	2.0
BUFFER C 10x	2.6
BSA 100X	0.2
Alu I	0.5
Rsa I	0.5
TOTALE	5.8

Tabella 1: mix di digestione con kit Agilent Technologies

Temperatura	Tempo
37°C	2h
65°C	20'
4°C	∞

Tabella 2: profilo termico della reazione di digestione

4.2.3. Marcatatura del DNA

Ciascun campione, dopo l'aggiunta di 5µl di Random Primers (Agilent Technologies), viene incubato a 98°C per 3' e in ghiaccio per 5'. Dopodichè il campione di DNA del paziente e quello del controllo vengono marcati con fluorocromi differenti, secondo i protocolli riportati di seguito:

Mix di reazione paziente	Quantità (µl) x1
BUFFER 5x	10
dNTPs 10X	5
Cyanine 5-dUTP (1 mM)	3
Exo Klenow fragment	1
TOTALE	19

Tabella 3: mix di marcatatura per il paziente con Kit Agilent Technologies

Mix di reazione controllo	Quantità (µl) x1
BUFFER 5x	10
dNTPs 10X	5
Cyanine 3-dUTP (1 mM)	3
Exo Klenow fragment	1
TOTALE	19

Tabella 4: mix di marcatatura per il controllo con Kit Agilent Technologies

Temperatura	Tempo
37°C	2h
65°C	10'
4°C	∞

Tabella 5: profilo termico della reazione di marcatatura

4.2.4.Purificazione DNA marcato

Dopo la marcatura i campioni vengono purificati tramite un sistema a colonnine (Microcon YM-30 Agilent Technologies) in cui vengono sottoposti a lavaggi con buffer TE1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) per rimuovere le cianine Cy5 e Cy3 non incorporate al DNA.

Quindi, il DNA marcato e purificato viene controllato al Nanodrop per determinarne la concentrazione finale (A260nm) e l'incorporazione del fluorocromo (A550nm per Cy3 e A650nm per Cy5).

Viene calcolata l'attività specifica per ogni campione mediante la formula

$$\text{Attività specifica} = \frac{\text{pmol}/\mu\text{l di Cy3 o Cy5}}{\mu\text{g}/\mu\text{l di DNA}}$$

I valori devono essere compresi tra 20 e 35 pmol/ μg per la Cy5 e tra 25 e 40 pmol/ μg per la Cy3.

4.2.5.Preparazione prima dell'ibridazione

Il DNA marcato del paziente e del controllo vengono uniti a partire da 9-12 μg ciascuno, secondo la formula

$$\text{Resa dopo marcatura}(\mu\text{g}) = \frac{(\text{ng}/\mu\text{l di DNA}) \times (\mu\text{l finali})}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

Successivamente vengono aggiunti, secondo il protocollo riportato di seguito, Cot-1 DNA per bloccare le sequenze altamente ripetute in modo che non si ibridino in maniera aspecifica all'*array*, e i buffer necessari all'ibridazione dei campioni sul vetrino.

Mix di reazione (<i>array</i> 4x44K)	Quantità (μl) x1
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL) (Invitrogen)	5
10 \times aCGH Blocking Agent (Agilent)	11
2 \times HI-RPM Hybridization Buffer (Agilent)	55
TOTALE	71

Tabella 6: mix di ibridazione per *microarray* 4x44K

Mix di reazione (<i>array</i> 244K)	Quantità (µl) x1
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL) (Invitrogen)	50
10× aCGH Blocking Agent (Agilent)	52
2× HI-RPM Hybridization Buffer (Agilent)	260
TOTALE	362

Tabella 7: mix di ibridazione per *microarray* 244K

Temperatura	Tempo
98°C	3'
37°C	30'

Tabella 8: profilo termico della reazione precedente all'ibridazione

4.2.6. Ibridazione *microarray*

Nel caso *microarray* 4x44K, un volume totale pari a 110µl per ogni campione viene distribuito sui vetrini, i quali vengono poi incubati in rotazione (20 rpm) a 65°C per 24h.

Nel caso, invece, di *microarray* 244K, il volume totale è pari a 520µl e i vetrini vengono incubati in rotazione (20 rpm) a 65°C per 40h.

4.2.7. Lavaggi post-ibridazione

Per eliminare l'eccesso di DNA non ibridato, i *microarray* vengono sottoposti a una serie di lavaggi mediante diverse soluzioni:

Soluzione	Tempo
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1	5'
Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 (scaldato a 37°C)	1'
Acetonitrile 100%	1'

Tabella 9: procedura di lavaggio dei *microarrays*

4.2.8.Scansione microarray

La lettura degli *array* è eseguita con uno scanner Agilent (G2505C) che misura le intensità di fluorescenza emesse dai DNA ibridati e fornisce l'immagine su cui viene effettuata l'elaborazione dei dati tramite appositi *software*.

4.2.9.Estrazione dati

I dati vengono elaborati tramite il *software Feature Extraction V.10.1.1.1*, il quale calcola per ogni *probe* il logaritmo in base 2 del rapporto tra l'intensità di fluorescenza emessa dalla Cy5 e dalla Cy3, oltre ad effettuare una normalizzazione globale, tramite sottrazione del *background* e correzione della mediana, per rimuovere eventuali distorsioni sistematiche.

Il rapporto tra le intensità di fluorescenza rilevate è proporzionale al rapporto tra il numero di copie di DNA nel campione d'interesse e nel pool di controllo. Se il rapporto tra Cy5 e Cy3 è pari a 1, la regione analizzata non presenta alterazioni poiché sono presenti 2 copie sia del DNA del paziente sia del controllo ($\log_2 2/2 = 0$). Se, invece, il rapporto tra fluorocromi è alterato, cioè maggiore o minore di 1, si ha, rispettivamente, una amplificazione o una delezione. Nel caso di duplicazione sono presenti 3 copie del DNA del paziente ($\log_2 3/2 = 0.58$) mentre nel caso di delezione solo 1 copia ($\log_2 1/2 = -1$).

4.2.10. Analisi dei dati

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il *software Agilent Genomic Workbench Lite Edition 6.0*. I parametri di analisi che sono stati utilizzati sono: ADM-1 con threshold 5.0, Fuzzy-Zero, Centralization algorithm, e Aberration Filter con minimo numero di *probes* 3.

Per valutare i dati ottenuti, si è fatto riferimento al *Genome Assembly del 2006* (hg18, NCBI Build 36.1) e al *Genome Assembly del 2009* (GRCh37/hg19). Per la classificazione del significato clinico delle CNVs identificate sono stati inoltre consultati il sito *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>), il *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), il *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER) (<https://decipher.sanger.ac.uk/>), il *Database* del consorzio ISCA

(International Standards for Cytogenomic Arrays - <http://www.iccg.org/>) e il *Database delle varianti genomiche di Troina* (<http://gvarianti.homelinux.net/gvariantib37/index.php>).

4.3. ANALISI BIOINFORMATICA E TEST STATISTICI

Per l'analisi dei punti di rottura sono stati consultati l'*UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) e il *Database of Genomic Variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), mentre mediante i software *Pipmaker* (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>) e *zPicture* (<http://zpicture.dcode.org/>) è stato possibile allineare le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* in modo da verificarne la percentuale di identità.

Tutti i dati ottenuti nello nostro studio sono stati analizzati mediante *Microsoft Access 2007* e *Microsoft Excel 2007*.

Le frequenze delle variabili categoriche sono state espresse come percentuali e paragonate mediante il test χ^2 ; sono stati inoltre calcolati gli OR con intervallo di confidenza al 95%.

La correlazione tra dimensioni dei cromosomi e numero di CNVs identificate è stata valutata mediante il test di Spearman calcolando il coefficiente r di correlazione.

Test con *p-value* inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

5. RISULTATI

5.1. CARATTERIZZAZIONE DELLE CNVs

Nel periodo che va da Gennaio 2012 a Dicembre 2014 sono stati valutati 1051 soggetti afferenti al servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dismorfismi. L'applicazione dell'array-CGH come ad una risoluzione media di circa 100Kb ha permesso di identificare sbilanciamenti cromosomici in 347 pazienti (33%), 202 maschi e 145 femmine (Fig.7). Di questi, 35 (3.3%) presentano almeno un'anomalia maggiore di 10Mb perciò individuabile mediante l'analisi del cariotipo.

In alcuni pazienti sono state caratterizzate CNVs multiple che sono state analizzate singolarmente.

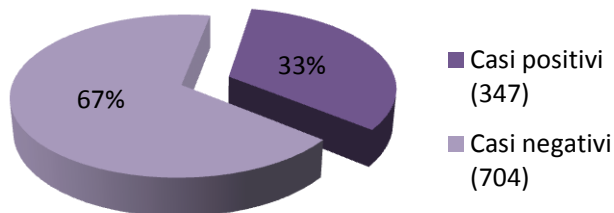


Figura 7: casi analizzati mediante array-CGH

Sono state identificate 431 CNVs, che sono state suddivise in 4 classi: CNVs patologiche, VOUS verosimilmente patologiche, VOUS e VOUS verosimilmente benigne (Fig. 8), come definito nel paragrafo 1.1.1. Non sono state riportate le CNVs classificate come benigne poiché non contribuiscono al fenotipo clinico dei pazienti.

Il 15.8% dei casi esaminati (166/1051) è risultato portatore di una CNVs patologica o VOUS verosimilmente patologica.

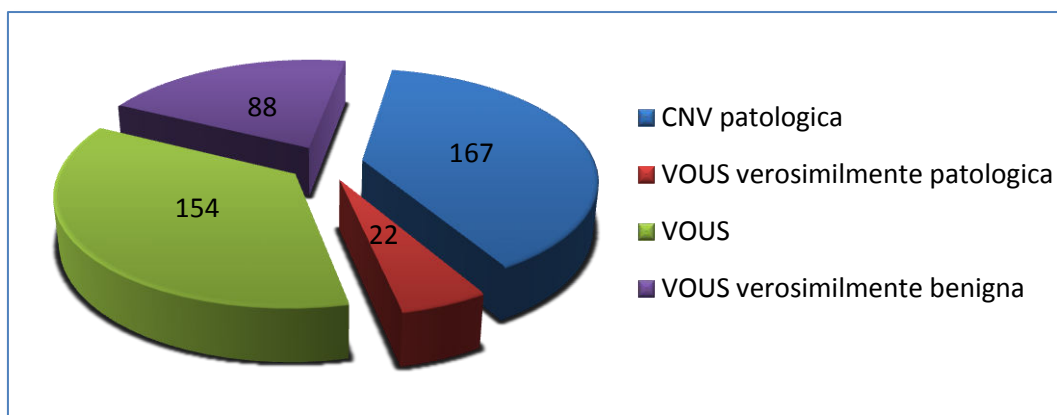


Figura 8: classificazione CNVs identificate tramite array-CGH

5.1.1. Significato clinico delle CNVs, tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni) e pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditate)

Le CNVs sono state ulteriormente suddivise in base al tipo di anomalia (delezione vs duplicazione).

Dall'analisi è emerso che tra le CNVs patologiche e le VOUS verosimilmente patologiche, le delezioni hanno una frequenza maggiore rispetto alle duplicazioni, mentre tra le VOUS verosimilmente benigne è maggiore la percentuale delle duplicazioni (Tabella 10, Figura 9). L'applicazione del test del χ^2 , ha confermato che esiste una correlazione statisticamente significativa tra tipo di anomalia (delezione vs duplicazione) e il significato clinico delle CNVs ($p < 0.01$).

	Delezione	Duplicazione
CNV patologica	111 (66.5%)	56 (33.5%)
VOUS verosimilmente patologica	14 (63.6%)	8 (36.4%)
VOUS	77 (50%)	77 (50%)
VOUS verosimilmente benigna	23 (26.1%)	65 (73.9%)
Totale	225 (52.2%)	206 (47.8%)

Tabella 10: CNVs suddivise in base a significato clinico e tipo di anomalia (delezione vs duplicazione); percentuali calcolate sul totale di riga.

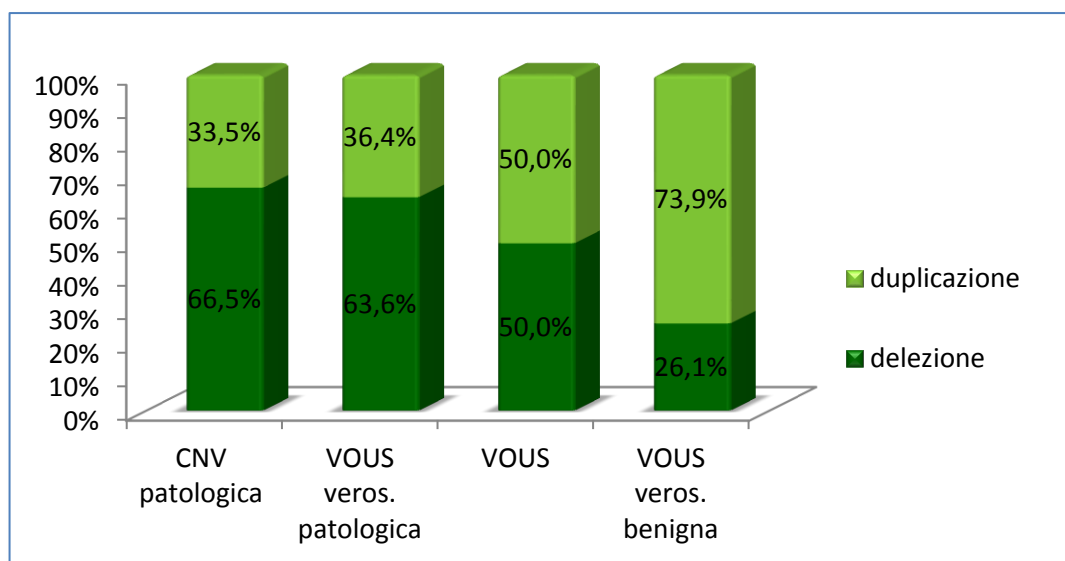


Figura 9: valore percentuale di CNVs delete e duplicate, suddivise nelle diverse classi di significato clinico.

Tra tutte le delezioni identificate, la percentuale di CNVs patologiche o VOUS verosimilmente patologiche è risultata pari a 55.5% e significativamente superiore rispetto a quella osservata per le duplicazioni (31.1%) ($p < 0.01$; OR 2.59, 95% CI 1.71-3.92) (Tabella 11, Fig. 10).

Al contrario, tra tutte le duplicazioni riscontrate, la percentuale di CNVs verosimilmente benigne, risultata pari a 31.6%, è significativamente superiore rispetto a quella osservata per le delezioni (10.2%) ($p < 0.01$; OR 3.24, 95% CI 1.91-5.51) (Tabella 11, Fig. 10).

	Totale	Delezione	Duplicazione
CNV patologica	167 (38.7%)	111 (49.3%)	56 (27.2%)
VOUS verosimilmente patologica	22 (5.1%)	14 (6.2%)	8 (3.9%)
VOUS	154 (35.7%)	77 (34.2%)	77 (37.4%)
VOUS verosimilmente benigna	88 (20.4%)	27 (10.2%)	61 (31.6%)

Tabella 11: CNVs suddivise in base a significato clinico e tipo di anomalia (delezione vs duplicazione); percentuali calcolate sul totale di colonna.

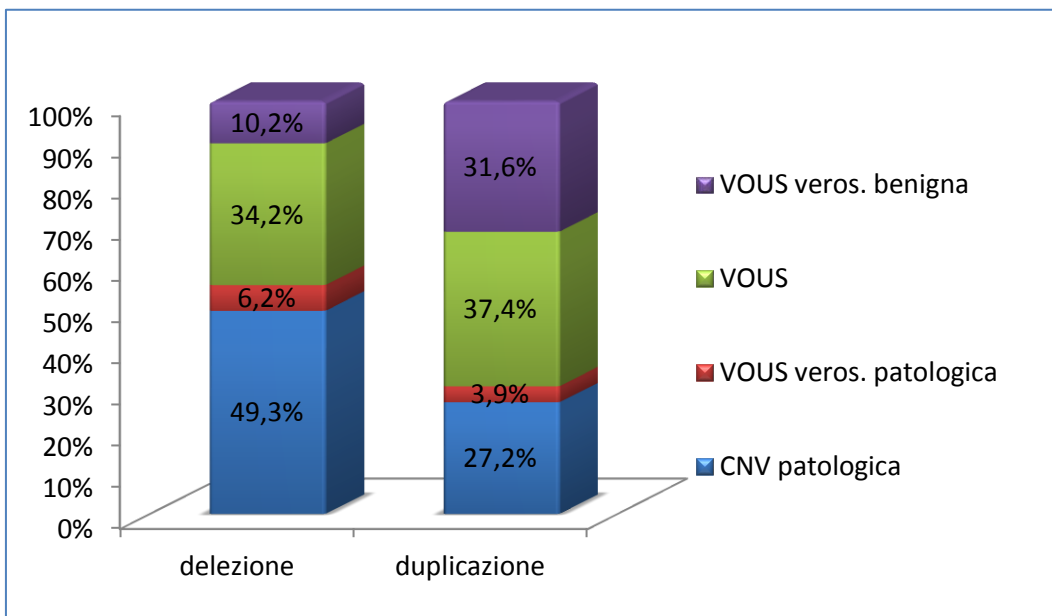


Figura 10: valore percentuale delle CNVs nelle classi di significato clinico, suddivise in base al tipo di anomalia (delezione vs duplicazione)

In 232 casi è stato possibile estendere l'analisi ai genitori e determinare se le CNVs siano state ereditate da uno di essi o siano insorte *de novo*. Su un totale di 290 CNVs, 150 sono risultate *de novo* (51.7%) mentre 140 sono state ereditate (48.3%).

La maggior parte delle CNVs patologiche e delle VOUS verosimilmente patologiche sono risultate essere insorte *de novo* (74.8% e 89.5%), mentre le VOUS sono più frequentemente ereditate da un genitore (60.6%). Come atteso, la percentuale di anomalie ereditate è preponderante (78.5%) tra le VOUS verosimilmente benigne in quanto la trasmissione della CNV da genitore clinicamente sano è uno dei criteri per la classificazione in tale categoria (Tabella 12, Figura 11). L'applicazione del test del χ^2 ha confermato che esiste una correlazione statisticamente significativa tra pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditate) e significato clinico delle CNVs ($p < 0.01$).

	<i>de novo</i>	ereditata
CNV patologica	80 (74.8%)	27 (25.2%)
VOUS verosimilmente patologica	17 (89.5%)	2 (10.5%)
VOUS	37 (39.4%)	60 (60.6%)
VOUS verosimilmente benigna	14 (21.5%)	51 (78.5%)
Totale	150 (51.7%)	140 (48.3%)

Tabella 12: CNVs suddivise in base a significato clinico e pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditata); percentuali calcolate sul totale di riga.

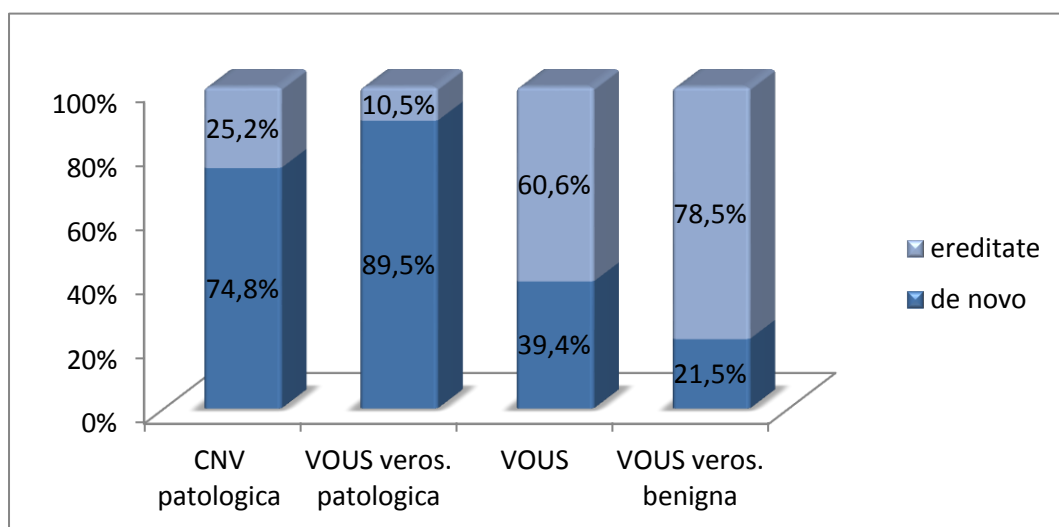


Figura 11: valore percentuale di anomalie *de novo* ed ereditate, suddivise nelle diverse classi di significato clinico

Tra tutte le anomalie *de novo*, la percentuale di CNVs patologiche o VOUS verosimilmente patologiche è risultata pari a 64.6% e significativamente superiore rispetto a quella osservata per le anomalie ereditate (20.7%) ($p < 0.01$; OR 7.01, 95% CI 4.00-12.31) (Tabella 13, Fig. 12).

Al contrario, tra tutte le anomalie ereditate, la percentuale di VOUS risultata pari a 42.9% è significativamente superiore rispetto a quella osservata per le anomalie insorte *de novo* (26%) ($p < 0.01$; OR 2.13, 95% CI 1.26-3.61) (Tabella 13, Fig. 12).

	Totale	<i>de novo</i>	ereditata
CNV patologica	107 (36.9%)	80 (54.3%)	27 (19.3%)
VOUS verosimilmente patologica	19 (6.6%)	17 (11.3%)	2 (1.4%)
VOUS	99 (34.1%)	39 (26%)	60 (42.9%)
VOUS verosimilmente benigna	65 (22.4%)	14 (9.3%)	51 (36.4%)

Tabella 13: CNVs suddivise in base a significato clinico e pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditata); percentuali calcolate sul totale di colonna.

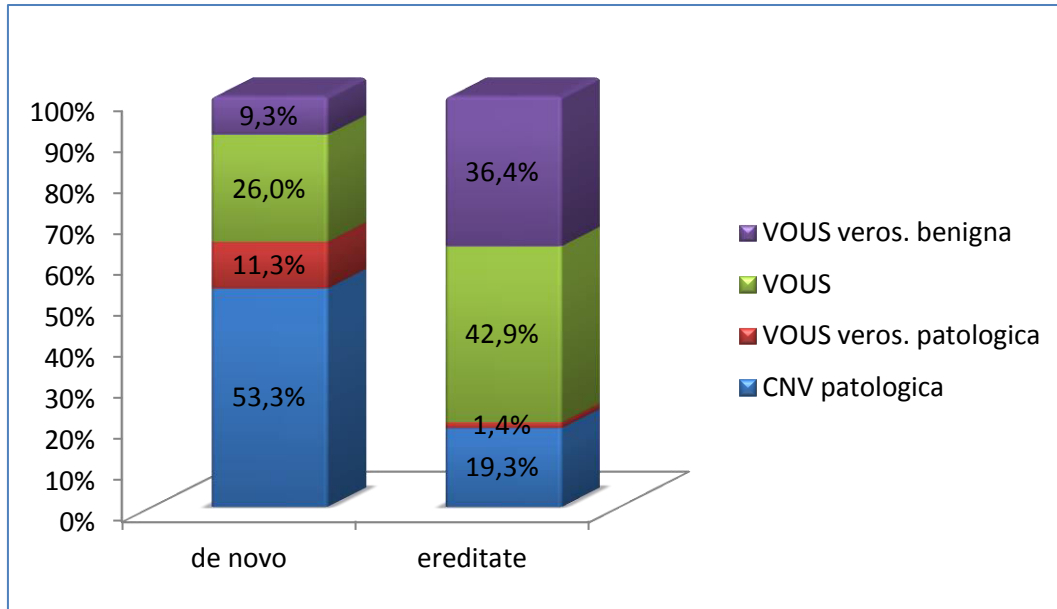


Figura 12: valore percentuale delle CNVs nelle classi di significato clinico, suddivise in base a pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditata)

5.1.2. Significato clinico e dimensioni delle CNVs

Le CNVs sono poi state distribuite in 6 classi diverse di dimensioni come indicato in tabella 14.

Dall'analisi è emerso che tra il significato clinico delle CNVs e le loro dimensioni esiste una correlazione statisticamente significativa ($p < 0.01$).

La maggior parte delle CNVs superiori a 1Mb è risultata essere patologica o VOUS verosimilmente patologica, mentre quelle inferiori a 1Mb sono più frequentemente VOUS e VOUS verosimilmente benigne (Tabella 14, Figura 13). È stato inoltre osservato che tutte le CNVs di dimensioni maggiori a 5Mb sono state classificate come patologiche o VOUS verosimilmente patologiche.

Dimensioni	CNV patologica + VOUS verosimilmente patologica	VOUS + VOUS verosimilmente benigna
<200 Kb	9 (10.3%)	78 (89.7%)
200<x<300 Kb	3 (7.5%)	37 (92.5%)
300<x<500 Kb	5 (7.5%)	62 (92.5%)
500 Kb<x<1 Mb	23 (39.7%)	35 (60.3%)
1Mb<x<5Mb	82 (73.2%)	30 (26.8%)
>5Mb	67 (100.0%)	0 (0%)
Totale	189 (43.8%)	242 (56.2%)

Tabella 14: CNVs suddivise in base a dimensioni e significato clinico; percentuali calcolate sul totale di riga

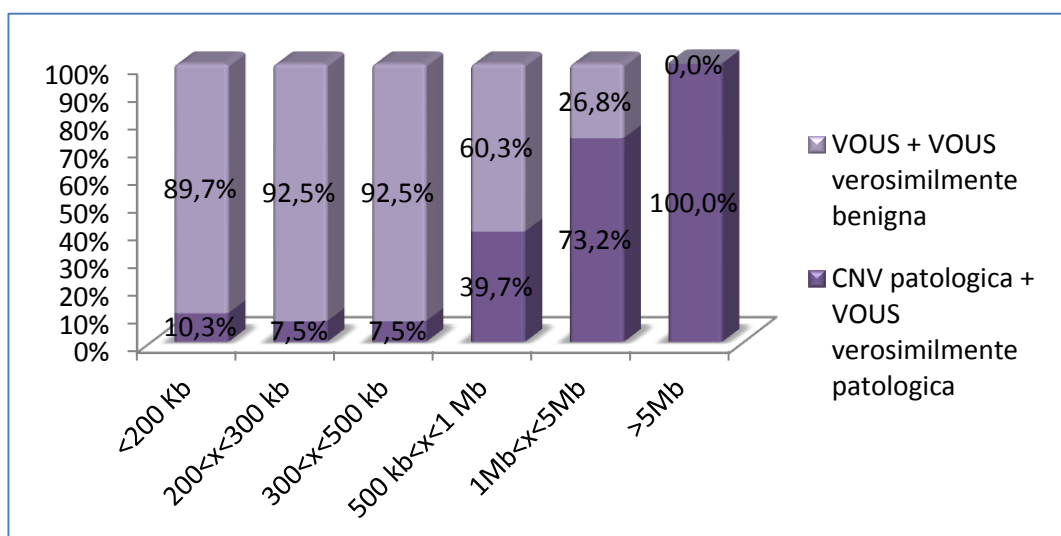


Figura 13: valore percentuale di CNVs a diverso significato clinico, suddivise in base alle dimensioni dei riarrangiamenti.

L'analisi ha evidenziato che la frequenza di anomalie patologiche o VOUS verosimilmente patologiche maggiori di 1Mb, pari al 78.8%, è significativamente superiore rispetto a quella osservata tra le CNVs classificate come VOUS e VOUS verosimilmente benigne (12.4%) per lo stesso intervallo di dimensioni ($p < 0.01$). Viceversa per quanto riguarda le CNVs inferiori a 200Kb ($p < 0.01$) (Tabella 15, Figura 14).

Dimensioni	Totale	CNV patologica + VOUS verosimilmente patologica	VOUS + VOUS verosimilmente benigna
<200 Kb	87 (20.2%)	9 (4.8%)	78 (32.2%)
200<x<300 Kb	40 (9.3%)	3 (1.6%)	37 (15.3%)
300<x<500 Kb	67 (15.5%)	5 (2.6%)	62 (25.6%)
500 Kb<x<1 Mb	58 (13.5%)	23 (12.2%)	35 (14.5%)
1Mb<x<5Mb	112 (26.0%)	82 (43.4%)	30 (12.4%)
>5Mb	67 (15.5%)	67 (35.4%)	0 (0%)

Tabella 15: CNVs suddivise in base a dimensioni e significato clinico; percentuali calcolate sul totale di colonna.

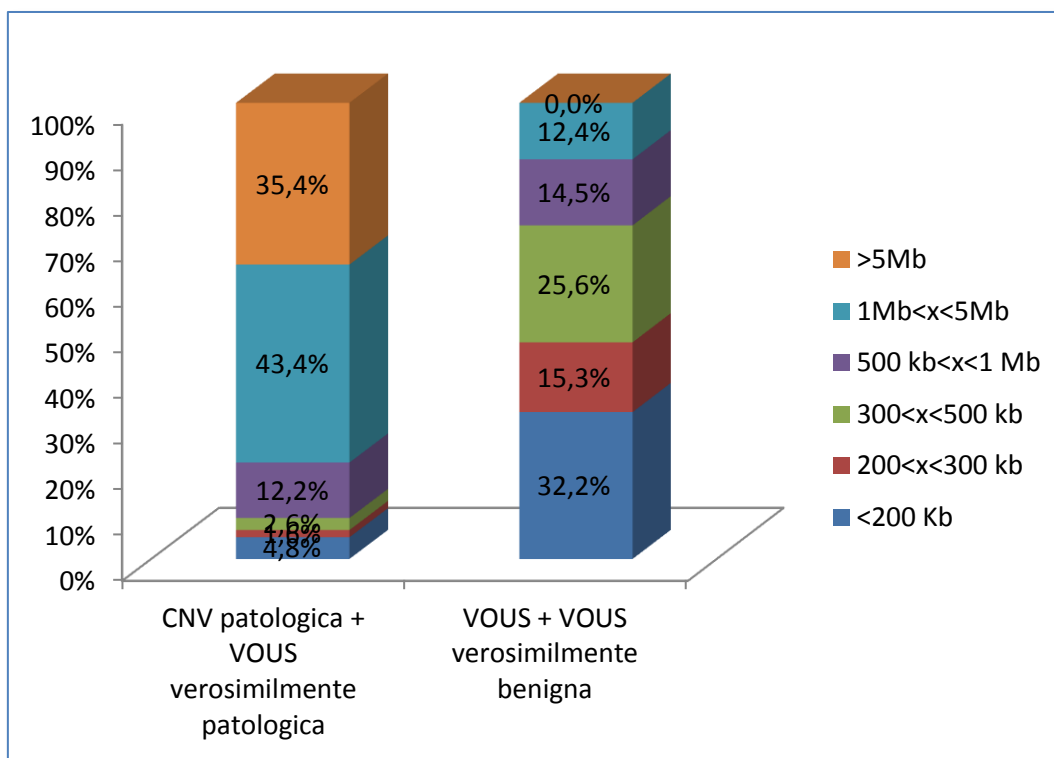


Figura 14: valore percentuale delle dimensioni dei riarrangiamenti suddivisi in base al significato clinico delle CNVs.

5.1.3. Meccanismo di formazione, pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditate) e tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni)

Le variazioni strutturali identificate sono state suddivise in base alla presenza di LCRs o micro-omologie ai *breakpoints* per distinguere tra i riarrangiamenti formati mediante NAHR e quelli dovuti ad altri meccanismi, come NHEJ e il modello FoSTeS. Nonostante la NAHR possa verificarsi anche in corrispondenza di sequenze LINE e SINE, non sono state osservate CNVs mediate da tali elementi.

Dall'analisi è emerso che i meccanismi di formazione delle CNVs più frequenti sono quelli mediati da micro-omologie (nel totale 320/431=74.2%).

Il meccanismo di formazione degli sbilanciamenti cromosomici non è risultato essere correlato né al tipo di CNV (delezione o duplicazione) (tabelle 16-17 e figure 15-16) né al pattern di ereditarietà (anomalia *de novo* o ereditata) ($p>0.05$) (tabelle 18-19 e figure 17-18).

	CNVs associate a LCRs	CNVs associate a micro-omologie
Delezioni	62 (27.6%)	163 (72.4%)
Duplicazioni	49 (23.8%)	157 (76.2%)
Totale	111 (25.8%)	320 (74.2%)

Tabella 16: CNVs suddivise in base a meccanismo di formazione e tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni); percentuali calcolate sul totale di riga.

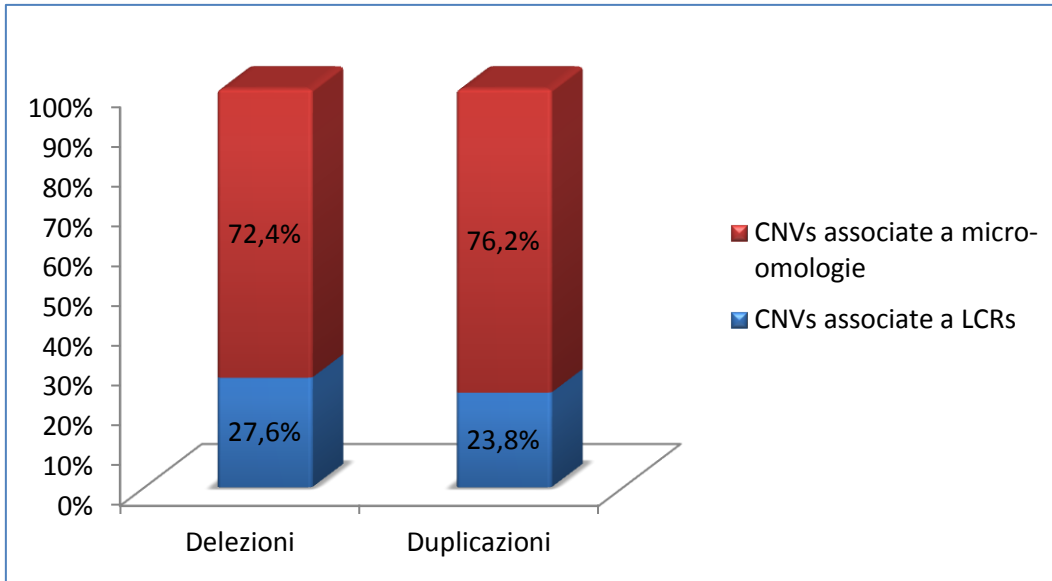


Figura 15: valore percentuale delle CNVs suddivise in base a tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni) e meccanismo di formazione.

	Totale	CNVs associate a LCRs	CNVs associate a micro-omologie
Delezioni	225 (52.2%)	62 (55.9%)	163 (50.9%)
Duplicazioni	206 (47.8%)	49 (44.1%)	157 (49.1%)

Tabella 17: CNVs suddivise in base a meccanismo di formazione e tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni); percentuali calcolate sul totale di colonna.

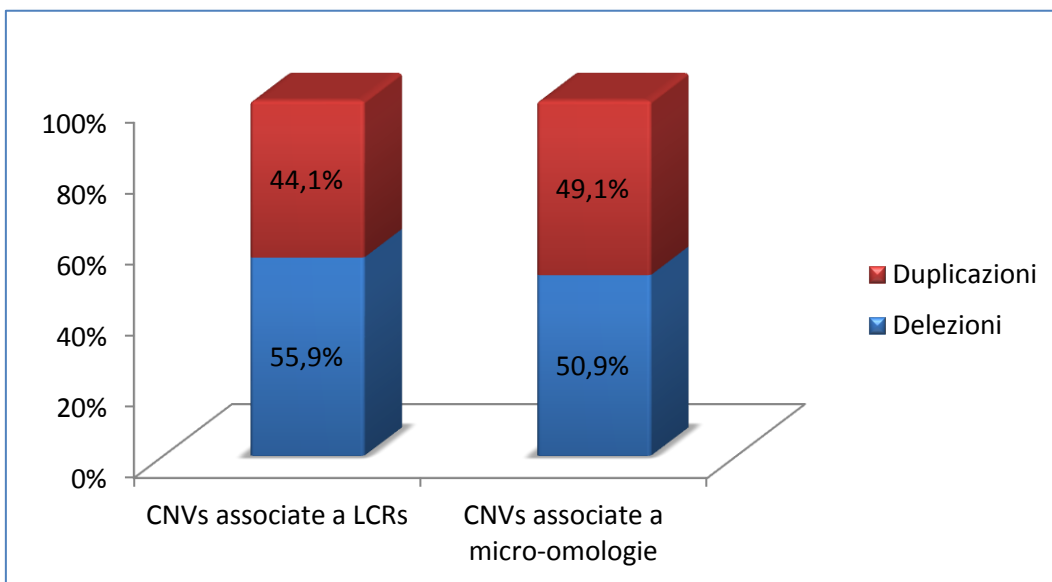


Figura 16: valore percentuale delle CNVs suddivise in base a meccanismo di formazione e tipo di anomalia (delezioni vs duplicazioni).

	CNVs associate a LCRs	CNVs associate a micro-omologie
<i>De novo</i>	34 (22.7%)	116 (77.3%)
Ereditate	38 (27.1%)	102 (72.9%)
Totale	72 (24.8%)	218 (75.2%)

Tabella 18: CNVs suddivise in base a meccanismo di formazione e pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditata); percentuali calcolate sul totale di riga.

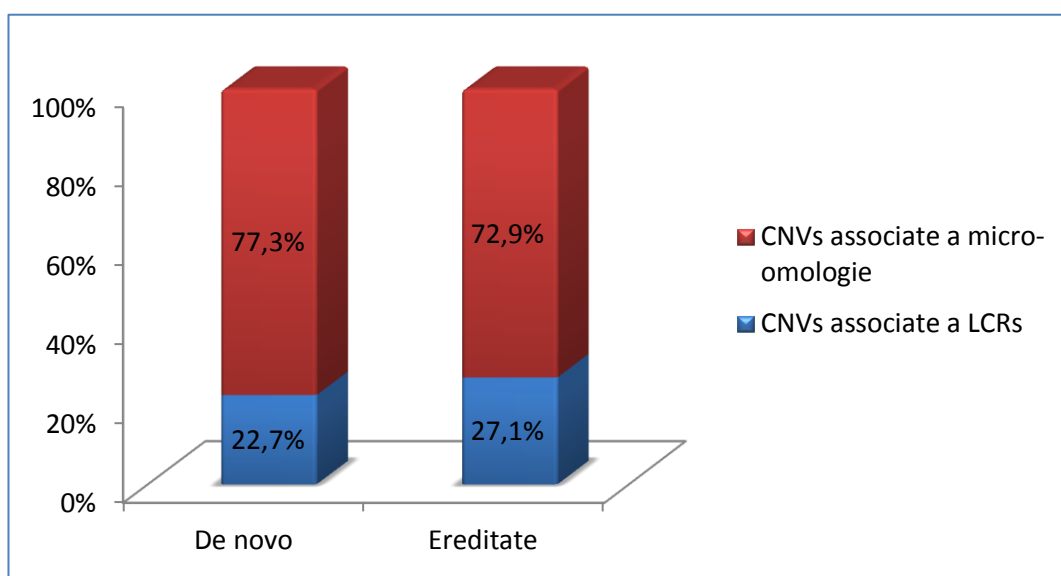


Figura 17: valore percentuale delle CNVs suddivise in base a pattern di ereditarietà (de novo vs ereditata) e meccanismo di formazione.

	Totale	CNVs associate a LCRs	CNVs associate a micro-omologie
<i>De novo</i>	150 (51.7%)	34 (47.2%)	116 (53.2%)
<i>Ereditate</i>	140 (48.3%)	38 (52.8%)	102 (46.8%)

Tabella 19: CNVs suddivise in base a meccanismo di formazione e pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditata); percentuali calcolate sul totale di colonna.

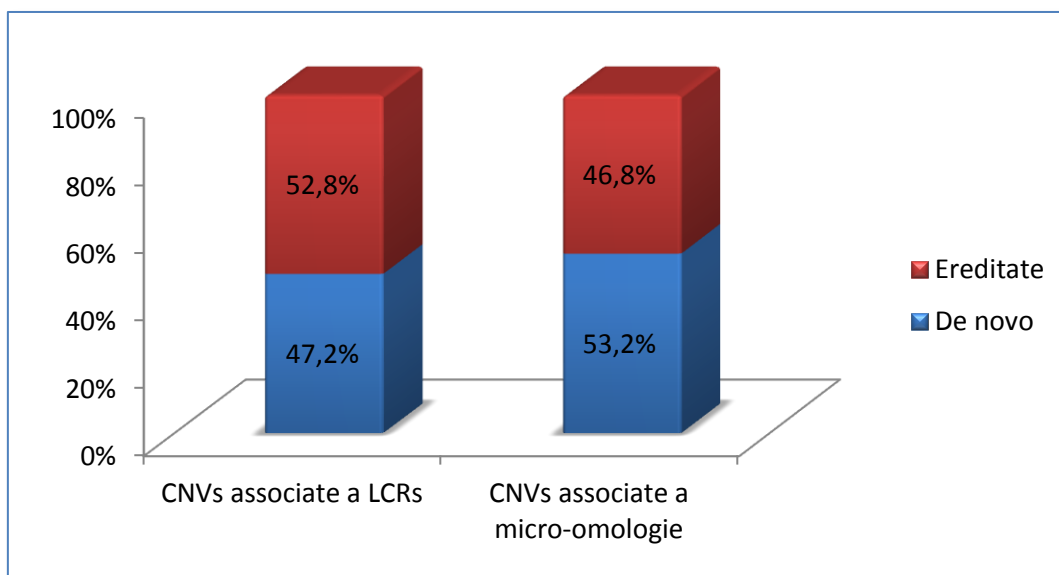


Figura 188: valore percentuale delle CNVs suddivise in base a meccanismo di formazione e pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditata).

5.1.4. Meccanismo di formazione e dimensioni delle CNVs

Le CNVs sono quindi state distribuite in 6 classi diverse di dimensioni come indicato in tabella 20.

Suddividendo per dimensioni le varie anomalie identificate, si osserva che il meccanismo di formazione delle CNVs più frequente è quello mediato da micro-omologie in tutte le varie classi di dimensione ad eccezione di quella di 1Mb-5Mb; in quest'ultima infatti il contributo dei meccanismi di formazione mediante LCR e mediante micro-omologie è sovrapponibile essendo, rispettivamente, 50.9% e 49.1% (Tabella 20, Figura 19).

Dimensioni	CNVs associate a LCRs	CNVs associate a micro-omologie
<200 Kb	11 (12.6%)	76 (87.4%)
200<x<300 Kb	10 (25%)	30 (75%)
300<x<500 Kb	16 (23.9%)	51 (76.1%)
500 Kb<x<1 Mb	12 (20.7%)	46 (79.3%)
1Mb<x<5Mb	57 (50.9%)	55 (49.1%)
>5Mb	5 (7.5%)	62 (92.5%)
Totale	111 (25.8%)	320 (74.2%)

Tabella 20: CNVs suddivise in base a dimensioni e meccanismo di formazione; percentuali calcolate sul totale di riga.

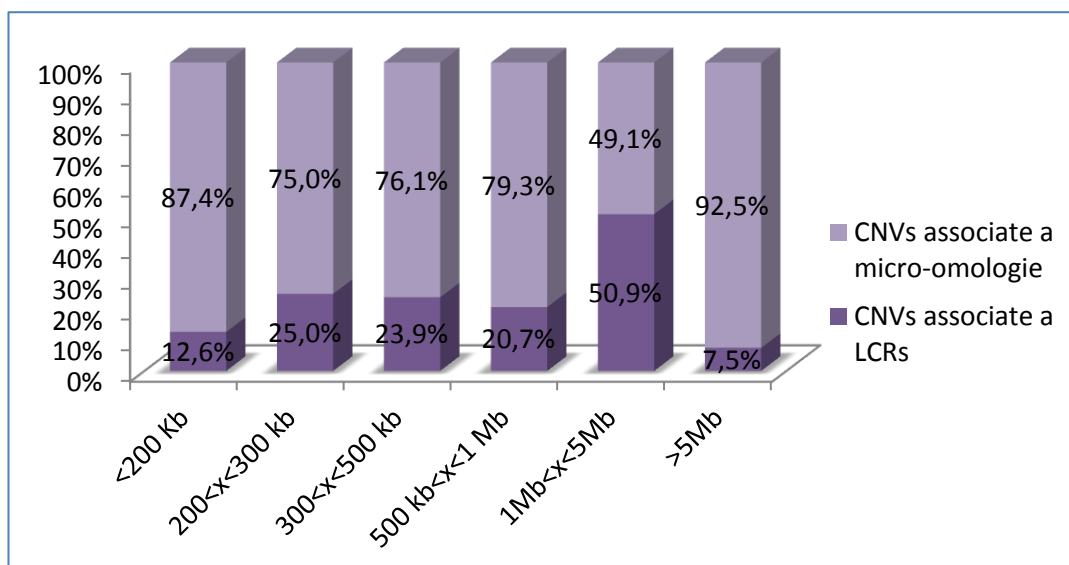


Figura 19: valore percentuale dei meccanismi di formazione, suddivisi in base alle dimensioni dei riarrangiamenti.

L'analisi ha inoltre evidenziato che nel gruppo minoritario di CNVs associate alla presenza di LCR ai *breakpoints*, la maggior parte ha dimensioni comprese tra 1Mb e 5Mb e rispetto al gruppo di anomalie in cui sono state osservate micro-omologie, tale percentuale è significativamente maggiore ($p < 0.001$). Al contrario, tra le anomalie in cui sono state osservate micro-omologie, le dimensioni dei riarrangiamenti si distribuiscono in modo abbastanza uniforme; va tuttavia osservato che in tale gruppo, le percentuali di CNVs $< 200\text{Kb}$ e $> 5\text{Mb}$ sono significativamente superiori rispetto alle rispettive percentuali osservate nel gruppo di riarrangiamenti associati alla presenza di LCRs, (rispettivamente, $p = 0.002$ e $p < 0.001$). Non vi sono invece differenze statisticamente significative per quanto riguarda le percentuali di anomalie di dimensioni comprese tra 200Kb e 1Mb confrontando sbilanciamenti associati alla presenza ai *breakpoints* di LCRs e micro-omologie (Tabella 21, Figura 20).

Dimensioni	Totale	CNVs associate a LCRs	CNVs associate a micro-omologie
<200 Kb	87 (20.2%)	11 (9.9%)	76 (23.8%)
200<x<300 Kb	40 (9.3%)	10 (9.0%)	30 (9.4%)
300<x<500 Kb	67 (15.5%)	16 (14.4%)	51 (15.9%)
500 Kb<x<1 Mb	58 (13.5%)	12 (10.8%)	46 (14.4%)
1Mb<x<5Mb	112 (26%)	57 (51.4%)	55 (17.2%)
>5Mb	67 (15.5%)	5 (4.5%)	62 (19.4%)

Tabella 21: CNVs suddivise in base a dimensioni e meccanismo di formazione; percentuali calcolate sul totale di colonna.

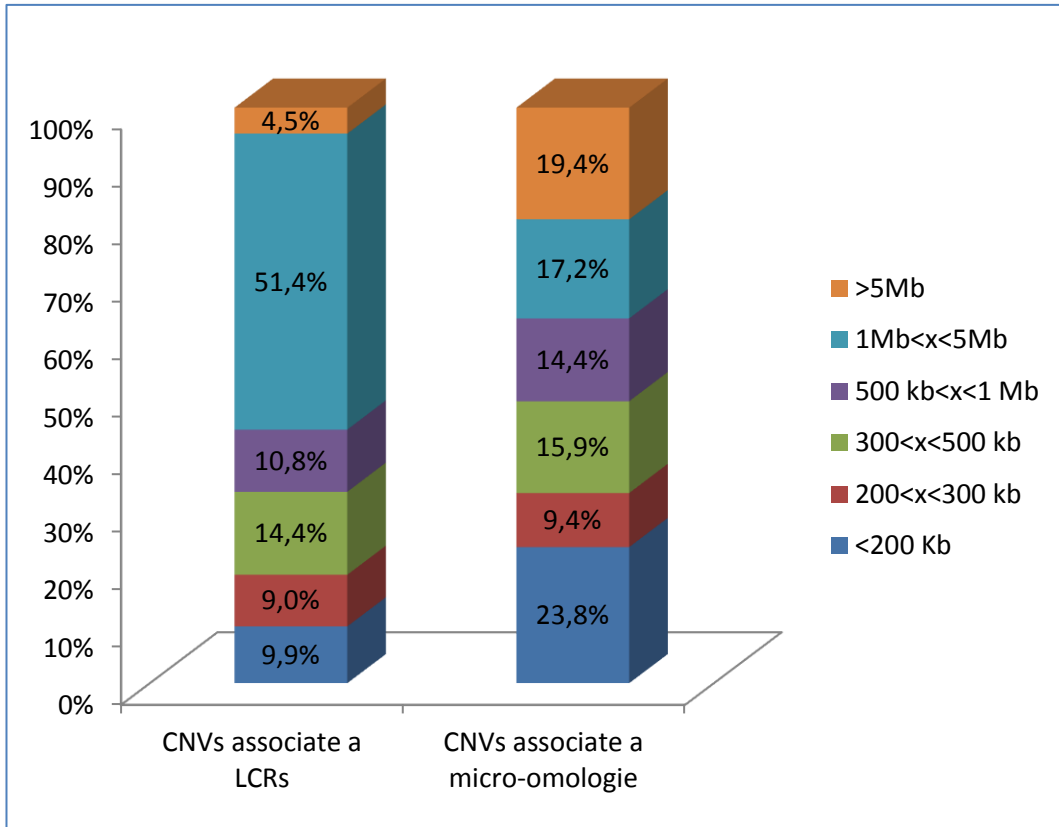


Figura 20: valore percentuale delle dimensioni dei riarrangiamenti suddivisi in base ai meccanismi di formazione.

5.1.5. CNVs e dimensioni cromosomiche

Le CNVs identificate sono state suddivise per cromosoma per valutare se esista una correlazione tra le dimensioni dei cromosomi e il numero di anomalie.

Da una prima analisi è emerso che nel nostro campione il cromosoma X è quello con il maggior numero di CNV; è stato inoltre osservato che alcuni cromosomi, quali 15, 16, 17, 18 e 22, di dimensioni comprese tra 103Mb (chr 15) e 51Mb (chr 22), presentano un numero di CNVs superiore o paragonabile a quello di cromosomi di dimensioni maggiori, quali 1, 3 e 4 che hanno dimensioni da 250Mb (chr1) a 191Mb (chr4) (figura 21).

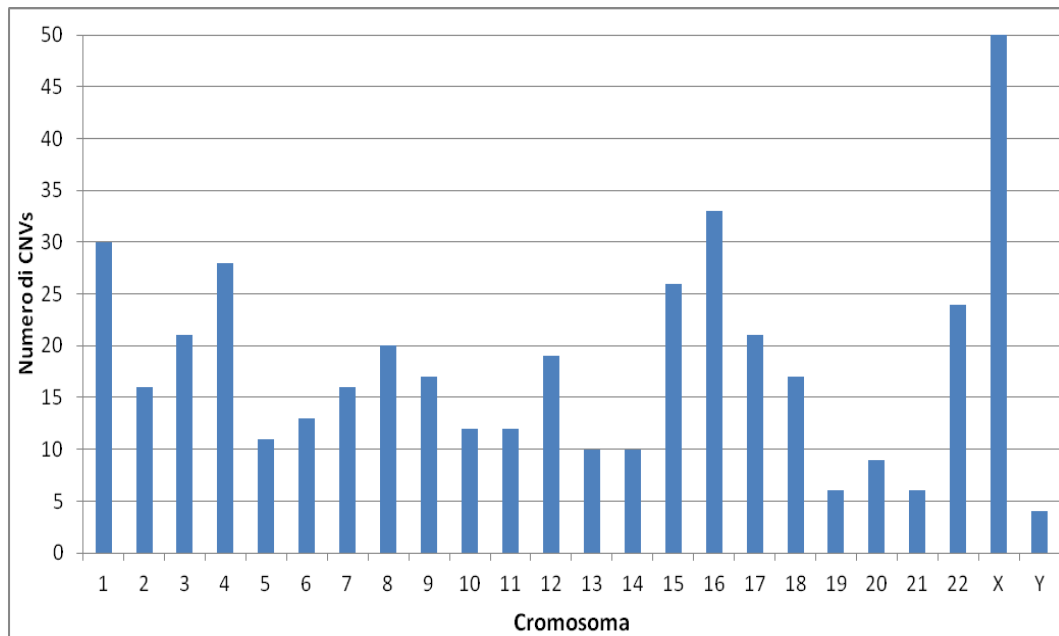


Figura 21: distribuzione delle CNVs nei diversi cromosomi.

È risultato, infatti, che non vi è una correlazione statisticamente significativa tra le dimensioni dei cromosomi ed il numero di anomalie riscontrate ($p > 0.05$, $r = 0.381$, Correlazione di Spearman) (figura 22).

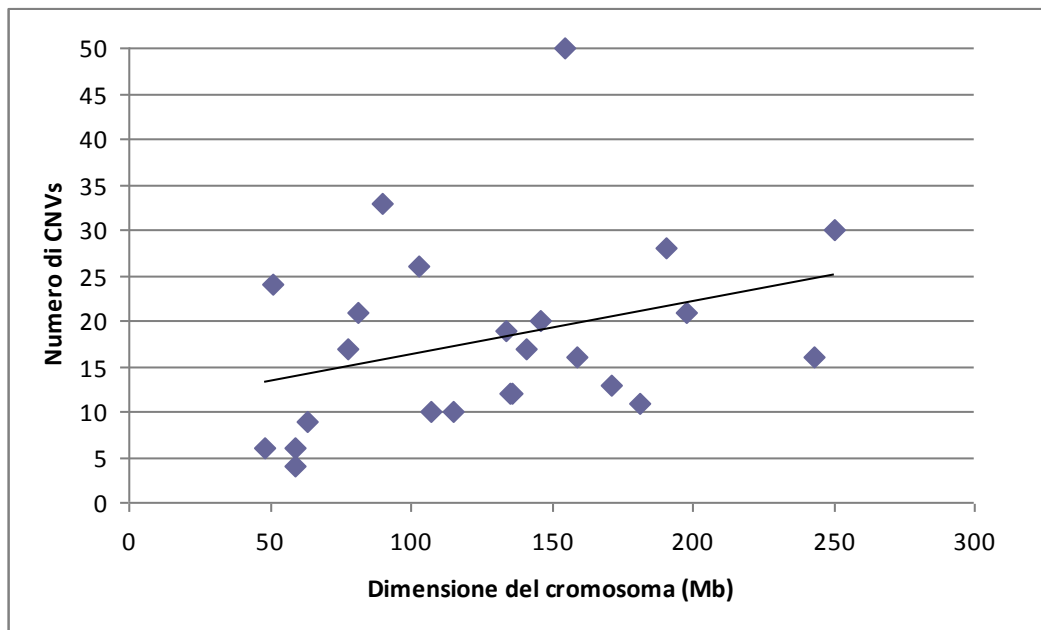


Figura 22: numero di CNVs identificate suddivise in base alle dimensioni dei cromosomi.

Si è poi andati a valutare la densità delle CNVs nei vari cromosomi, ovvero il rapporto tra il numero di anomalie e le dimensioni del cromosoma, e si è osservato che i cromosomi 15, 16, 17, 18, 22 e X hanno una densità di CNVs maggiore rispetto agli altri (Figura 23). Risultati simili sono stati ottenuti considerando solo le anomalie patologiche.

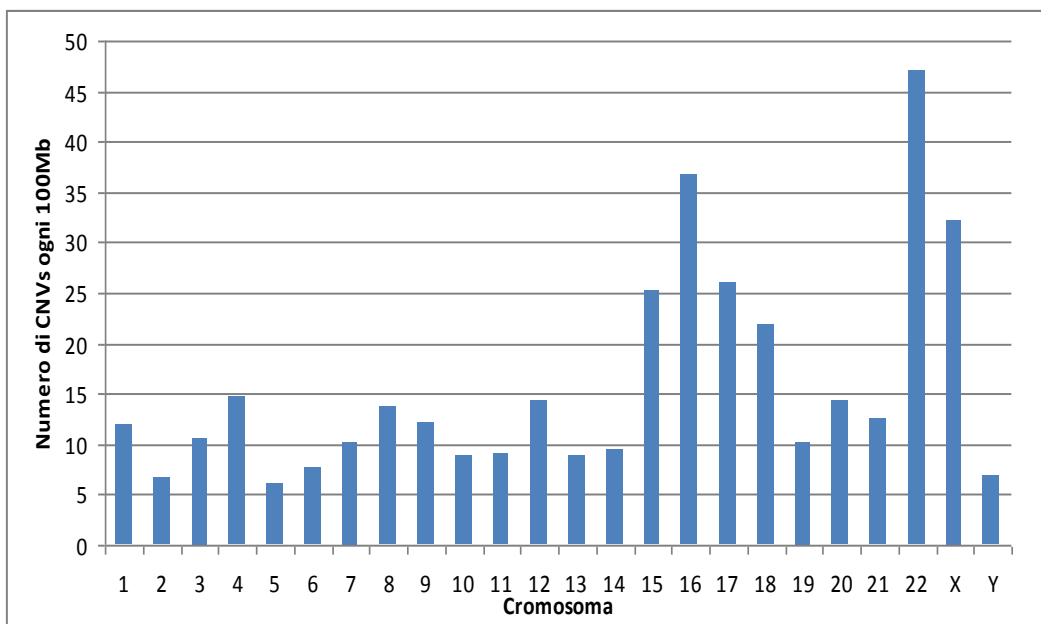


Figura 23: densità di CNVs nei diversi cromosomi, calcolata come numero di CNVs ogni 100Mb.

I test sono stati ripetuti escludendo le CNVs che presentano duplicazioni segmentali (LCRs) ai *breakpoints*, poiché tali sequenze non sono distribuite in maniera omogenea nel genoma umano ma sono maggiormente concentrate in alcuni cromosomi, tra cui 7, 9, 15, 16, 17, 19, 22 e Y, come riportato nel *Database of Genomic Variants* (DGV).

È stato osservato che esiste una correlazione statisticamente significativa tra le dimensioni dei cromosomi ed il numero di CNVs non associate alla presenza di LCRs ($p=0.002$, $r= 0.608$, Correlazione di Spearman) (Figure 24-25).

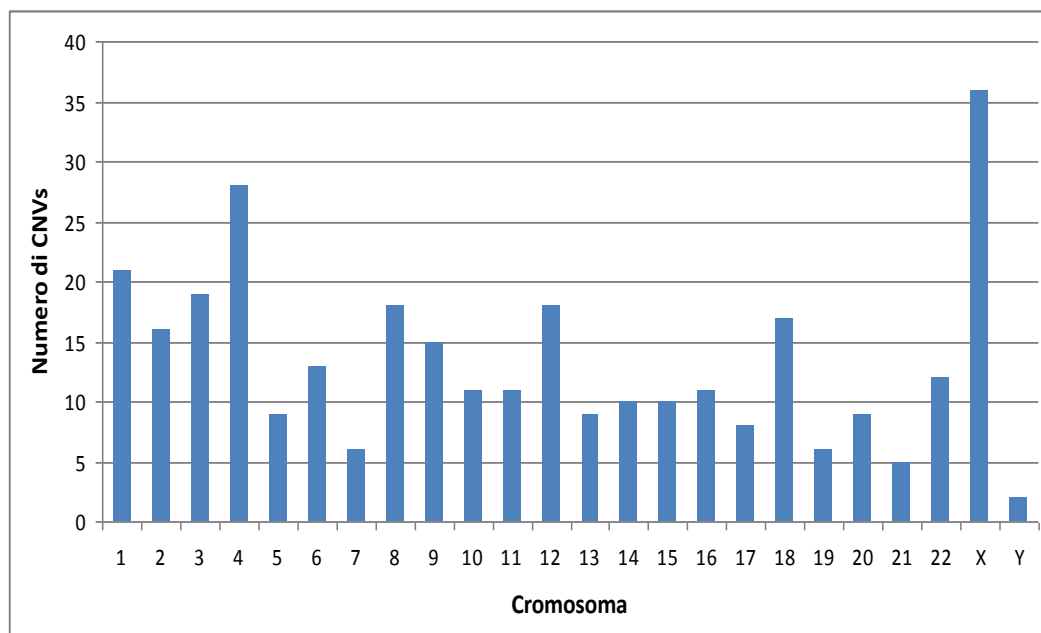


Figura 24: distribuzione delle CNVs, che non presentano LCRs ai breakpoints, nei diversi cromosomi.

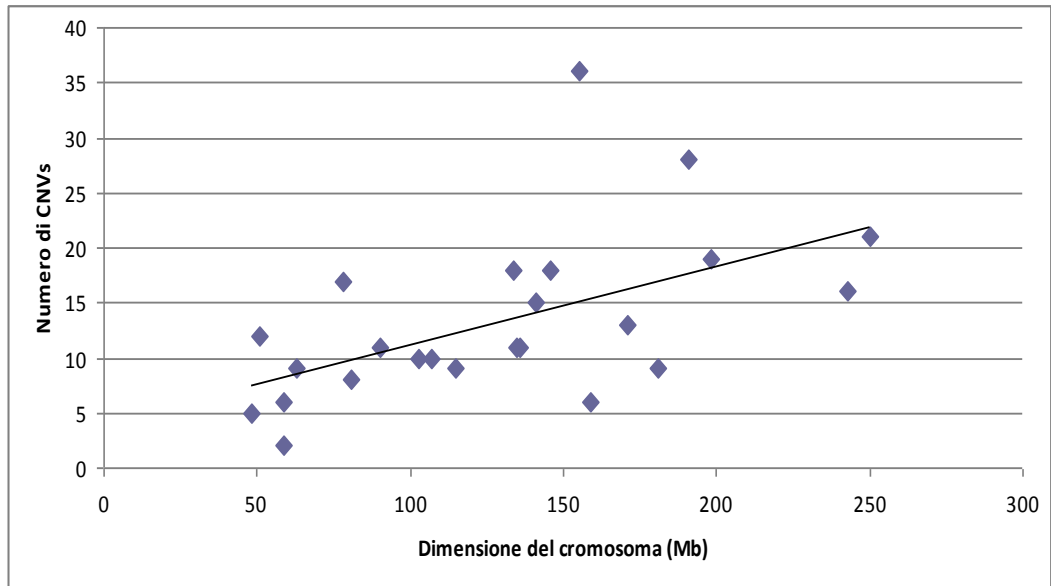


Figura 25: numero di CNVs che non presentano LCRs ai *breakpoints*, suddivise in base alle dimensioni dei cromosomi..

Valutando inoltre il numero di CNVs dovute a ricombinazione omologa non allelica tra LCRs nei vari cromosomi e la relativa densità, è stato osservato che tali CNVs si concentrano in pochi cromosomi, in particolare nei cromosomi 7, 15, 16, 17e 22 (Figure 26-27).

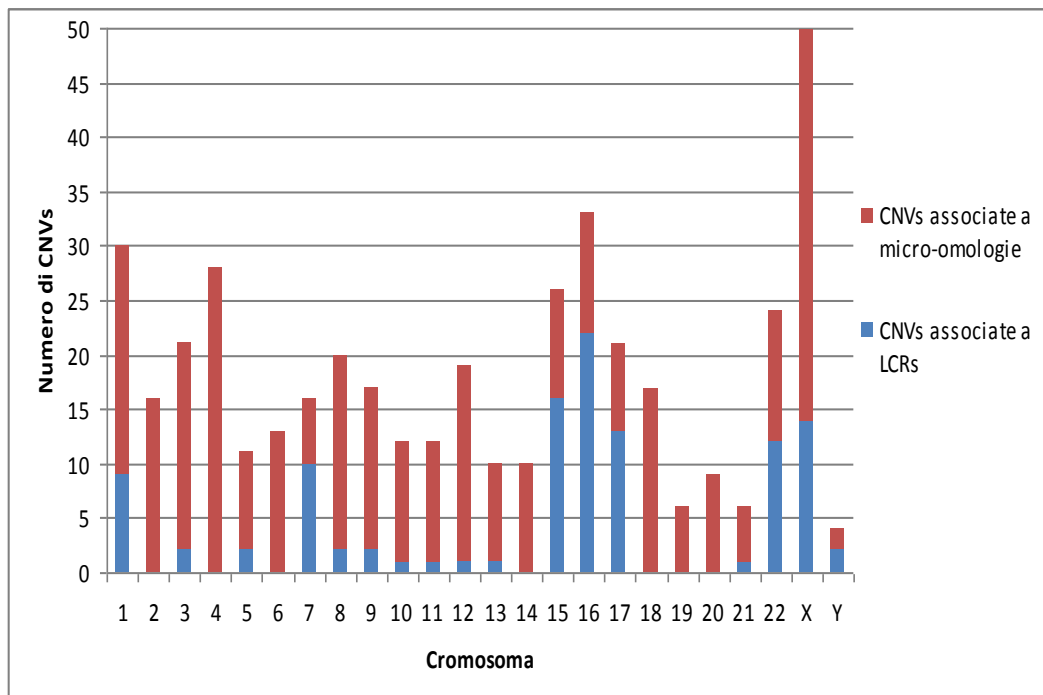


Figura 26: distribuzione delle CNVs nei diversi cromosomi suddivise in base alla presenza di LCRs o micro-omologie ai *breakpoints*.

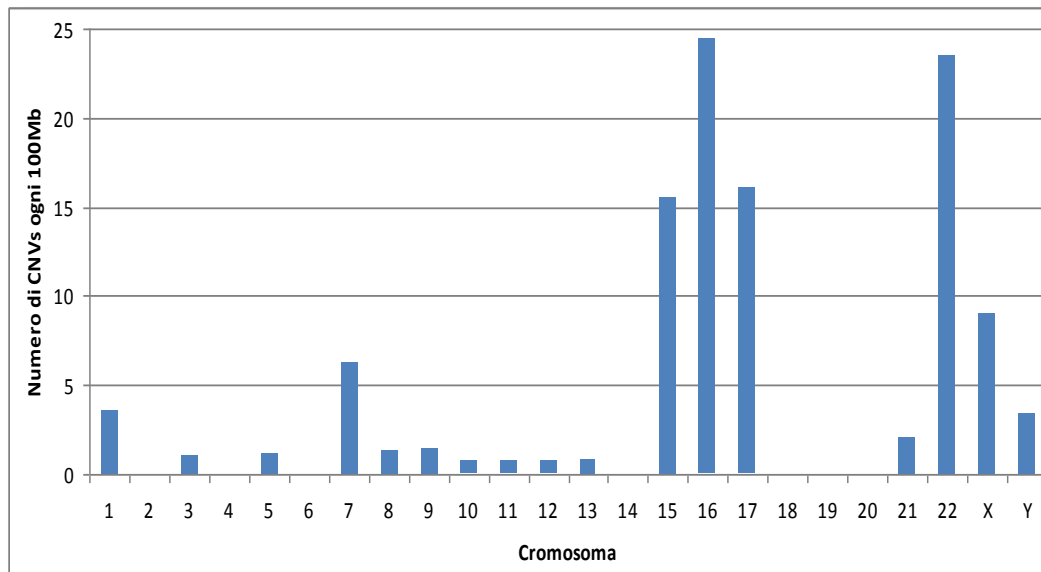


Figura 27: densità di CNVs, che presentano LCRs ai *breakpoints*, nei diversi cromosomi, espressa come numero di CNVs ogni 100Mb

5.2. CROMOTRIPSI

L'analisi mediante array-CGH ha identificato 2 casi che presentano riarrangiamenti strutturali particolarmente complessi per i quali si ipotizza sia avvenuto un evento di cromotripsia. Essi, infatti, sono localizzati a livello di una specifica regione cromosomica, sono caratterizzati dall'alternanza di un numero di copie variabile e non presentano duplicazioni segmentali a livello dei punti di rottura.

Caso 5378

L'array-CGH ha evidenziato a livello del cromosoma X, di un paziente di sesso maschile, in posizione Xq28 il seguente pattern di riarrangiamenti: normalità - delezione - duplicazione - normalità - delezione - duplicazione - normalità (figura 28). Tale complessa variazione strutturale è stata ereditata dalla madre, la quale risulta fenotipicamente normale.

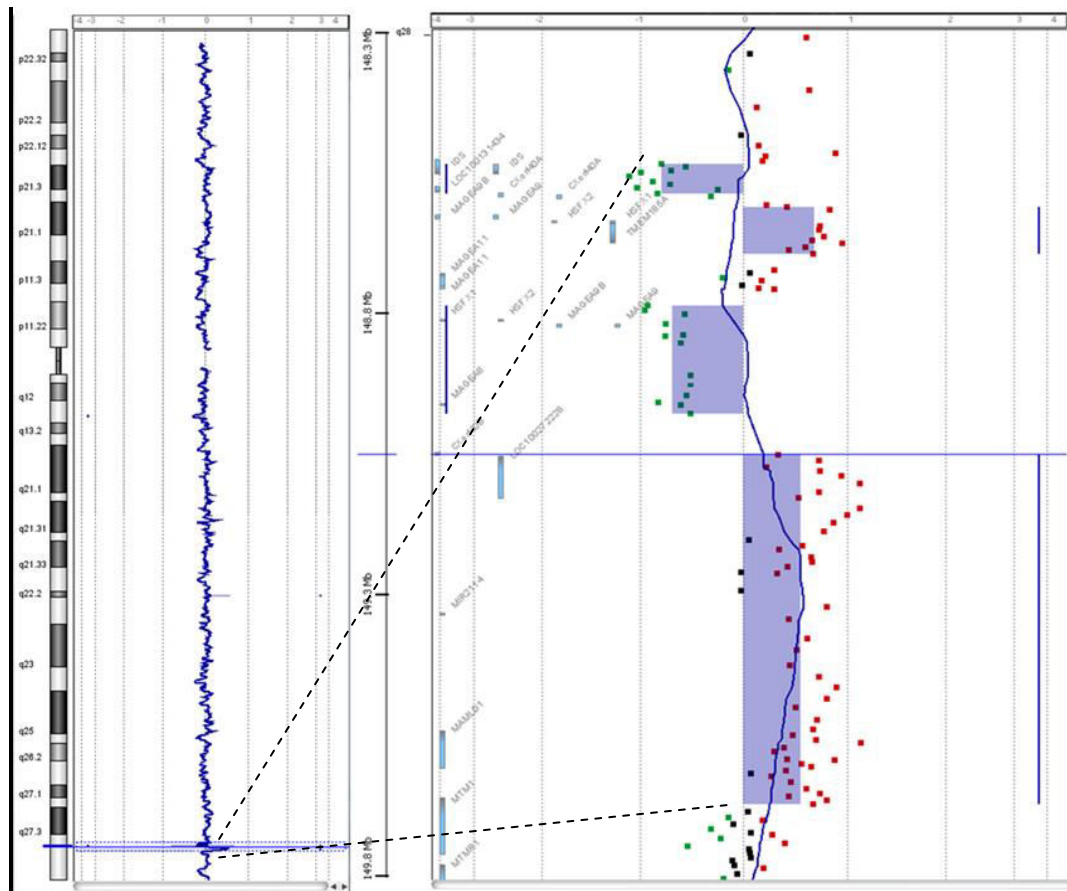


Figura 28: pattern di riarrangiamenti identificati mediante array-CGH a livello del chrX

L'analisi dei punti di rottura tramite i software *Pipmaker* e *zPicture* ha rivelato un'omologia di sequenza media tra il 70% e l'80% (tabella 22).

Hg	Risultato	Dimensioni	delezione/ duplicazione	Omologia di sequenza
[Hg18]	Xq28(148376691-148431346)x0	54,7Kb	delezione	70%
[Hg18]	Xq28(148456474-148542775)x2	86,3Kb	duplicazione	75%
[Hg18]	Xq28(148638257-148789779)x0	151,5Kb	delezione	80%
[Hg18]	Xq28(148856479-149501115)x2	644,6 Kb	duplicazione	75%

Tabella 22: CNVs identificate mediante array-CGH e percentuale di omologia rilevata

L'ipotesi è che la cromotripsi mediata da NHEJ o dal modello FoSTeS sia alla base del riarrangiamento complesso osservato, caratterizzato dall'alternanza di delezioni, duplicazioni e regioni normali. Nel caso di NHEJ per spiegare soprattutto la presenza dei segmenti duplicati si presuppone il coinvolgimento del cromatidio fratello e la formazione di simultanee rotture a doppio filamento. Per il modello FoSTeS, invece, si presume l'invasione di forcelle replicative posizionate sia a monte che a valle.

Caso 10605

L'array-CGH ha evidenziato a livello del cromosoma 12 una delezione in posizione 12q15 (69,392,739 bp - 69,895,694 bp) e il seguente pattern di riarrangiamenti in 12q21.31: normalità - delezione - normalità - delezione - normalità - delezione - normalità - delezione - normalità (figura 29). Tale complessa variazione strutturale è stato osservato essere insorta *de novo*.

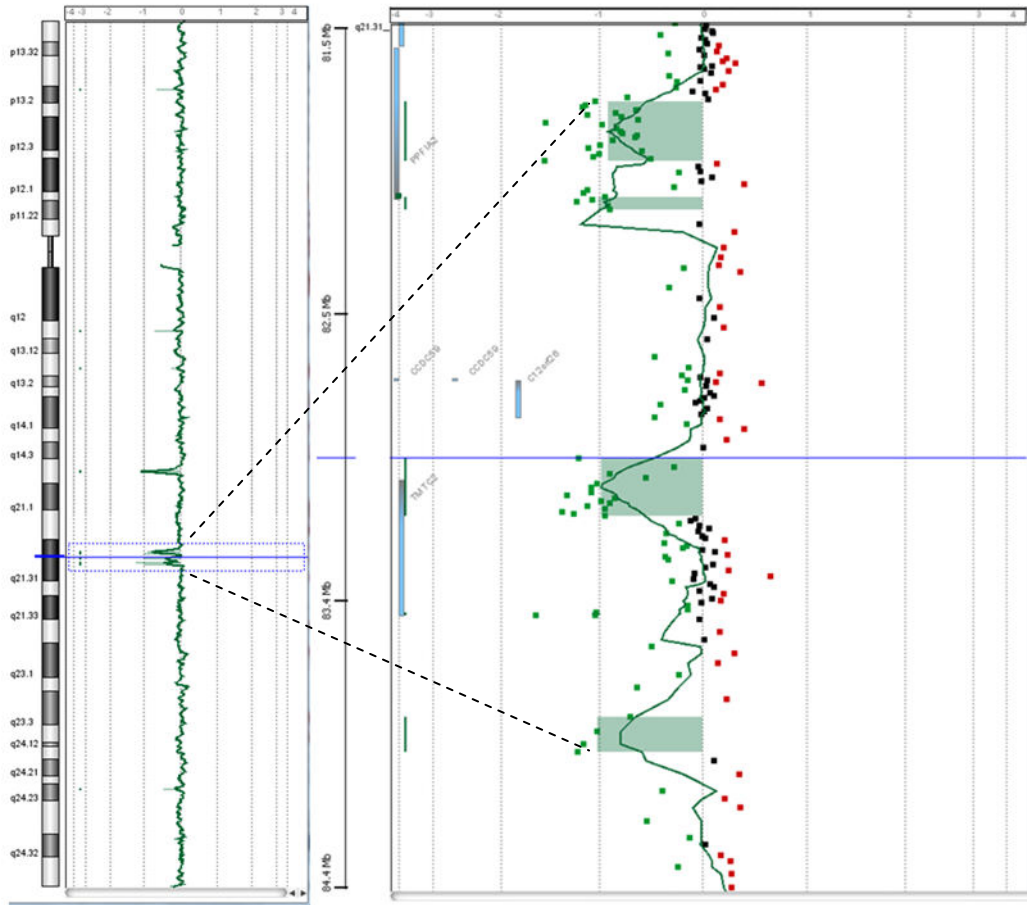


Figura 28: pattern di riarrangiamenti identificati mediante array-CGH in posizione 12q21.31

L'analisi dei punti di rottura tramite i software *Pipmaker* e *zPicture* ha rivelato un'omologia di sequenza media tra il 70% e l'80% (tabella 23).

Hg	Risultato	Dimensioni	delezione/ duplicazione	Omologia di sequenza
[Hg19]	12q15(69,392,739-69,895,694)x1	503 Kb	delezione	75%
[Hg19]	12q21.31(81,833,360-82,027,070)x1	193,7 Kb	delezione	80%
[Hg19]	12q21.31(82,123,931-82,187,940)x1	64 Kb	delezione	70%
[Hg19]	12q21.31(83,008,549-83,198,499)x1	190 Kb	delezione	70%
[Hg19]	12q21.31(83,863,155-83,977,917)x1	115 Kb	delezione	75%

Tabella 23: CNVs identificate mediante array-CGH e percentuale di omologia rilevata

L'ipotesi è che la cromotripsi mediata da NHEJ sia alla base del riarrangiamento complesso osservato, il quale è caratterizzato da un'alternanza di regioni delete e normali.

In base al meccanismo molecolare, infatti, i frammenti di DNA dovuti a DSB vengono riassemblati a volte in maniera aberrante, causando la perdita di alcuni di essi.

5.3. MOSAICISMI

Dei 347 casi risultati positivi all'analisi, 4 hanno mostrato riarrangiamenti a mosaico, che coinvolgono dal 10% al 60% delle cellule (tabella 24).

Caso	hg	Risultato	Dimensioni	% cellule con anomalia	Omologia di sequenza
4901	hg18	2q24.1q24.3(154,592,157-166,073,025)x2~3	10.8Mb	50%	75%
10308	hg19	17p13.3(223,182-2,537,850)x2~3	2,3Mb	50%	80%
11107	hg19	8p21.2q11.21(25,006,544-51,152,922)x2~3	26,15Mb	60%	75%
10951	hg19	10q22.1q26.3(71,332,953-135,404,523)x2~3;	64,1Mb;	10-20%	70%

Tabella 24: casi in cui è stato individuato mosaicismo

La condizione di mosaicismo viene rilevata mediante array-CGH quando il rapporto dei segnali di fluorescenza (Cy5 paziente / Cy3 riferimento) è compreso tra quello che indica una condizione normale e quello atteso in caso di delezione o duplicazione costituzionale. Tuttavia quando tale valore si avvicina molto a quello di normalità rende l'identificazione più difficile.

Il rapporto dei segnali (Cy5 paziente / Cy3 riferimento), ovvero il log ratio, viene ottenuto mediante la formula

$$X = [\log_2 (\text{numero di copie del paziente} / \text{numero di copie del riferimento})]$$

e in condizioni di normalità è bilanciato e vale 0:

$$[\log_2 (2/2)] = 0$$

In presenza di una delezione che coinvolge il 100% delle cellule, il valore atteso è -1 ($[\log_2 (1/2)] = -1$), mentre nel caso di una duplicazione è +0.58 ($[\log_2 (3/2)] = 0.58$).

Nel caso di soggetti maschi, tuttavia, per i cromosomi sessuali vi è un unico allele che contribuisce al segnale di fluorescenza, perciò il valore atteso, in presenza di delezione o duplicazione, cambia.

Per le delezioni tende a $-\infty$ [$\log_2 (0/1) = -\infty$], mentre per le duplicazioni è pari a $+1$ [$\log_2 (2/1) = +1$].

Quando è presente una condizione di mosaicismo i valori che si ottengono dall'analisi si discostano da quelli attesi poiché l'anomalia coinvolge meno del 100% delle cellule.

Per stimare la percentuale di cellule che presentano il riarrangiamento sono state utilizzate le seguenti formule:

- per le duplicazioni

$$A+a+Xa = \text{numero di copie del paziente}$$

Dove "A" è l'allele normale, "a" quello duplicato e "Xa" la percentuale di cellule con la duplicazione.

- per le delezioni

$$B+b+Xb = \text{numero di copie del paziente}$$

Dove "B" è l'allele normale, "b" quello deleto e "Xb" la percentuale di cellule che presenta l'allele "b" normale. Perciò la percentuale di cellule con la delezione è pari a $1-Xb$.

In condizioni normali un individuo eterozigote ha due alleli, ciascuno dei quali contribuisce con un valore pari a 1. Ugualmente per i cromosomi sessuali nei soggetti maschili l'unico allele presente ha un valore pari a 1.

Il numero di copie del paziente si ricava, invece, mediante la formula inversa del log ratio:

$$\text{numero di copie del paziente} = [2^{(\log \text{ ratio})} \times \text{numero di copie del riferimento}]$$

Caso 10308

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 2.3Mb a livello di un cromosoma 17, in posizione 17p13.3 (223,182 bp -2,537,850 bp). Il log ratio medio pari a 0.35 è indice della presenza di mosaicismi che coinvolge circa il 50% delle cellule.

Tale valore è stato calcolato mediante la formula: $X_a = [2^{(0.35)} \times 2] - (1+1)$, dove X_a è la percentuale di cellule con la duplicazione.

L'analisi dei punti di rottura tramite UCSC Genome Browser e DGV (Database delle Varianti Genomiche) non ha evidenziato la presenza di duplicazioni segmentali o sequenze intersperse che potrebbero avere mediato il riarrangiamento. I software *Pipmaker* e *zPicture*, al contrario, hanno rivelato un'omologia di sequenza pari all'80%.

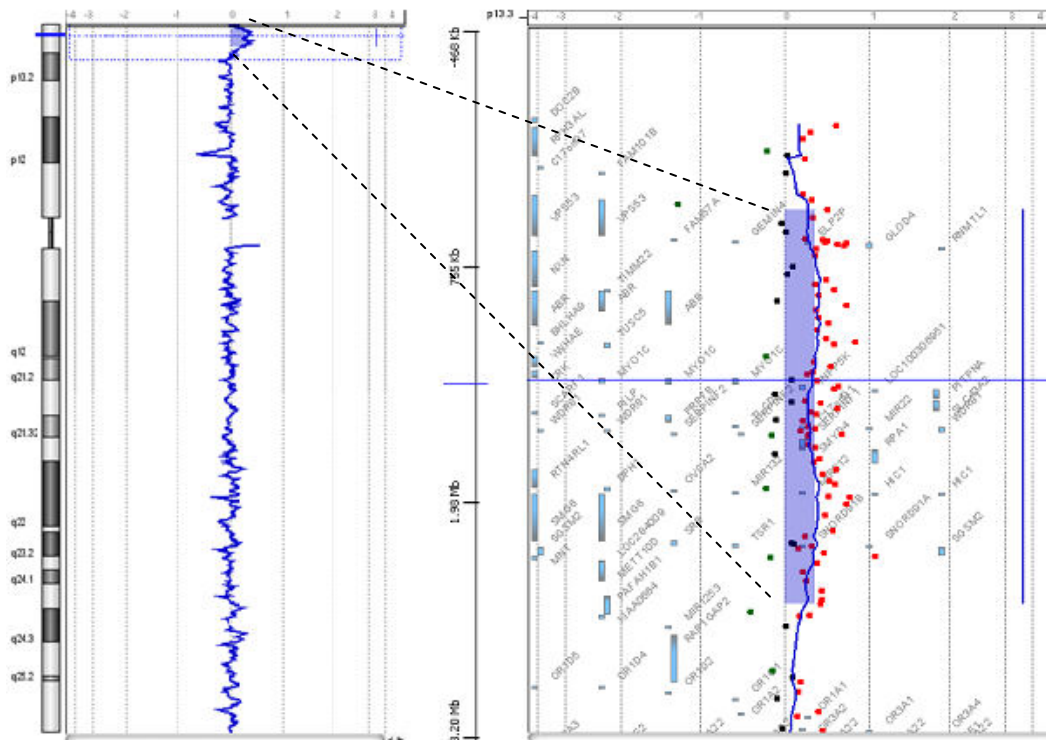


Figura 29: grafico array-CGH chr17

Caso 11107

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 26.15Mb a livello di un cromosoma 8, in posizione 8p21.2q11.21 (25,006,544 bp -51,152,922 bp). Il log ratio medio pari a 0.37 indica la presenza di mosaicismi che coinvolge circa il 60% delle cellule.

Tale valore è stato calcolato mediante la formula: $X_a = [2^{(0.37)} \times 2] - (1+1)$, dove X_a è la percentuale di cellule con la duplicazione.

Le dimensioni dell'anomalia suggeriscono che il meccanismo alla base della formazione dello sbilanciamento sia diverso dalla ricombinazione omologa non allelica. Inoltre l'analisi dei punti di rottura tramite UCSC Genome Browser e DGV (Database delle Varianti Genomiche) non ha evidenziato la presenza di duplicazioni segmentali o sequenze intersperse che potrebbero avere mediato il riarrangiamento. Al contrario, i software *Pipmaker* e *zPicture* hanno rivelato un'omologia di sequenza pari al 75%.

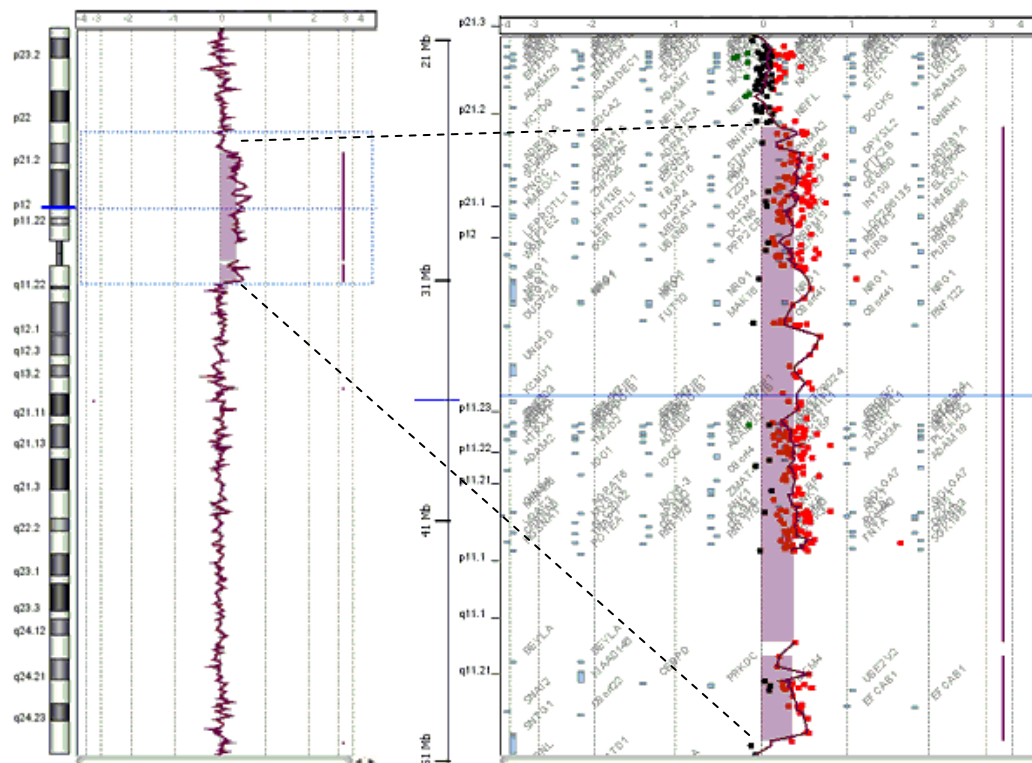


Figura 30: grafico array-CGH chr8

Caso 10951

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 64.1Mb a livello di un cromosoma 10, in posizione 10q22.1q26.3 (71,332,953 bp -135,404,523 bp) che coinvolge il 10-20% delle cellule (log ratio =0.09).

Per stimare la percentuale di cellule che presentano la duplicazione è stata utilizzata la formula: $X_a = [2^{(0.09)} \times 2] - (1+1)$, dove X_a è la percentuale di cellule con la duplicazione.

Tale risultato è stato poi confermato mediante l'analisi citogenetica.

Le dimensioni dell'anomalia suggeriscono che il meccanismo alla base della formazione dello sbilanciamento sia diverso dalla ricombinazione omologa non allelica. Inoltre l'analisi dei punti di rottura tramite UCSC Genome Browser e DGV (Database delle Varianti Genomiche) non ha evidenziato la presenza di duplicazioni segmentali o sequenze intersperse che potrebbero avere mediato il riarrangiamento. Al contrario, i software *Pipmaker* e *zPicture* hanno rivelato un'omologia di sequenza pari all'70%.

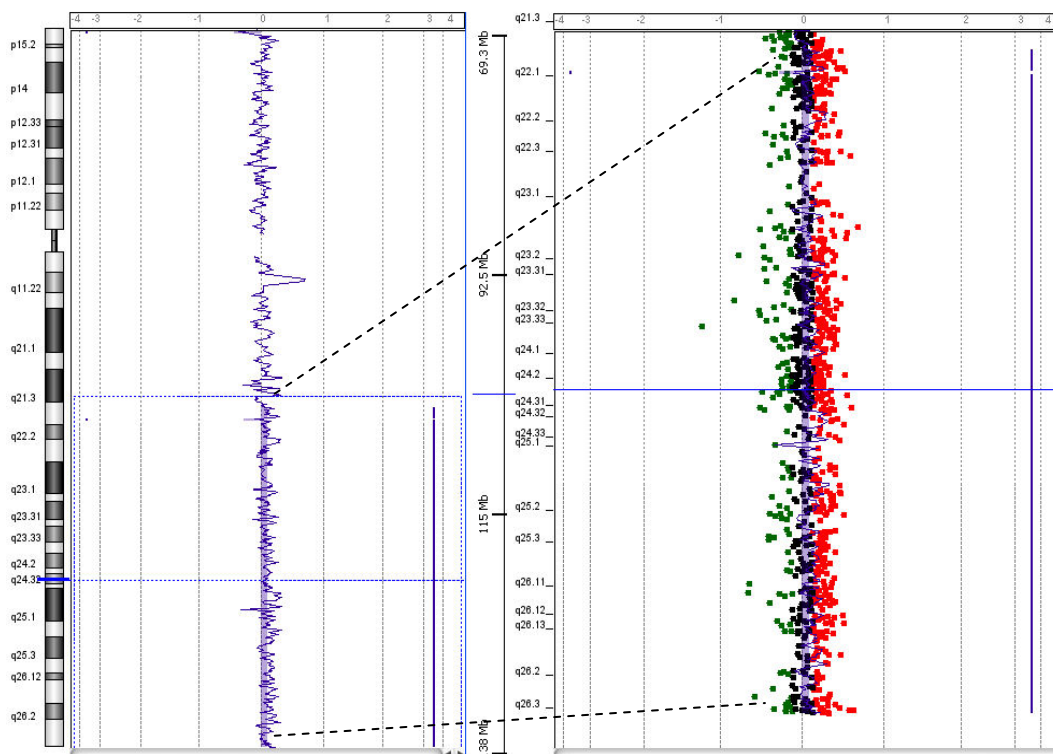


Figura 31: grafico array-CGH chr10

5.4. CAMPIONI FETALI

Durante l'ultimo anno sono stati messi a punto i protocolli per l'applicazione dell'array-CGH in campioni fetali di villi coriali e liquido amniotico. Questo ci ha permesso di applicare la tecnica in 12 casi, 10 dei quali presentavano anomalie ecografiche e/o sbilanciamenti cromosomici non completamente caratterizzati mediante cariotipo, mentre in 2 casi è stata eseguita una ricerca diretta di sbilanciamenti già identificati in altri membri della famiglia.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti (tabella 25).

	Caso	Materiale di partenza	hg	Risultato	Indicazione all'esame
1	10978	DNA da Villi Coriali	hg19	w.t.	Cariotipo: 46,XY, t(6;10)(q15;q22)
2	12106	Villi Coriali	hg19	w.t.	Ricerca diretta di delezione in 16p13,11 presente in una figlia della coppia e di una duplicazione di origine materna in 21q21.1q212
3	11287	Villi Coriali	hg19	w.t.	feto alla 20° settimana+2gg con NT aumentata. Cariotipo: 46, XX
4	11530	DNA da Villi Coriali	hg19	w.t.	labiopalatoschisi
5	11606	DNA da Villi Coriali	hg19	9p24.3p13.1(214,367-39,287,118)x4 tetrasomia 9p	Marcatore sovranumerario
6	11883	DNA da Villi Coriali	hg19	7p22.2p22.1(3,861,164-4,509,248)x3 648,1 Kb	Ricerca diretta di una duplicazione di origine paterna in 7p22.2p22.1
7	Feto dx 11978	Coltura cellulare di Amniociti	hg19	w.t.	A 13 settimane NT di 4,3 mm. Nelle successive ecografie individuato anche sospetto DIV

	Feto sx 11979	Coltura cellulare di Amniociti	hg19	w.t.	non segni di anomalie
8	12061	Coltura cellulare di Amniociti	hg19	w.t.	gravidanza gemellare biamniotica bicoriale con 1 feto maschio 46,XY/1 + inv9(p24q32)pat. Eseguita FISH 9q34 risultata negativa
9	Feto A 12155	Villi Coriali	hg19	w.t.	gravidanza gemellare bicoriale biamniotica con riscontro in feto A di sopetto canale AV comune+idronefrosi rene dx
	Feto B 12156	Villi Coriali	hg19	w.t.	gravidanza gemellare bicoriale biamniotica
10	12198	Liquido Amniotico	hg19	w.t.	IVG (labiopalatoschisi + agenesia renale monolaterale)
11	12330	Coltura cellulare di Amniociti	hg19	w.t.	IVG (aborto per spina bifida lombosacrale)
12	12396	Villi Coriali	hg19	w.t.	igroma

Tabella 25: campioni fetali di villi coriali o liquido amniotico analizzati

Caso 11606

L'array-CGH eseguito su DNA da villi coriali ha permesso di caratterizzare un marcatore cromosomico metacentrico soprannumerario identificato mediante l'analisi del cariotipo. L'analisi ha evidenziato la presenza di tetrasomia dell'intero braccio corto di un cromosoma 9 (log ratio = +1), permettendo di caratterizzare il cromosoma soprannumerario come un isocromosoma 9p.

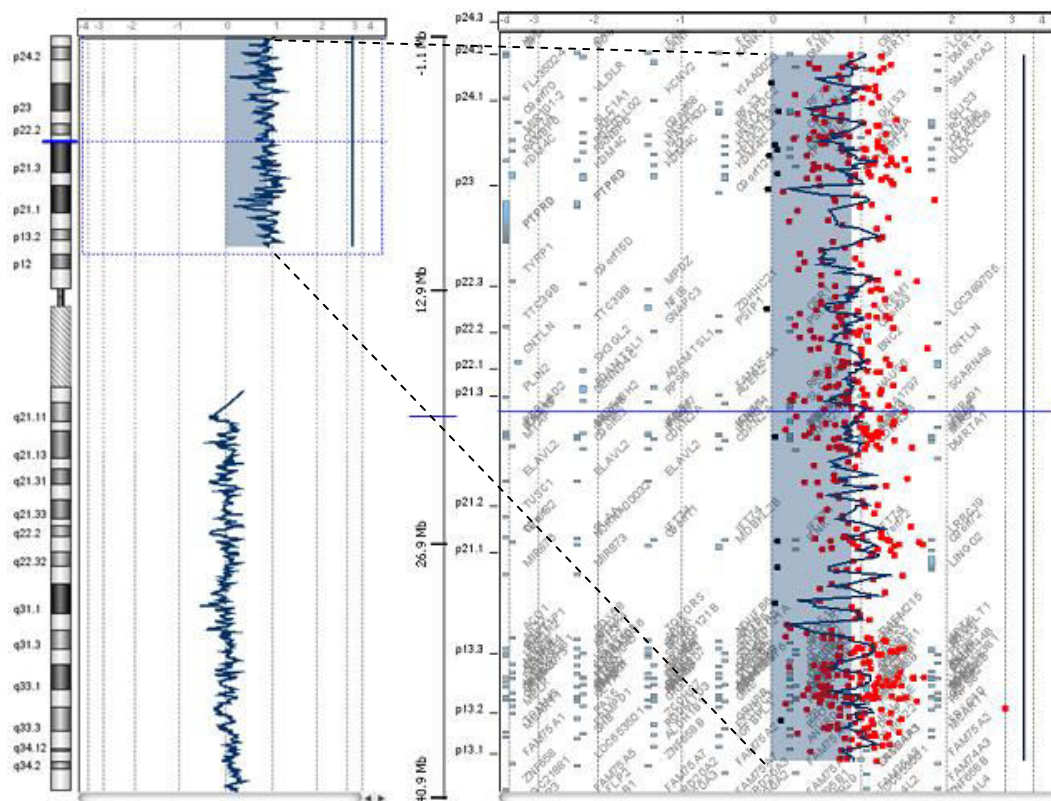


Figura 32: grafico array-CGH chr9

6. DISCUSSIONE

L'impiego di *microarray* cromosomici per lo studio di individui con ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dimorfismi ha modificato profondamente le strategie di approccio diagnostico verso questo gruppo di pazienti. Fino a pochi anni fa l'analisi del cariotipo e gli studi mediante *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) erano considerati il *gold standard* per l'identificazione di anomalie cromosomiche associate a tale quadro clinico. Tuttavia negli ultimi 10 anni è emerso sempre più chiaramente che l'analisi citogenetica convenzionale è del tutto insufficiente a rilevare riarrangiamenti inferiori alle 5-10 Mb che possono esser responsabili di ritardo mentale e anomalie fenotipiche. Ciò è dimostrato dal fatto che, in pazienti affetti da tali patologie, l'array-CGH ha aumentato del 15-20% la *detection rate* di sbilanciamenti criptici (delezioni o duplicazioni), rispetto a quella del cariotipo che è valutata attorno al 3%, escludendo i casi di sindromi cromosomiche note come la Sindrome di Down (Chong et al. 2014, Riggs et al. 2014; Miller et al. 2010).

Perciò la maggiore sensibilità dell'array-CGH, rispetto a quella del cariotipo e della FISH, nell'identificare sbilanciamenti cromosomici a livello dell'intero genoma in assenza di un sospetto diagnostico specifico, ha portato alla proposta, nel 2010, da parte dell'*International Standard Cytogenomic Array* (ISCA) *Consortium*, dell'utilizzo di tale tecnica come esame di primo livello in individui con disabilità intellettive e anomalie congenite (Miller et al. 2010).

Gli studi effettuati con tecnologia *microarray* hanno stimato che più del 12% del genoma umano sia soggetto a particolari variazioni strutturali, chiamate *copy number variations* (CNVs), ma sulla base delle attuali conoscenze scientifiche non risulta sempre possibile stabilirne il significato e, quindi, definirne una possibile associazione con il quadro clinico del paziente. Questa difficoltà nell'interpretazione della patogenicità delle CNVs è ancora più rilevante in diagnosi prenatale poiché si traduce in una incertezza in termini prognostici sulla salute del feto. Per questo, in caso di test array-CGH positivo, è consigliato estendere l'analisi ai genitori, in quanto le CNVs *de novo* hanno una maggiore

probabilità di essere patogenetiche, nonostante non si possa escludere che anche quelle ereditate abbiano un ruolo nel causare fenotipi complessi (Kaminsky et al. 2011).

Oltre alla difficoltà interpretativa dei risultati, i *microarray* hanno alcuni limiti tecnici, come il rilevamento di anomalie bilanciate e mosaicismi a basso livello che possono, invece, essere identificati mediante tecniche di citogenetica convenzionale.

Dall'introduzione degli array *genome wide*, inoltre, è emerso sempre più chiaramente che esistono regioni cromosomiche in cui sono particolarmente frequenti ricombinazioni aberranti, che determinano la formazione di CNVs. In particolare è stato osservato che la presenza di alcuni segmenti, quali LCRs, SINE, LINE, può causare un elevato grado di instabilità genomica (Gu et al. 2008). L'analisi dei *breakpoint* delle CNVs potrebbe, quindi, aiutare a comprendere il loro meccanismo di formazione.

In questo progetto sono stati valutati, mediante array-CGH, 1051 pazienti che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dimorfismi.

L'obiettivo principale dello studio è stato quello di verificare la presenza di riarrangiamenti cromosomici criptici, in modo da dimostrare l'utilità dell'impiego di *microarray* genomici per la caratterizzazione delle cause molecolari alla base del fenotipo clinico degli individui.

Sono stati poi ipotizzati i meccanismi di formazione delle anomalie verificando, mediante l'analisi dei *breakpoints*, la presenza di regioni di omologia che possano aver predisposto al riarrangiamento. Quindi è stato valutato se il meccanismo di formazione e il significato clinico delle CNVs identificate possano essere correlati al pattern di ereditarietà (*de novo* vs ereditate), al tipo (delezione/duplicazione) o alle dimensioni dello sbilanciamento.

È stato in seguito valutato se il numero di anomalie rilevate e le dimensioni di ciascun cromosoma possano essere significativamente correlati.

L'applicazione dell'array-CGH in un elevato numero di pazienti ha permesso, inoltre, di stimarne la sensibilità nell'identificazione di mosaicismi, che in letteratura sono descritti in meno dell'1% degli individui con disabilità

intellettive (Conlin et al. 2010). Infine per valutarne il possibile utilizzo in diagnosi prenatale sono stati analizzati alcuni campioni fetali di villi coriali e liquido amniotico.

I risultati ottenuti dall'applicazione dell'array-CGH, ad una risoluzione media di circa 100Kb, hanno evidenziato che il 33% dei pazienti (347/1051) con fenotipo patologico è portatore di almeno uno sbilanciamento cromosomico.

Sono state identificate 431 CNVs, che sono state poi suddivise in 4 classi: CNVs patologiche, VOUS verosimilmente patologiche, VOUS e VOUS verosimilmente benigne, secondo quanto riportato da Kearney et al. (2011) e Vermeesch et al. (2012). L'interpretazione del significato clinico delle CNVs è stato possibile mediante l'utilizzo di *database* pubblici, quali ISCA, DECIPHER e DGV.

Il 15.8% dei casi è risultato portatore di una anomalia patologica o VOUS verosimilmente patologica. Da una prima analisi è emerso che le CNVs patologiche e VOUS verosimilmente patologiche sono più frequentemente delezioni mentre le VOUS verosimilmente benigne sono più frequentemente duplicazioni. In particolare è emerso che circa il 55.5% delle delezioni identificate sono state classificate come CNVs patologiche e VOUS verosimilmente patologiche, mentre circa il 31.1% delle duplicazioni sono state classificate come VOUS verosimilmente benigne. Questo è in linea con quanto finora riportato in letteratura secondo cui le delezioni causano generalmente fenotipi più gravi rispetto alle duplicazioni (Lee et al. 2007).

In 232 casi è stato possibile estendere l'analisi ai genitori e determinare se le CNVs siano state ereditate da uno di essi o siano insorte *de novo* (150 *de novo* vs 140 ereditate). Lo studio del pattern di ereditarietà può, infatti, aiutare nell'interpretazione del significato clinico delle anomalie identificate. Si è potuto osservare che la maggior parte delle anomalie *de novo* sono state classificate come patologiche o VOUS verosimilmente patologiche (64.6%), tale frequenza è risultata essere significativamente superiore rispetto a quella osservata tra le anomalie ereditate (20.7%) ($p < 0.01$). In particolare, in base al nostro campione, l'identificazione di una anomalia insorta *de novo* aumenta la probabilità, rispetto ad una anomalia ereditata, che essa sia patologica o verosimilmente patologica (OR=7.01; 95% CI 4.00-14.47).

Tale dato conferma quanto riportato in letteratura secondo cui l'insorgenza *de novo* rafforza l'ipotesi di patogenicità (Kaminsky et al. 2011).

Suddividendo, poi, le CNVs in sottogruppi in base alle loro dimensioni, è stato osservato che esiste una correlazione statisticamente significativa tra l'ampiezza dell'anomalia e il suo significato clinico ($p < 0.001$). In particolare è emerso che le CNVs maggiori di 1Mb sono più spesso classificate come varianti patologiche e VOUS verosimilmente patologiche, mentre quelle inferiori a 1Mb sono più spesso classificate come varianti a significato incerto e VOUS verosimilmente benigne.

Tali osservazioni potrebbero essere dovute al fatto che maggiore è la dimensione dell'anomalia, maggiore è la probabilità che essa coinvolga geni dosaggio-sensibili implicati nello sviluppo e ne alteri la funzione, portando ad un fenotipo patologico. Ciò non esclude, tuttavia, che anche CNVs di dimensioni ridotte possano avere una rilevanza clinica, poiché è soprattutto il contenuto genico, piuttosto che l'ampiezza della regione coinvolta nel riarrangiamento, a determinarne la possibile associazione con la patologia (Lee et al. 2007).

La successiva analisi bioinformatica, mediante *UCSC Genome Browser*, il *Database of Genomic Variants* (DGV) e i software *Pipmaker* e *zPicture*, delle regioni in cui ricadono i *breakpoints* degli sbilanciamenti rilevati dall'array-CGH, ha permesso di suddividere le CNVs in base alla presenza di LCRs o micro-omologie. In questo modo è stato possibile ipotizzare il meccanismo di formazione del riarrangiamento. Infatti da quanto riportato in letteratura le LCRs sembrano giocare un ruolo importante nel mediare la NAHR, mentre la presenza di micro-omologie sembra necessaria perché avvengano NHEJ o FoSTeS (Gu et al. 2008).

Nonostante la NAHR possa verificarsi anche in corrispondenza di sequenze LINE e SINE, non sono state osservate CNVs mediate da tali elementi. Come riportato da Gu et al. (2008), i tratti di omologia tra due sequenze ripetute intersperse hanno dimensioni molto minori rispetto a quelli presenti nelle LCRs e ciò potrebbe spiegare una più bassa frequenza di eventi di ricombinazione mediati da tali sequenze.

Su 431 CNVs identificate, in 111 sono state rilevate LCRs con omologia di sequenza $\geq 90\%$ e quindi mediate da NAHR. Nelle altre 320 l'analisi

bioinformatica ha rilevato la presenza ai *breakpoints* di corti frammenti (5-200 nt) con omologia media tra il 65% e l'80%, e quindi si può ipotizzare che questi riarrangiamenti siano dovuti a eventi di NHEJ o FoSTeS per i quali è sufficiente la presenza di regioni di micro-omologia (Gu et al. 2008).

Nel nostro campione è stato osservato che i meccanismi di formazione delle CNVs più frequenti sono quelli mediati da micro-omologie (74.2%); il meccanismo di formazione degli sbilanciamenti non è risultato essere correlato né al tipo di CNV (delezione o duplicazione) né al pattern di ereditarietà (anomalia *de novo* o ereditata).

Suddividendo le CNVs identificate in sottogruppi in base alle loro dimensioni, è emerso che NHEJ o FoSTeS, rispetto a NAHR, sono verosimilmente i meccanismi più frequenti per tutti i sottogruppi ad eccezione di quello di CNVs di 1Mb-5Mb. In quest'ultimo gruppo infatti il contributo dei meccanismi di formazione associati alla presenza di LCRs o micro-omologie ai *breakpoints* è sovrapponibile. Questo conferma quanto riportato in letteratura, ovvero che la maggior parte delle riarrangiamenti è mediata da meccanismi diversi dalla ricombinazione omologa non allelica (NAHR) (Perry et al. 2008).

La maggior parte delle CNVs associate alla presenza di LCRs ha dimensioni comprese tra 1Mb e 5Mb (51%), mentre le anomalie in cui sono state osservate micro-omologie nei punti di rottura si distribuiscono in modo abbastanza uniforme nei vari sottogruppi. Va tuttavia osservato che la frequenza di anomalie associate a LCRs comprese tra 1Mb e 5Mb, è significativamente superiore rispetto a quella osservata tra le CNVs associate a micro-omologie per lo stesso intervallo di dimensioni. Viceversa, invece, per quanto riguarda le anomalie <200Kb e >5Mb.

Tali osservazioni potrebbero essere correlate, come riportato da Stankieqicz & Lupski (2002) e da Sharp et al. (2005), al fatto che esistono dei limiti spaziali affinché la NAHR possa avvenire efficacemente. Studi *in silico*, infatti, hanno osservato che gran parte delle LCRs hanno dimensioni superiori a 10Kb e sono separate da una sequenza che varia da 50Kb a 10Mb. Questo spiegherebbe il fatto che, sia anomalie di dimensioni ridotte che particolarmente grandi, siano mediate raramente dal meccanismo di ricombinazione omologa non allelica. Inoltre, altri studi hanno suggerito che *in vivo* la maggior parte dei riarrangiamenti mediati da

LCRs sia compreso tra 1Mb e 5Mb, come osservato nel nostro campione (Sibbons et al. 2012).

È stata, in seguito, valutata la distribuzione delle anomalie nel genoma ed è emerso che il cromosoma X è quello in cui ne sono state rilevate il maggior numero e che i cromosomi 15, 16, 17, 18, 22 e X hanno una densità di CNVs maggiore rispetto agli altri.

Tuttavia non è stata evidenziata una correlazione positiva tra le dimensioni dei cromosomi e la distribuzione delle anomalie, ovvero ad una maggiore lunghezza dei cromosomi non si associa necessariamente un maggior numero di CNVs.

Tale correlazione risulta invece statisticamente significativa se si escludono dall'analisi le CNVs che presentano duplicazioni segmentali (LCRs) ai *breakpoints* ($p=0.002$, $r= 0.608$, Correlazione di Spearman), come osservato da Vulto-van Silfhout et al. (2013). Le LCRs, infatti, non sono distribuite in maniera omogenea nel genoma umano, ma sono maggiormente concentrate in alcuni cromosomi tra cui 7, 15, 16, 17 e 22 (Bailey et al. 2002).

Nel nostro campione infatti è stato osservato che in essi sono maggiormente frequenti CNVs mediate da ricombinazione omologa non allelica, le quali sono responsabili di sindromi ricorrenti in pazienti con ritardo mentale, tra cui la Sindrome di Williams in 7q11.23, la Sindrome di Prader-Willi/ Angelman in 15q11.2q13.1, le sindromi da microdelezione / microduplicazione in 16p11.2 e 16p13.11, le sindromi di Smith-Magenis e Potocki-Lupski in 17p11.2, la Sindrome Velocardiofaciale / DiGeorge in 22q11.21.

Tra tutti i soggetti esaminati mediante array-CGH, due hanno rivelato la presenza di riarrangiamenti strutturali particolarmente complessi (0.6% dei soggetti positivi all'analisi); in letteratura è riportato che tali riarrangiamenti sono molto rari, nonostante la loro frequenza nella popolazione generale non sia stata stimata ad oggi con precisione (Zang et al. 2009). Abbiamo ipotizzato che tali anomalie si siano formate per un singolo evento di cromotripsa, piuttosto che come conseguenza di una serie di sbilanciamenti indipendenti che si sono accumulati. Come riportato da Liu et al. (2011), in quest'ultimo caso ci si

aspetterebbe, infatti, che le anomalie fossero distribuite su tutto il genoma e non localizzate in un'unica regione cromosomica.

Per quanto riguarda la capacità dell'array-CGH di identificare mosaicismi, dei casi risultati positivi all'indagine (347/1051), 4 hanno presentato riarrangiamenti che coinvolgono dal 10% al 60% delle cellule. Nonostante i dati finora riportati in letteratura dimostrino che gli oligo-array siano in grado di rilevare mosaicismi non inferiori al 20-30%, nel nostro studio abbiamo identificato un caso in cui il log ratio ottenuto (0.09) è indicativo della presenza di una ampia duplicazione di 64.1Mb che interessa il 10-20% delle cellule. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la *detection rate* della tecnica in caso di mosaicismi è associata al numero di sonde presenti nella regione cromosomica interessata e quindi maggiori sono le dimensioni del riarrangiamento, più alta è la capacità di rilevarlo (Miller et al. 2010).

Infine l'array-CGH è stato utilizzato per lo studio di 12 campioni fetali. Le indicazioni all'esame sono state la presenza di anomalie ecografiche e/o sbilanciamenti cromosomici non completamente caratterizzati mediante cariotipo, o la ricerca diretta di sbilanciamenti già individuati in altri membri della famiglia. Due casi sono risultati positivi, in uno è stato caratterizzato un cromosoma marcatore identificato all'analisi del cariotipo, mentre nell'altro è stata riscontrata una duplicazione di origine paterna. Il numero esiguo di campioni fetali analizzati non ci permette di trarre delle conclusioni riguardo alla possibilità di utilizzare in diagnosi prenatale l'array-CGH in sostituzione al cariotipo standard. Le difficoltà interpretative dei risultati che ancora si riscontrano, con particolare riferimento alle varianti di significato incerto e alla disomogeneità nella definizione delle CNV clinicamente significative, lo rendono al momento un test di secondo livello da utilizzare in associazione all'analisi citogenetica convenzionale, come chiaramente indicato dalle linee guida redatte dalla Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) e dalla Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica (SIEOG). Per superare alcuni di questi problemi di interpretazione delle CNVs è stato proposto di utilizzare *microarray* specifici per l'analisi prenatale, arricchiti di sonde nelle regioni responsabili di sindromi

da microdelezione/microduplicazione e/o contenenti geni malattia ma con una copertura inferiore per tutte le altre regioni del genoma (Evangelidou et al. 2013). Questo dovrebbe aumentare la *detection rate* di CNVs patologiche e limitare l'identificazione di quelle a significato clinico incerto.

Il nostro studio dimostra l'utilità dell'applicazione dell'array-CGH come esame di primo livello in pazienti con disabilità intellettive e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dismorfismi.

Infatti, la possibilità di utilizzare una tecnica *genome wide* con elevata risoluzione e che consente di valutare la presenza di eventuali anomalie cromosomiche a livello dell'intero genoma in assenza di un sospetto diagnostico specifico, ci ha permesso di incrementare quasi del 30% la *detection rate* di sbilanciamenti criptici (delezioni o duplicazioni), non identificabili all'analisi del cariotipo. Questo ha consentito l'esecuzione di analisi più accurate e precise con tempi di risposta più veloci.

Il nostro progetto ha inoltre evidenziato, mediante l'analisi dei *breakpoints* delle anomalie rilevate, la presenza nel genoma di alcuni segmenti che causano un alto grado di instabilità genomica e rendono specifiche regioni cromosomiche più suscettibili ad eventi di ricombinazione. I meccanismi molecolari che causano disordini genomici sono quindi correlati all'architettura stessa del genoma umano che agisce come catalizzatore dell'instabilità cromosomica portando alla formazione di riarrangiamenti aberranti.

L'array-CGH inoltre ha fatto emergere un numero molto alto di variazioni a significato incerto ($264/431=61.3\%$) che dimostrano l'importanza di un sempre maggiore sviluppo e utilizzo di *database* pubblici come DGV, ISCA e DECIPHER per l'interpretazione clinica dei risultati.

La consultazione di tali *database* ha infatti permesso di attribuire, in una significativa percentuale di tali sbilanciamenti, un ruolo verosimilmente benigno ($88/264=33.3\%$) oppure verosimilmente patologico ($22/264=8.3\%$).

Inoltre il nostro studio ha mostrato che, in caso di test array-CGH positivo, ai fini di una corretta interpretazione del risultato è necessario estendere l'analisi ai genitori, in quanto le CNVs *de novo* hanno una maggiore probabilità di essere

patogenetiche, nonostante non si possa escludere che anche quelle ereditate abbiano un ruolo nel causare fenotipi complessi.

L'obiettivo futuro sarà quindi quello di delineare in modo sempre più preciso linee guida nazionali ed internazionali comuni per l'interpretazione dei risultati identificati mediante array-CGH sia in diagnosi postnatale che prenatale.

Di seguito vengono riportate le tabelle riassuntive dei risultati ottenuti, ordinate a seconda di significato clinico e di cromosoma.

	Caso	Sesso	Hg	Risultato	Dimensioni	delezione / duplicazione	interpretazione	pattern di ereditarietà	% omologia ai breakpoints
1	11649	M	[Hg19]	1p34.2p34.1(40,144,594-44,549,798)x1	4,41Mb	delezione	patologica		~75%
2	5236	F	[hg18]	1p36.32p36.13(4,743,183-18,091,703)x1	13,35Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
3	5266	F	[Hg18]	1p36.33p36.31(554,268-5,311,663)x1	4,76Mb	delezione	patologica		~75%
4	5095	M	[Hg18]	1p36.33p36.31(554268-6618291)x1	6,1Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
5	4973	F	[Hg18]	1p36.33p36.32(1,039,874-2,532,312)x1	1,49Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
6	9992	M	[Hg18]	1p36.33p36.32(554,268-2,479,281)x1	1,93Mb	delezione	patologica		~75%
7	5573	M	[Hg18]	1q21.1q21.2(145,031,367-148,029,600)x1	2,99Mb	delezione	patologica	ereditata	~95% LCRs
8	10057	M	[Hg19]	1q21.1(145,031,367-146,201,635)x3	1,17Mb	duplicazione	patologica		~94% LCRs
9	5282	F	[Hg18]	1q21.1(145,031,367 -146,201,635)x3	1,17Mb	duplicazione	patologica		~94% LCRs
10	12188	M	[Hg19]	1q21.1q21.2(145,740,598-147,786,706)x3	2,05Mb	duplicazione	patologica		~94% LCRs
11	11821	F	[Hg19]	1q21.1q21.2(145,747,214-147,735,011)x3	1,99Mb	duplicazione	patologica	ereditata	~94% LCRs
12	10855	M	[Hg19]	1q21.1q21.2(146,564,743-149,192,104)x1	2,63Mb	delezione	patologica	ereditata	~93% LCRs
13	10145	F	[hg19]	1q23.3q25.1(162,533,633-173,615,924)x1	11,1Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
14	5602	M	[Hg19]	1q42.11q42.12(224,349,658-224,636,258)x1	286,6Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
15	11625	M	[Hg19]	1q42.13q42.2(229,567,001-232,981,590)x1	3,4Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
16	5097/9309	F	[Hg18]	1q43q44 (239747174-247179291)x1	7,43Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%

17	4166	M	[hg19]	2p12p11.2(80,052,315-90,105,896)x1	10,05Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
18	10791	M	[Hg19]	2p22.1p16.2(38,813,692-54,085,880)x3	15,27Mb	uplicazione	patologica		~80%
19	10371	M	[Hg19]	2p24.1p23.3(21,233,468-26,823,398)x1	5,6Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
20	12193	M	[Hg19]	2q14.2q14.3(119,336,704-127,696,905)x1	8,36Mb	delezione	patologica		~65%
21	4901	M	[hg18]	2q24.1q24.3(154,592,157-166,073,025)x3 mosaicismo	10.8Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
22	10280	f	[hg18]	2q36.3q37.3(230,576,313-242,690,037)x1	12,11Mb	delezione	patologica		~70%
23	5140	M	[Hg18]	2q37.2(236,460,470-242,690,037)x1	6,23Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
24	5691	F	[Hg18]	3p14.2p14.1(62,254,271-65,584,388)x1	3,33Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
25	4891	M	[hg19]	3p21.1p11.1(53,276,971-89,837,370)x1	36,6Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~80%
26	11148	M	[Hg19]	3p25.3(9,394,944-9,542,885)x1	147,94Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
27	10071	M	[Hg18]	3p25.3(9,397,487-9,768,524)x1	371Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
28	4279	M	[Hg19]	3q29(195,777,965-197,310,451)x1	1,53Mb	delezione	patologica		~97% LCRs
29	5144	M	[Hg18]	3q29(197,393,261-198,723,053)x1	1,33Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~96% LCRs
30	11476	M	[Hg19]	4p16.3(156,100-2,756,057)x1	2.6Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
31	12190	F	[Hg19]	4p16.3(72,447-1,984,564)x1	1,91Mb	delezione	patologica		~80%
32	5434	F	[hg18]	4p16.3p16.1(62,447-10,292,183)x1	10,23Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
33	4963	F	[hg19]	4p16.3p16.2(72,447-3,770,271)x1	3,67Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~80%
34	5085	F	[Hg18]	4q28.3q31.22(135,844,470-145,316,133)x1	9,47Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~80%
35	11396	M	[hg19]	4q31.23q35.2(150,233,681-190,114,926)x3	39,9Mb	uplicazione	patologica		~70%

36	4519	M	[hg19]	4q35.1q35.2(185,781,546-191,121,344)x1	5,34Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
37	12058	F	[Hg19]	5p13.2p13.1(35,213,721-39,480,926)x3	4,27Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
38	4288	M	[Hg18]	5q11.2q12.1(50,714,334-60,542,519)x1	9,83Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
39	5375	M	[Hg18]	5q14.3q15(91,730,827-96,153,657)x1	4,42Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
40	5693	F	[hg18]	6p25.3p23(97,634-13,774,567)x3	13,68Mb	uplicazione	patologica		~65%
41	10503	M	[Hg19]	6p25.3p25.1(259,528-5,404,928)x1	5,15Mb	delezione	patologica		~70%
42	6829	F	[Hg19]	6q12(64,170,465-68,327,114)x1	4,2Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
43	6829	F	[Hg19]	6q13q14.1(70,130,213-79,326,489)x1	9,2Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
44	10050	M	[Hg18]	6q13q14.1(73,027,523-80,808,746)x1	7,78Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
45	10426	M	[Hg19]	6q21q22.1(108,385,404-117,315,978)x1	8,93Mb	delezione	patologica		~70%
46	5264	F	[Hg18]	6q27(168,588,481-170,734,227)x1	2,15Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
47	9946	F	[Hg18]	7q11.23(72,058,681-73,777,326)x1	1,72Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
48	5278	M	[Hg18]	7q11.23(72,338,350-73,777,326)x1	1,44Mb	delezione	patologica		~99% LCRs
49	5768	M	[Hg18]	7q11.23(72,338,350-76,134,302)x1	3,8Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
50	10175	F	[Hg19]	7q11.23(72,700,414-74,139,390)x3	1,44Mb	uplicazione	patologica		~99% LCRs
51	10994	F	[Hg19]	7q11.23(72,726,578-74,139,390)x1	1,41Mb	delezione	patologica		~99% LCRs
52	5459	M	[Hg18]	7q11.23(72338350-73777326)x1	1,44Mb	delezione	patologica		~99% LCRs
53	11107	F	[hg19]	8p21.2q11.21(25,006,544-51,152,922)x3 mosaicismo	26,15Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
54	5099	M	[Hg18]	8p23.1(8,229,404-11,770,357)x1	3,54Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~95% LCRs

55	11695	F	[Hg19]	8p23.1(7,303,187-11,732,948)x1	4,43Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~95% LCRs
56	4392	M	[Hg19]	8p23.1(7,303,187-12,241,152)x1	4,9Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~95% LCRs
57	10968	F	[Hg19]	8p23.1p11.21(12,583,259-42,978,160)x3	30,4Mb	uplicazione	patologica		~70%
58	11740	M	[hg19]	8p23.1p22(12,241,093-16,416,708)x3	4,2Mb	uplicazione	patologica		~75%
59	4963	F	[hg19]	8p23.3p23.1 (191,530-11,721,654)x3	11,57Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
60	11740	M	[hg19]	8p23.3p23.1(191,530-6,914,076)x1	6,72Mb	delezione	patologica		~65%
61	10968	F	[Hg19]	8p23.3p23.1(191,530-7,303,237)x1	7,11Mb	delezione	patologica		~65%
62	11396	M	[hg19]	8p23.3p23.2(191,530-3,889,591)x1	3,7Mb	delezione	patologica		~70%
63	10304	F	[Hg19]	8q21.13q21.3(83,157,905-88,124,872)x1	4,96Mb	delezione	patologica		~70%
64	12139	M	[hg19]	8q24.13q24.3(125,211,975-141,364,614)x1	16,15Mb	delezione	patologica		~70%
65	11740	M	[hg19]	8q24.13q24.3(125,325,797-146,280,020)x3	21Mb	uplicazione	patologica		~80%
66	11119	F	[Hg19]	9p24.1p23(5,022,053-12,666,259)x3	7,64Mb	uplicazione	patologica		~75%
67	4461	M	[Hg19]	9p24.2p13.1(214,367-39,287,118)x3	39Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
68	10149	F	[hg19]	9p24.3p13.1 (762,947-39,156,954)x3	38,4Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~70%
69	11119	F	[Hg19]	9p24.3p24.1(214,367-4,861,086)x1	4.65Mb	delezione	patologica		~70%
70	10504	F	[Hg19]	9p24.3p24.1(214,367-8,116,493)x1	7,9Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
71	11128	M	[Hg19]	9q21.11q33.2(71,137,447-123,716,051)x3	52,6Mb	uplicazione	patologica		~65%
72	11670	F	[Hg19]	9q22.2q22.31(92,138,373-96,285,603)x1	4,15Mb	delezione	patologica		~95% LCRs
73	11669	F	[Hg19]	9q22.2q22.31(92,138,373-96,285,603)x1	4,15Mb	delezione	patologica		~95% LCRs

74	10951	M	[Hg19]	10q22.1q26.3(71,332,953-135,404,523x3) mosaicismo	64,1Mb	uplicazione	patologica		~70%
75	5279	M	[Hg18]	10q22.3q23.2(81,692,910-88,854,902)x1	7,16Mb	delezione	patologica	ereditata	~94% LCRs
76	4519	M	[hg19]	11q23.1q25(112,765,054-133,951,370x3)	21,2Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~85%
77	10430	F	[hg18]	11q24.1q25(121,492,888-134,446,160)x1	13Mb	delezione	patologica		~75%
78	11308	F	[Hg19]	11q24.2q24.3(126,542,840-129,061,060)x1	2,52Mb	delezione	patologica	ereditata	~70%
79	11489	F	[hg19]	13q31.3q34(94,197,542-115,059,020)x3	20,86Mb	uplicazione	patologica		~80%
80	10068	F	[hg18]	14q11.2q12(19,365,051-31,212,370)x3	11,84Mb	uplicazione	patologica		~65%
81	5276	F	[hg18]	14q11.2q12(19,508,845-29,573,616)x3	10,1Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
82	10246	M	[Hg18]	14q12(29,238,783-31,533,349)x1	2,3Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
83	11333	M	[hg19]	15q11.2q13.3(20,849,110-31,292,534)x3	10,4Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~92% LCRs
84	10519	M	[Hg19]	15q11.2q13.1(23,699,701-28,525,460)x3	4,83Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~99% LCRs
85	11391	F	[Hg19]	15q11.2q13.1(23,699,701-28,525,460)x3	4,83Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~99% LCRs
86	5600	M	[Hg18]	15q13.2q13.3(28,725,507-30,298,155)x1	1,6Mb	delezione	patologica	ereditata	~99% LCRs
87	5583	M	[Hg18]	15q22.2(57,110,704-58,694,435)x1	1,58Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
88	11247	F	[Hg19]	16p11.2(29,673,954-30,105,987)x1	432Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99,5% LCRs
89	11246	F	[Hg19]	16p11.2(29,673,954-30,198,600)x1	524,6Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99,5% LCRs
90	11949	F	[Hg19]	16p11.2(29,673,954-30,198,600)x1	524,6Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99,5% LCRs
91	10695	F	[Hg19]	16p11.2(29,673,954-30,198,600)x1	525Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99,5% LCRs
92	11068	M	[Hg19]	16p11.2(29,673,954-30,198,600)x1	524,6Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99,5% LCRs

93	10180	M	[Hg19]	16p11.2(29,673,954-30,198,600)x3	525Kb	uplicazione	patologica		~99,5% LCRs
94	5733	M	[Hg18]	16p11.2(29,581,455-30,104,842)x3	523,4Kb	uplicazione	patologica	ereditata	~99,5% LCRs
95	5926	M	[Hg18]	16p11.2(29,581,455-30,106,101)x1	524,6Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99,5% LCRs
96	11054	F	[Hg19]	16p13.11(14,944,560-16,276,115)x1	1,33Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
97	11025	F	[Hg19]	16p13.11(14,944,560-16,305,736)x1	1,36Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
98	12236	M	[Hg19]	16p13.11(15,048,751-16,249,607)x1	1,2Mb	delezione	patologica		~99% LCRs
99	12168	M	[Hg19]	16p13.11(15,048,751-16,276,115)x3	1,23Mb	uplicazione	patologica		~99% LCRs
100	11632	F	[Hg19]	16p13.11(15,048,751-16,305,736)x3	1,26Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~99% LCRs
101	12138	F	[Hg19]	16p13.11p12.3(15,492,317-18,012,461)x3	2,52Mb	uplicazione	patologica		~99% LCRs
102	5811	M	[Hg18]	16p13.11p12.3(15,164,187 -18,020,277)x1	2,86Mb	delezione	patologica	ereditata	~99% LCRs
103	10049	F	[Hg18]	16p13.11p12.3(15,164,187-18,020,277)x3	2,86Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~99% LCRs
104	10973	F	[Hg19]	16p13.3(96,766-589,853)x1	493,1Kb	delezione	patologica	ereditata	~75%
105	5138	M	[Hg18]	16q23.1(76,439,234 -77,681,087)x3	1,24Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
106	7255	M	[Hg19]	17p11.2(16,603,130-20,434,018)x1	3,83Mb	delezione	patologica		~98% LCRs
107	5225	M	[Hg18]	17p11.2(16,763,408-20,162,287)x1	3,4Mb	delezione	patologica		~98% LCRs
108	9971	M	[Hg18]	17p12(14,052,497-15,382,791)x1	1,33Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~98% LCRs
109	5116	F	[hg18]	17p13.1p11.2 (7,401,533-18,845,678)x3	11,44Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
110	5180	M	[Hg18]	17p13.3(823,563-3,364,754)x3	2,54Mb	uplicazione	patologica		~80%
111	10308	F	[Hg19]	17p13.3(223,182-2,537,850)x3 mosaicismo	2,3Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~80%

112	12167	F	[Hg19]	17q11.2(28,454,277-31,595,510)x1	3,14Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~98% LCRs
113	10711	F	[Hg19]	17q11.2(28,941,066-30,361,836)x1	1,42Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~98% LCRs
114	11882	M	[Hg19]	17q11.2(28,941,066-30,361,836)x1	1,42Mb	delezione	patologica		~98% LCRs
115	719	F	[Hg19]	17q11.2(28,999,834-30,361,836)x1	1,36Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~98% LCRs
116	11042/11082	M	[Hg19]	17q11.2(29,564,613-29,691,340)x1	126,7Kb	delezione	patologica	ereditata	~96% LCRs
117	5808	F	[hg18]	17q12(31,891,535-33,242,217)x1	1,35Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
118	5040	M	[Hg18]	17q21.31(41073486-41700815)x1	627,33Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~98% LCRs
119	4509	F	[Hg19]	18p11.32p11.21(180,229-13,885,315)x1	13.7Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
120	5007	F	[Hg19]	18p11.32p11.21(180,229-14,928,854)x3	14,74Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
121	10567	M	[hg19]	18p11.32p11.21(180,229-12,159,504)x1	12Mb	delezione	patologica		~65%
122	10070	M	[Hg18]	18p11.32p11.22(170,229-10,128,949)x1	9,96Mb	delezione	patologica		~75%
123	11666	M	[Hg19]	18q21.31q23(53,813,460-77,982,126)x1	24,2Mb	delezione	patologica		~80%
124	11952	F	[hg19]	18q21.32q23(56,897,806-76,379,446)x1	19,5Mb	delezione	patologica		~65%
125	4904	M	[Hg19]	18q21.33q22.2(60173762-66753690)x1	6.57Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
126	11489	F	[hg19]	18q22.1q23(66,505,951-77,982,126)x1	11,48Mb	delezione	patologica		~80%
127	5097/9309	F	[Hg18]	18q22.3q23(69494606-76083117)x3	6,6Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
128	4971	M	[Hg18]	19p13.2(7,067,160-12,258,002)x3	5,2Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~80%
129	10016	M	[hg18]	20p12.3p11.1(8,047,741-26,023,841)x3	17,98Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
130	5434	F	[hg18]	20p13p12.3(18,580-7,916,031)x3	7,9Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~80%

131	5751	F	[Hg18]	20q11.22q12(33,224,513-37,379,013)x1	4,15Mb	delezione	patologica		~75%
132	4092	F	[Hg19]	20q13.12q13.13(45,015,183-48,553,686)x1	3,54Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
133	5419	M	[Hg18]	20q13.33(60,474,168-62,363,633)x1	1,89Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
134	11779	M	[Hg19]	22q11.1q11.21(17,063,579-18,641,468)x3	1,58Mb	uplicazione	patologica		~75%
135	5972	F	[Hg18]	22q11.21(17,276,972-20,128,755)x1	2,85Mb	delezione	patologica		~97% LCRs
136	5094	M	[Hg18]	22q11.21(17,276,972-19,712,953)x1	2,43Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~97% LCRs
137	5072	F	[Hg18]	22q11.21(17,276,972-20,128,755)x1	2,85Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~97% LCRs
138	4512/7874	M	[Hg19]	22q11.21(18,896,972-21,382,953)x1	2.43Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
139	4603	F	[Hg19]	22q11.21(18,896,972-21,382,953)x1	2.4Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~99% LCRs
140	4809	F	[Hg18]	22q11.21(17,755,985-19,712,953)x1	1,96Mb	delezione	patologica	ereditata	~97% LCRs
141	11962	F	[Hg19]	22q11.21(19,023,824-20,900,660)x1	1,88Mb	delezione	patologica		~99% LCRs
142	10622	M	[Hg19]	22q11.21(18,896,972-21,382,953)x3	2,5Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~99% LCRs
143	11591	M	[Hg19]	22q11.21(18,909,038-21,382,953)x3	2,47Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~99% LCRs
144	11096	M	[Hg19]	22q13.2(42,170,084-43,089,891)x1	919,81Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
145	12210	F	[Hg19]	22q13.2q13.33(43,827,346-51,178,264)x1	7,35Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
146	5360	M	[Hg18]	22q13.31q13.33(44,061,193-49,525,130)x1	5,46Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%
147	11480	F	[Hg19]	22q13.31q13.33(47,308,036-51,178,264)x1	3,87Mb	delezione	patologica		~70%
148	4493	M	[Hg18]	Xp11.21p11.1(55,298,205-58,499,110)x2	3,2Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
149	5434	F	[hg18]	Xp22.12p22.11(21,186,384-22,042,586)x1	856,2Kb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%

150	5456	F	[Hg18]	Xp22.2p22.11(13,946,424-22,202,362)x1	8,3Mb	delezione	patologica		~93% LCRs
151	11627	M	[Hg19]	Xp22.31(6,453,313-8,131,810)x0	1,68Mb	delezione	patologica		~95% LCRs
152	10185	F	[hg19]	Xp22.33p11.22(2,700,316-52,693,966)x1	50Mb	delezione	patologica		~75%
153	10645	M	[Hg19]	Xp22.33p22.31(3,981,988-7,555,351)x0	3,57Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~75%
154	4362	M	[Hg19]	Xq11.1q13.1 (64,719,091-70,627,545)x2	5.9Mb	delezione	patologica	ereditata	~70%
155	5086	M	[Hg18]	Xq21.1q21.31(80,842,196-90,261,185)x2	9,42Mb	uplicazione	patologica	ereditata	~93% LCRs
156	11812	F	[hg19]	Xq21.31q22.2(91,173,852-103,031,810)x3	11,86Mb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~65%
157	5071	M	[Hg18]	Xq25(122,867,233-123,094,632)x2	227,4Kb	uplicazione	patologica	<i>de novo</i>	~80%
158	5059	M	[Hg18]	Xq25(122,933,108-123,094,632)x2	161,52Kb	uplicazione	patologica	ereditata	~80%
159	5378	M	[Hg18]	Xq28(148,376,691-148,431,346)x0	54,7Kb	delezione	patologica	ereditata	~70%
160	5378	M	[Hg18]	Xq28(148,456,474-148,542,775)x2	86,3Kb	uplicazione	patologica	ereditata	~75%
161	5378	M	[Hg18]	Xq28(148,638,257-148,789,779)x0	151,5Kb	delezione	patologica	ereditata	~80%
162	5378	M	[Hg18]	Xq28(148,856,479-149,501,115)x2	644,6Kb	uplicazione	patologica	ereditata	~75%
163	10235	M	[Hg18]	Xq28(152,702,418-153,158,732)x2	456,3Kb	uplicazione	patologica		~75%
164	11594	M	[Hg19]	Xq28(152,819,509-153,877,929)x2	1,06Mb	uplicazione	patologica		~75%
165	12191	M	[Hg19]	Xq28(152,857,869-153,533,691)x2	675,8Kb	uplicazione	patologica		~75%
166	5066	M	[Hg18]	Xq28(152,837,176-153,049,515)x2	212,34Kb	uplicazione	patologica	ereditata	~75%
167	11074	M	[Hg19]	Yq11.21q11.223(14,040,390-24,874,360)x0	10,83Mb	delezione	patologica	<i>de novo</i>	~70%

Tabella 26: per ogni caso analizzato è riportata l'alterazione rilevata mediante array-CGH, le dimensioni, il tipo di anomalia, il significato clinico, il pattern di ereditarietà e la presenza di omologia

	Caso	Sesso	Hg	Risultato	Dimensioni	delezione / duplicazione	interpretazione	pattern di ereditarietà	% omologia ai breakpoints
1	5065	M	[Hg18]	2p16.1p15(59,866,968-61,969,259)x3	2,1 Mb	duplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~75%
2	5750	F	[Hg18]	2q37.2q37.3(236,897,515 -242,053,993)x3	5,2 Mb	duplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~65%
3	5750	F	[Hg18]	2q37.3(242,088,683-242,690,037)x1	601,4 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
4	10233	M	[Hg19]	3q25.2q25.31(154,501,727-155,306,755)x1	805 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	ereditata	~75%
5	4188	M	[Hg19]	7p22.1(6,026,634-6,645,865)x3	619,23 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~92% LCRs
6	11698	M	[Hg19]	7q31.31q31.32(118,152,869-122,342,050)x1	4,2 Mb	delezione	VOUS verosimilmente patologica		~65%
7	11698	M	[Hg19]	8p22(16,850,757-17,423,643)x1	573 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica		~70%
8	11370	M	[Hg19]	8q23.1q23.2(109,345,744-111,661,171)x1	2,32 Mb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~75%
9	10605	M	[Hg19]	12q15(69,392,739-69,895,694)x1	503Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~75%
10	10605	M	[Hg19]	12q21.31(81,833,360-82,027,070)x1	193,7 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~80%
11	10605	M	[Hg19]	12q21.31(82,123,931-82,187,940)x1	64 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
12	10605	M	[Hg19]	12q21.31(83,008,549-83,198,499)x1	190 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
13	10605	M	[Hg19]	12q21.31(83,863,155-83,977,917)x1	115 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~75%
14	11698	M	[Hg19]	13q31.1q31.3(87,441,182-93,879,442)x1	6,44 Mb	delezione	VOUS verosimilmente patologica		~65%
15	11009	M	[Hg19]	13q34(111,372,959-111,521,831)x1	149 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%

16	10977	F	[Hg19]	15q25.1(78,988,200-79,100,999)x3	112,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~97% LCRs
17	12060	M	[Hg19]	16p12.2p11.2(22,842,592-29,042,118)x1	6,2Mb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~98% LCRs
18	10136	M	[Hg19]	16p13.2(8,763,992-9,293,216)x3	529,2 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
19	10996	M	[Hg19]	16p13.3(2,002,265-2,636,853)x3	634,6 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
20	5166	M	[Hg18]	16q21q22.1(56,788,137-66,203,027)x3	9,4 Mb	uplicazione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
21	5166	M	[Hg18]	16q22.3(69,976,196-70,400,340)x1	424,14 Kb	delezione	VOUS verosimilmente patologica	<i>de novo</i>	~70%
22	5112	F	[Hg18]	Xq21.33(94,201,845-94,746,852)x3	545 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente patologica	ereditata	~65%

Tabella 27: per ogni caso analizzato è riportata l'alterazione rilevata mediante array-CGH, le dimensioni, il tipo di anomalia, il significato clinico, il pattern di ereditarietà e la presenza di omologia

	Caso	Sesso	Hg	Risultato	Dimensioni	delezione / duplicazione	interpretazione	pattern di ereditarietà	% omologia ai breakpoints
1	11409	F	[Hg19]	1p31.1(72,124,095-72,597,171)x1	473,1 Kb	delezione	VOUS		~70%
2	5458	F	[Hg18]	1p36.11p35.3(27,622,742-28,469,607)x3	847 Kb	duplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
3	10624	M	[Hg19]	1p36.11p35.3(27,699,070-28,597,020)x1	898 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
4	5618	M	[Hg18]	1q21.1(144,343,691-144,458,626)x3	115Kb	duplicazione	VOUS		~99% LCRs
5	10804	M	[Hg1~9]	1q21.1(145,413,388-145,747,269)x1	334 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~94% LCRs
6	10651	M	[Hg19]	1q41(217,822,281-218,006,580)x1	184,3 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
7	11812	F	[hg19]	1q44(246,518,303-246,931,110)x1	412,8Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
8	11489	F	[hg19]	1q44(248,262,654-248,480,809)x3	218,2Kb	duplicazione	VOUS		~91% LCRs
9	5073	M	[Hg18]	2p14 (68,341,822-68,450,836)x1	109Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
10	11789	M	[Hg19]	2p23.2p23.1(28,659,236-30,559,229)x3	1,9 Mb	duplicazione	VOUS	ereditata	~80%
11	10698	M	[Hg19]	2q31.2(178,684,939-179,032,170)x1	347,2 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
12	11718	M	[Hg19]	2q36.3(228,189,776-228,356,348)x3	167 Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~70%
13	12119	F	[Hg19]	3p22.1(41,614,450-41,715,768)x1	101,3 Kb	delezione	VOUS		~70%
14	10520	F	[Hg19]	3p22.2(37,366,472-37,549,590)x3	183,1 Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~65%
15	10016	M	[hg18]	3p23p22.3(31,896,245-32,318,510)x3	422,3Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~80%
16	11812	F	[hg19]	3p24.2(26,022,130-26,396,332)x1	374,2Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
17	5512	M	[Hg18]	3p26.2(3,892,387- 4,279,040)x1	386,7Kb	delezione	VOUS		~75%

18	5435	F	[Hg18]	3q13.13(109,791,303-110,397,492)x3	606,2 Kb	duplicazione	VOUS		~65%
19	10227	F	[Hg19]	3q26.32 (178,193,140-178,392,143)x3	199Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~65%
20	12123	F	[Hg19]	3q29(193,579,266-194,652,021)x1	1,07 Mb	delezione	VOUS		~80%
21	11783	M	[Hg19]	3q29(197,640,852-197,803,820)x3	163Kb	duplicazione	VOUS		~75%
22	10299	M	[Hg19]	4p14(36,272,268-37,114,858)x3	843 Kb	duplicazione	VOUS		~70%
23	5091	M	[Hg19]	4p15.33(14,811,082-14,866,955)x1	56Kb	delezione	VOUS		~70%
24	5597	M	[Hg18]	4p16.1p15.33(9,433,676-11,991,787)x1	2,56Mb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
25	4467	F	[Hg19]	4p16.3(469,112-1,066,838)x3	598 Kb	duplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
26	5512	M	[Hg18]	4q12(53,271,756-53,343,682)x1	72Kb	delezione	VOUS		~70%
27	11721	F	[Hg19]	4q21.21(79,701,251-80,327,922)x1	626,7Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
28	5091	M	[Hg19]	4q22.3(97,233,067-97,315,996)x3	83Kb	duplicazione	VOUS		~70%
29	5377	M	[Hg18]	4q25(110,603,906-110,766,472)x1	162,56 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
30	12011	F	[Hg19]	4q26(118,608,253-118,974,881)x1	366,6 Kb	delezione	VOUS		~65%
31	10818	F	[Hg19]	4q27(120,811,507-120,985,275)x1	173,8 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~80%
32	5238	M	[hg18]	4q28.1(125,656,844-127,148,514)x1	1,49Mb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
33	6001	M	[Hg18]	4q32.1(160,026,514-161,366,949)x1	1,34 Mb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
34	11702	M	[Hg19]	4q35.2(188,285,319-189,457,997)x3	1,17Mb	duplicazione	VOUS	ereditata	~65%
35	5068	F	[Hg18]	4q35.2(189,302,934 -190,081,808)x3	778,9 Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~65%
36	5237	F	[Hg18]	5q22.3 (113728080-113859956)x1	131,9Kb	delezione	VOUS	ereditata	~65%

37	100~97	M	[Hg18]	5q35.3(176,748,848-176,~967,50~9)x3	218,7Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~98% LCRs
38	12122	F	[Hg19]	5q35.3(178,762,952-179,205,699)x3	442,75 Kb	uplicazione	VOUS		~95% LCRs
39	10865	F	[Hg19]	6p12.3(48,853,322-49,820,067)x1	966,8 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
40	10070	M	[Hg18]	6p24.2(10,664,544-10,815,671)x1	151Kb	delezione	VOUS		~75%
41	2501	F	[Hg19]	6q14.3(84,910,584-86,655,068)x1	1,74Mb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
42	6001	M	[Hg18]	6q21(111,777,109-112,560,707)x3	783,6Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
43	5116	F	[hg18]	6q22.2q22.31(117,844,129-119,512,023)x3	1,67Mb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
44	12134	M	[Hg19]	6q22.31(122,284,521-122,631,817)x1	347,3 Kb	delezione	VOUS		~70%
45	10307	M	[Hg1~9]	7p14.3(33,573,662-33,~973,853)x3	400,2 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~96% LCRs
46	5814	F	[Hg18]	7q11.21(63,808,292-64,000,194)x1	191,9 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~80%
47	5364	M	[Hg18]	7q11.21(64,284,260 -64,503,508)x1	219,2 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~99% LCRs
48	5500	F	[Hg18]	7q11.21q11.22(65,289,598-68,001,801)x1	2,71 Mb	delezione	VOUS		~80%
49	12236	M	[Hg19]	7q31.1(109,105,351-109,211,744)x1	106,4Kb	delezione	VOUS		~75%
50	5091	M	[Hg19]	7q34(142,535,965-142,600,790)x1	65Kb	delezione	VOUS		~70%
51	11632	F	[Hg19]	8p22p21.3(18,719,306-19,456,780)x3	737,5 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
52	11825	M	[Hg19]	8q12.1(58,195,802-59,938,625)x3	1,74Mb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
53	4976	F	[Hg18]	8q21.3(87,986,451-88,563,034)x1	576,5Kb	delezione	VOUS	ereditata	~80%
54	10818	F	[Hg19]	8q23.1(107,307,812-107,670,002)x1	362,2 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
55	11861	M	[Hg19]	9p22.2(17,020,094-17,502,944)x1	482,8Kb	delezione	VOUS		~70%

56	10114	F	[Hg19]	9p22.2p22.1(18,398,255-18,533,307)x1	135,1Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
57	11598	M	[Hg19]	9q21.2(79,820,926-80,321,825)x3	501 Kb	uplicazione	VOUS		~70%
58	11343	M	[Hg19]	9q22.33 (100,477,840-100,617,726)x3	139,8 Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
59	5359	M	[Hg18]	9q22.33(100,477,840-100,651,943)x3	174,1Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
60	12138	F	[Hg19]	10p11.21(35,530,398-35,652,737)x3	122,3 Kb	uplicazione	VOUS		~70%
61	6047	M	[Hg18]	10p11.21(35,570,404-35,692,743)x3	122,3 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~70%
62	10576	M	[Hg19]	10p13(15,009,438-15,209,189)x3	200Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
63	11307	F	[Hg19]	10q23.2 (88,517,374-88,683,168)x1	165,8 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
64	5512	M	[Hg18]	10q23.2q23.31(89,241,227-92,783,760)x1	3,54Mb	delezione	VOUS		~75%
65	10674	M	[Hg19]	10q23.33q24.1(96,453,830-97,072,719)x3	619 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
66	11389	M	[Hg19]	10q25.1(107,971,155-108,696,541)x3	725,4 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~70%
67	10322	F	[Hg19]	10q26.11(121,620,661-121,690,236)x1	70Kb	delezione	VOUS	ereditata	~65%
68	11222	F	[Hg19]	11p11.2(46,534,329-46,761,033)x3	226,7 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~80%
69	11155	M	[Hg19]	11p13(31,561,220-31,735,748)x1	174,5 Kb	delezione	VOUS		~75%
70	5034	F	[Hg18]	11p15.4 (4,131,940-4,631,366)x3	499,4 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~65%
71	5516	M	[Hg18]	11p15.4(4,967,430-5,129,932)x1	162,5Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
72	10543	F	[Hg18]	11p15.4(9,221,553-9,522,855)x1	301,3 Kb	delezione	VOUS		~75%
73	5359	M	[Hg18]	11q25(131,285,296-131,496,325)x3	211Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
74	10064	F	[Hg18]	12p12.2p12.1(20,902,541-21,268,589)x1	366Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%

75	11718	M	[Hg19]	12p12.2p12.1(20,968,626-21,377,322)x1	409 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
76	11549	M	[Hg19]	12p12.2p12.1(21,011,274-21,377,322)x1	366Kb	delezione	VOUS		~70%
77	11499	M	[Hg19]	12p12.2p12.1(21,011,274-21,377,322)x1	366 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
78	10622	M	[Hg19]	12p12.2p12.1(21,011,274-21,377,322)x1	366Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
79	5496	F	[Hg18]	12q13.13(52,092,727-52,404,576)x1	312Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
80	10306	F	[Hg19]	12q13.13q13.2(54,574,935-55,042,101)x3	467,2 Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
81	10210	M	[Hg19]	12q22(95,650,977-95,933,841)x3	283 Kb	uplicazione	VOUS		~92% LCRs
82	12098	M	[Hg19]	12q24.31(125,012,869-125,267,433)x1	254,6 Kb	delezione	VOUS		~70%
83	5516	M	[Hg18]	13q12.12(22,464,~962-23,788,143)x3	1,32Mb	uplicazione	VOUS	ereditata	~95% LCRs
84	12068	F	[Hg19]	13q12.12(23,566,962-25,041,285)x3	1.47Mb	uplicazione	VOUS		~95% LCRs
85	11388	F	[Hg19]	13q21.1(55,978,984-58,206,132)x1	2,23Mb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
86	11210	M	[Hg19]	13q21.31(64,760,712-65,418,459)x1	657,7 Kb	delezione	VOUS		~70%
87	12207	M	[Hg19]	13q32.1(96,671,274-96,977,354)x3	306,1Kb	uplicazione	VOUS		~75%
88	10056	M	[Hg19]	13q34(114,110,114-114,303,424)x3	193,3 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
89	10904	M	[Hg19]	14q12(27,457,676-28,179,920)x1	722,24 Kb	delezione	VOUS		~70%
90	11301	M	[Hg19]	14q23.3(67,291,216-67,435,993)x1	144,77 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
91	5237	F	[Hg18]	15q11.2(1~9,10~9,124- 20,627,861)x1	1,52Mb	delezione	VOUS	ereditata	~92% LCRs
92	10120	F	[Hg19]	15q11.2(19,109,124-20,636,537)x1	1,53Mb	delezione	VOUS		~92% LCRs
93	5972	F	[Hg18]	15q11.2(20,335,887-20,627,861)x1	292Kb;	delezione	VOUS		~93% LCRs

94	5446	M	[Hg18]	15q11.2(20,335,887-20,636,537)x3	300,7 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~93% LCRs
95	11483	F	[Hg19]	15q11.2(20,849,110-23,076,420)x1	2.23 Mb	delezione	VOUS	ereditata	~99.5% LCRs
96	10469	F	[Hg19]	15q13.1(28,128,980-28,299,737)x1	170,7 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
97	3963	M	[Hg19]	15q13.3(32,076,948-32,510,863)x3	434 Kb	uplicazione	VOUS		~99% LCRs
98	11621	F	[Hg19]	15q13.3(32,076,948-32,510,863)x3	434Kb	uplicazione	VOUS		~99% LCRs
99	12018	F	[Hg19]	15q13.3(32,076,948-32,510,863)x3	434Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~99% LCRs
100	10725	F	[Hg19]	15q13.3(32,076,948-32,510,863)x3	434 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~99% LCRs
101	11388	F	[Hg19]	15q13.3(32,248,451-32,510,863)x3	262,4Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~99% LCRs
102	11427	M	[Hg19]	15q14(37,269,953-37,392,418)x1	122,46 KB	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
103	11428	M	[Hg19]	15q14(37,269,953-37,392,418)x1	122,46 KB	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
104	10486	F	[Hg19]	15q22.2q22.31(63,484,498-63,732,875)x3	248,4 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~70%
105	11069	M	[Hg19]	15q26.1(89,349,006-89,758,342)x3	409,3 Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
106	11069	M	[Hg19]	15q26.1(93,439,117-93,800,894)x3	362 Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
107	11495	F	[Hg19]	15q26.3(99,652,283-99,836,162)x3	183,9 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
108	5584	M	[Hg18]	16p12.1(26,358,726-26,987,098)x1	628,4Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
109	4461	M	[Hg1~9]	16p12.2(21,475,060-21,837,551)x1	363Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~98% LCRs
110	5488	M	[Hg18]	16p12.3(20,271,496-20,350,958)x3	79,5Kb	uplicazione	VOUS		~75%
111	10986	M	[Hg19]	16p13.12(12,663,672-12,831,839)x1	168,2 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
112	10484	M	[Hg19]	17p12(13,951,208-14,063,244)x1	112 Kb	delezione	VOUS		~99% LCRs

113	5623	M	[Hg18]	17p13.3(1,226,261-1,465,133)x3	239Kb	duplicazione	VOUS		~70%
114	3157	F	[Hg18]	17p13.3(48,539-351,250)x1	302,7Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~80%
115	43~92	M	[Hg1~9]	17q22(51626727-52582300)x3	~955Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~95% LCRs
116	43~92	M	[Hg1~9]	17q23(62321774-62464765)x3	21~9Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~95% LCRs
117	5143	F	[Hg18]	17q23.3(58,512,598-58,669,099)x1	156,5 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
118	10576	M	[Hg19]	18p11.31(6,813,026-6,960,053)x1	147Kb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
119	11573	F	[Hg19]	18q22.1(65,676,232-66,381,438)x3	705,21 Kb	duplicazione	VOUS		~70%
120	4898	F	[Hg19]	18q22.2q22.3(68,476,892-70,577,426)x1	2.1Mb	delezione	VOUS	ereditata	~70%
121	10818	F	[Hg19]	18q22.3(70,160,991-70,659,074)x3	498,1 Kb	duplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~65%
122	11616	F	[Hg19]	18q23(76,973,994-77,219,827)x3	246 Kb	duplicazione	VOUS		~70%
123	10535	M	[Hg19]	19p13.12(15,163,136-15,481,900)x3	319 Kb	duplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
124	11412	M	[Hg19]	19p13.2(7,070,410-7,599,470)x3	529,1 Kb	duplicazione	VOUS	ereditata	~75%
125	11767	M	[Hg19]	19p13.2p13.12(13,610,947-14,104,686)x1	494 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
126	12097	F	[Hg19]	19p13.3(786,550-1,243,743)x1	457.2 Kb	delezione	VOUS		~70%
127	5091	M	[Hg19]	20p12.1(14,577,123-14,698,179)x1	121,1Kb	delezione	VOUS		~70%
128	5521	F	[Hg18]	21q11.2(13,339,394-14,334,601)x3	995,2Kb	duplicazione	VOUS		~70%
129	5074	M	[Hg18]	21q21.1(18,972,397-19,338,032)x1	365,64 Kb	delezione	VOUS	ereditata	~65%
130	10823	M	[Hg19]	22q11.1(16,053,473-17,599,488)x	1,55 Mb	duplicazione	VOUS	ereditata	~80%
131	11635	M	[Hg19]	22q13.1q13.2(40,216,975-41,647,985)x3	1,43 Mb	duplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%

132	5237	F	[Hg18]	22q13.32q13.33 (47,981,771-49,525,130)x1	1,54Mb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
133	10368	F	[Hg19]	22q13.33(49,536,180-49,752,893)x1	216,7 Kb	delezione	VOUS		~75%
134	10185	F	[hg19]	Xp11.22(52,841,226-53,114,456)x3	273,23 Kb	uplicazione	VOUS		~80%
135	5490	F	[Hg18]	Xp11.3(46,327,733-47,006,514)x3	678,78 Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~70%
136	11893	F	[Hg19]	Xp21.1(32,108,274-32,155,457)x1	47,2 Kb	delezione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
137	12235	M	[Hg19]	Xp22.11(22,166,967-22,636,799)x2	470 Kb	delezione	VOUS		~70%
138	1174~9	M	[Hg1~9]	Xp22.11(23,803,622-24,001,54~9)x2	1~98Kb	delezione	VOUS	ereditata	~98% LCRs
139	11068	M	[Hg19]	Xp22.2(11,263,956-11,832,195)x2	568,2 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~70%
140	5496	F	[Hg18]	Xp22.2(13,647,273-13,745,090)x3	98Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~70%
141	4857	F	[Hg1~9]	Xp22.31 (6,263,325-8,032,120)x3	1.7Mb	uplicazione	VOUS	ereditata	~95% LCRs
142	12194	F	[Hg19]	Xp22.31(6,457,403-8,032,120)x3	1,57 Mb	uplicazione	VOUS		~95% LCRs
143	11154	F	[Hg1~9]	Xp22.31(6,457,403-8,032,120)x3	1.57Mb	uplicazione	VOUS	ereditata	~95% LCRs
144	10250	M	[Hg19]	Xp22.31(6,551,155-8,032,120)x3	1,5Mb	uplicazione	VOUS		~95% LCRs
145	10504	F	[Hg1~9]	Xp22.31(6,551,155-8,032,120)x3	1,48 Mb	uplicazione	VOUS	ereditata	~95% LCRs
146	10227	F	[Hg19]	Xp22.33(2,710,316-2,877,475)x3	167,2Kb	uplicazione	VOUS	<i>de novo</i>	~75%
147	11366	M	[Hg19]	Xq12(67,220,810-67,333,098)x0	112,3 Kb	delezione	VOUS		~70%
148	12134	M	[Hg19]	Xq23(110,970,536-111,078,330)x2	107,8Kb	uplicazione	VOUS		~75%
149	10166	M	[Hg19]	Xq23(113,818,779-114,423,468)x2	605Kb	uplicazione	VOUS		~75%
150	12138	F	[Hg19]	Xq27.3(146,502,530-146,735,206)x3	232,7 Kb	uplicazione	VOUS		~99% LCRs

151	10430	F	[hg18]	Xq28(148,845,624-149,263,472)x3	418Kb	uplicazione	VOUS		~75%
152	11425	M	[Hg19]	Xq28(153,595,473-153,822,717)x2	227,2 Kb	uplicazione	VOUS	ereditata	~75%
153	11952	F	[hg19]	Xq28(154,003,449-154,133,297)x3	130Kb	uplicazione	VOUS		~80%
154	5480	M	[Hg18]	Yp11.2(6,470,058-10,143,~912)x0	3,67 Mb	delezione	VOUS	ereditata	~90% LCRs

Tabella 28: per ogni caso analizzato è riportata l'alterazione rilevata mediante array-CGH, le dimensioni, il tipo di anomalia, il significato clinico, il pattern di ereditarietà e la presenza di omologia

	Caso	Sesso	Hg	Risultato	Dimensioni	delezione / duplicazione	interpretazione	pattern di ereditarietà	% omologia ai breakpoints
1	4467	F	[Hg19]	1p13.3(108,352,308-108,724,614)x3	372,3 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
2	5333	F	[Hg18]	1p21.2(100,961,344-101,276,170)x3	314,83 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
3	12147	M	[Hg19]	1p34.1(46,204,885-46,381,100)x3	176,2Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna		□80%
4	3352	M	[Hg19]	1p35.3(29,386,909-29,653,134)x1	266,23Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~70%
5	11424	M	[Hg19]	1p36.33(1,585,574-1,820,584)x3	235 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~80%
6	11433	M	[Hg19]	1q42.3(235,468,659-235,952,100)x3	483,4 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~80%
7	10723	F	[Hg19]	2p21(45,645,486-45,909,179)x3	263,7 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
8	9987	M	[Hg18]	2p22.3(32,548,723-33,102,640)x3	554Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
9	11849	M	[Hg19]	3p26.2(3,587,164-3,837,951)x3	251 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~70%
10	5760	M	[Hg18]	3p26.2(4,329,703-4,658,836)x3	329Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
11	5145	M	[Hg18]	3p26.3(1,084,890-1,830,132)x3	745,24 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
12	10334	M	[Hg19]	3p26.3(515,652-1,109,949)x3	594,3 Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
13	4188	M	[Hg19]	3q26.2q26.31(170,619,221-171,033,169)x1	414 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~65%
14	11881	M	[Hg19]	4p14(39,942,183-40,067,247)x3	125,1Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
15	11801	F	[Hg19]	4p14(39,942,183-40,067,247)x3	125,1Kb	duplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%

16	4188	M	[Hg19]	4p16.3p16.2(3,519,883-4,544,455)x3	1,02 Mb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~75%
17	10849	F	[Hg19]	4q21.3(87,556,456-87,851,042)x3	295 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
18	11021	M	[Hg19]	4q28.2(130,005,133-130,140,426)x3	135,3 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
19	5808	F	[hg18]	4q28.2(130,005,133-130,140,426)x3	135,3 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
20	11646	M	[Hg19]	4q28.2q28.3(130,746,617-131,220,409)x1	473,8 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
21	12096	M	[Hg19]	5p14.3(21,173,362-21,451,776)x3	278,4 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~70%
22	11635	M	[Hg19]	5p15.2(12,464,932-12,699,724)x1	235 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
23	12151	M	[Hg19]	5p15.33(307,041-599,180)x3	292,1 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~70%
24	11525	F	[Hg19]	5p15.33(459,533-666,944)x3	207,4 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~70%
25	11525	F	[Hg19]	5p15.33(871,638-1,288,520)x3	416,9 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
26	11370	M	[Hg19]	7p15.2(27,132,601-27,298,410)x3	165,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
27	11510	F	[Hg19]	7q34(143,425,418-143,658,252)x1	232,8 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna		~90% LCRs
28	12195	M	[Hg19]	8p22(13,083,029-13,558,082)x3	475Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~70%
29	10991	M	[Hg19]	9p21.2(26,649,384-27,455,771)x3	806,4 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
30	4544	F	[Hg19]	9p22.1(19,324,347-19,550,179)x3	225,8Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~80%
31	4938	F	[Hg18]	9p24.1(8,207,768-8,699,809)x1	492Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
32	10078	F	[Hg18]	9q21.13(73,530,320-73,777,472)x1	247,2 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%

33	11568	M	[Hg19]	10p13(17,171,130-17,279,962)x3	108,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
34	12193	M	[Hg19]	10q25.1(106,411,883-106,611,508)x3	199,6Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
35	11646	M	[Hg19]	11p11.12(50,032,746-50,378,802)x3	346,1 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~97% LCRs
36	5686	M	[Hg18]	11p15.4(3,585,368 -3,690,082)x3	104,7 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
37	10289	F	[Hg18]	11q23.3(118,951,305-119,627,320)x3	676Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
38	12017	F	[Hg19]	12q12(40,139,689-40,452,621)x1	313 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
39	5073	M	[Hg18]	12q24.12(110,668,504-110,793,312)x3	124,81Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
40	3157	F	[Hg18]	12q24.12(110,668,504-110,793,312)x3	124,8Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~70%
41	11221	M	[Hg19]	12q24.12q24.13(112,184,121-112,308,929)x3	124,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
42	11817	M	[Hg19]	12q24.12q24.13(112,184,121-112,308,929)x3	124,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
43	11824	M	[Hg19]	13q21.1(57,872,497-58,206,132)x1	333,6Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~75%
44	5442	M	[Hg18]	14q21.1(38,035,964-38,087,272)x1	51,3Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
45	5074	M	[Hg18]	14q22.1(48,461,919-48,763,479)x1	301,56 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
46	11170	F	[Hg19]	14q24.3(78,164,467-78,389,247)x3	224,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
47	11850	M	[Hg19]	14q24.3(78,164,467-78,389,247)x3	224,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
48	4166	M	[hg19]	14q32.33(106,009,295-106,410,537)x3	401,2Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
49	5484	M	[Hg18]	15q13.3(29,803,656-30,298,155)x3	494,5 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~99% LCRs

50	11629	M	[Hg19]	15q21.1(47,333,806-47,477,559)x3	143,8Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
51	11517	F	[Hg19]	15q26.3(101,710,679-101,887,578)x3	176,8Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
52	5097/9309	F	[Hg18]	16p11.2p11.1(31,804,884-34,847,384)x1	3,04 Mb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~65%
53	4343	F	[Hg19]	16p11.2p11.1(34,967,717-35,755,512)x3	787,8 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
54	11493	M	[Hg19]	16p12.2(21,599,687-21,739,885)x1	140,2 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~99,5% LCRs
55	10452	F	[Hg19]	16p12.2(21,599,687-21,837,551)x1 .	238 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~99,5% LCRs
56	12011	F	[Hg19]	16p12.2(21,599,687-21,951,438)x1	351,8 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna		~99,5% LCRs
57	10172	M	[Hg18]	16p12.2p12.1(21,382,561-21,858,939)x1	476,4Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~99% LCRs
58	11828	F	[Hg19]	17q12(37,410,077-37,531,457)x3	121,4Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
59	11967	M	[Hg19]	17q12(37,417,040-37,531,457)x3	114,42 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
60	11724	F	[Hg19]	18p11.32(180,229-711,793)x3	532 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
61	5767	M	[Hg18]	18q22.1(61,786,269-63,364,951)x1	1,58Mb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
62	10915	M	[Hg19]	18q22.1(62,192,290-62,395,532)x3	203,24Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~75%
63	11737	F	[Hg19]	19q13.43(57,345,145-57,650,111)x3	305 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
64	5286	M	[Hg18]	20p11.23(18,115,715-18,440,898)x3	325,2Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
65	12110	F	[Hg19]	20p12.1(14,309,834-14,434,432)x1	124,6Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
66	4941	M	[Hg18]	20p13(4,307,012-4,660,362)x3	353Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~80%

67	5442	M	[Hg18]	21q21.1(22,649,005-22,733,606)x1	84,6 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
68	11865	M	[Hg19]	21q21.1q21.2(23,428,060-24,398,515)x1	970,5Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
69	11025	F	[Hg19]	21q21.1q21.2(23,927,167-24,549,622)x3	622,5 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~99% LCRs
70	11548	M	[Hg19]	21q21.3(27,980,329-28,433,055)x3	452,7 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
71	4512	F	[Hg19]	22q11.23(23,605,826-23,739,485)x3	133,7 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~97% LCRs
72	11013	M	[Hg19]	22q11.23(23,605,826-23,739,485)x3	133,7 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~97% LCRs
73	11276	M	[Hg19]	22q11.23(23,605,826-23,739,485)x3	133,6Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~98% LCRs
74	4815	M	[Hg19]	22q12.1(29,109,721-29,270,410)x1	162Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~80%
75	5227	F	[Hg18]	22q13.2(41,767,340-41,963,593)x3	196,25 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~70%
76	11370	M	[Hg19]	22q13.2(42,663,298-43,577,849)x3	914,6 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~75%
77	5066	M	[Hg18]	Xp11.23(47,756,715-47,871,543)x0	114,83Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~99% LCRs
78	10302	F	[Hg19]	Xp22.31(7,555,292-8,032,120)x3	477 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~95% LCRs
79	12182	F	[Hg19]	Xp22.31(7,744,132-8,115,153)x3	371Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~95% LCRs
80	10127	F	[Hg19]	Xq21.33(96,856,211-97,235,458)x3	379 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~70%
81	12193	M	[Hg19]	Xq22.3q23(108,281,482-108,786,323)x2	504,84 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~80%
82	10228	M	[Hg19]	Xq26.2(130,698,844-130,960,617)x2	262 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
83	11223	F	[Hg19]	Xq26.2(130,698,844-130,960,617)x3	261,77 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%

84	5086	M	[Hg18]	Xq26.3(136,599,595-137,456,288)x2 .	856,7 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
85	11473	M	[Hg19]	Xq27.1(138,645,477-138,923,240)x2	277,76 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~75%
86	4493	M	[Hg18]	Xq27.3(143,283,786-143,398,191)x0	114,4 Kb	delezione	VOUS verosimilmente benigna	<i>de novo</i>	~93% LCRs
87	5083	M	[Hg18]	Yq11.221 (16,571,138-16,735,237)x2	164,1 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna	ereditata	~65%
88	11434	M	[Hg19]	Yq11.223(23,748,707-24,512,049)x2	763,3 Kb	uplicazione	VOUS verosimilmente benigna		~98% LCRs

Tabella 29: per ogni caso analizzato è riportata l'alterazione rilevata mediante array-CGH, le dimensioni, il tipo di anomalia, il significato clinico, il pattern di ereditarietà e la presenza di omologia

7. BIBLIOGRAFIA

- Bailey, J. A., Z. Gu, R. A. Clark, K. Reinert, R. V. Samonte, S. Schwartz, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li and E. E. Eichler. "Recent Segmental Duplications in the Human Genome." *Science* 297, no. 5583 (2002): 1003-7.
- Bailey, J. A., A. M. Yavor, H. F. Massa, B. J. Trask and E. E. Eichler. "Segmental Duplications: Organization and Impact within the Current Human Genome Project Assembly." *Genome Res* 11, no. 6 (2001): 1005-17.
- Ballif, B. C., E. A. Rorem, K. Sundin, M. Lincicum, S. Gaskin, J. Coppinger, C. D. Kashork, L. G. Shaffer and B. A. Bejjani. "Detection of Low-Level Mosaicism by Array Cgh in Routine Diagnostic Specimens." *Am J Med Genet A* 140, no. 24 (2006): 2757-67.
- Callaway, J. L., S. Huang, E. Karampetsou and J. A. Crolla. "Perspective on the Technical Challenges Involved in the Implementation of Array-Cgh in Prenatal Diagnostic Testing." *Mol Biotechnol* 56, no. 4 (2014): 312-8.
- Carter, N. P. "Methods and Strategies for Analyzing Copy Number Variation Using Dna Microarrays." *Nat Genet* 39, no. 7 Suppl (2007): S16-21.
- Chen, J. M., D. N. Cooper, C. Férec, H. Kehrer-Sawatzki and G. P. Patrinos. "Genomic Rearrangements in Inherited Disease and Cancer." *Semin Cancer Biol* 20, no. 4 (2010): 222-33.
- Choi, B. O., N. K. Kim, S. W. Park, Y. S. Hyun, H. J. Jeon, J. H. Hwang and K. W. Chung. "Inheritance of Charcot-Marie-Tooth Disease 1a with Rare Nonrecurrent Genomic Rearrangement." *Neurogenetics* 12, no. 1 (2011): 51-8.
- Chong, W. W., I. F. Lo, S. T. Lam, C. C. Wang, H. M. Luk, T. Y. Leung and K. W. Choy. "Performance of Chromosomal Microarray for Patients with Intellectual Disabilities/Developmental Delay, Autism, and Multiple Congenital Anomalies in a Chinese Cohort." *Mol Cytogenet* 7, (2014): 34.
- Colnaghi, R., G. Carpenter, M. Volker and M. O'Driscoll. "The Consequences of Structural Genomic Alterations in Humans: Genomic Disorders, Genomic Instability and Cancer." *Semin Cell Dev Biol* 22, no. 8 (2011): 875-85.
- Conlin, L. K., B. D. Thiel, C. G. Bonnemann, L. Medne, L. M. Ernst, E. H. Zackai, M. A. Deardorff, I. D. Krantz, H. Hakonarson and N. B. Spinner. "Mechanisms of Mosaicism, Chimerism and Uniparental Disomy Identified by Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis." *Hum Mol Genet* 19, no. 7 (2010): 1263-75.

- Duclos, A., F. Charbonnier, P. Chambon, J. B. Latouche, A. Blavier, R. Redon, T. Frébourg and J. M. Flaman. "Pitfalls in the Use of Dgv for Cnv Interpretation." *Am J Med Genet A* 155A, no. 10 (2011): 2593-6.
- Emanuel, B. S. and S. C. Saitta. "From Microscopes to Microarrays: Dissecting Recurrent Chromosomal Rearrangements." *Nat Rev Genet* 8, no. 11 (2007): 869-83.
- Evangelidou, P., A. Alexandrou, M. Moutafi, M. Ioannides, P. Antoniou, G. Koumbaris, I. Kallikas, V. Velissariou, C. Sismani and P. C. Patsalis. "Implementation of High Resolution Whole Genome Array Cgh in the Prenatal Clinical Setting: Advantages, Challenges, and Review of the Literature." *Biomed Res Int* 2013, (2013): 346762.
- Feuk, L., C. R. Marshall, R. F. Wintle and S. W. Scherer. "Structural Variants: Changing the Landscape of Chromosomes and Design of Disease Studies." *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1, (2006): R57-66.
- Forment, J. V., A. Kaidi and S. P. Jackson. "Chromothripsis and Cancer: Causes and Consequences of Chromosome Shattering." *Nat Rev Cancer* 12, no. 10 (2012): 663-70.
- Galasso, C., A. Lo-Castro, N. El-Malhany and P. Curatolo. "'Idiopathic' Mental Retardation and New Chromosomal Abnormalities." *Ital J Pediatr* 36, (2010): 17.
- Ganesamoorthy, D., D. L. Bruno, G. McGillivray, F. Norris, S. M. White, S. Adroub, D. J. Amor, A. Yeung, R. Oertel, M. D. Pertile, C. Ngo, A. R. Arvaj, S. Walker, P. Charan, R. Palma-Dias, N. Woodrow and H. R. Slater. "Meeting the Challenge of Interpreting High-Resolution Single Nucleotide Polymorphism Array Data in Prenatal Diagnosis: Does Increased Diagnostic Power Outweigh the Dilemma of Rare Variants?" *BJOG* 120, no. 5 (2013): 594-606.
- Grayton, H. M., C. Fernandes, D. Rujescu and D. A. Collier. "Copy Number Variations in Neurodevelopmental Disorders." *Prog Neurobiol* 99, no. 1 (2012): 81-91.
- Gu, W., F. Zhang and J. R. Lupski. "Mechanisms for Human Genomic Rearrangements." *Pathogenetics* 1, no. 1 (2008): 4.
- Hillman, S. C., S. Pretlove, A. Coomarasamy, D. J. McMullan, E. V. Davison, E. R. Maher and M. D. Kilby. "Additional Information from Array Comparative Genomic Hybridization Technology over Conventional Karyotyping in Prenatal Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Ultrasound Obstet Gynecol* 37, no. 1 (2011): 6-14.
- Jones, M. J. and P. V. Jallepalli. "Chromothripsis: Chromosomes in Crisis." *Dev Cell* 23, no. 5 (2012): 908-17.

- K., Bruce R. "Genetica Umana." 2000.
- K., Bruce R. "Genetica Umana Dal Problema Clinico Ai Principi Fondamentali." 2001.
- Kan, A. S., E. T. Lau, W. F. Tang, S. S. Chan, S. C. Ding, K. Y. Chan, C. P. Lee, P. W. Hui, B. H. Chung, K. Y. Leung, T. Ma, W. C. Leung and M. H. Tang. "Whole-Genome Array Cgh Evaluation for Replacing Prenatal Karyotyping in Hong Kong." *PLoS One* 9, no. 2 (2014): e87988.
- Kearney, H. M., E. C. Thorland, K. K. Brown, F. Quintero-Rivera, S. T. South and Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. "American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Interpretation and Reporting of Postnatal Constitutional Copy Number Variants." *Genet Med* 13, no. 7 (2011): 680-5.
- Kloosterman, W. P., V. Guryev, M. van Roosmalen, K. J. Duran, E. de Bruijn, S. C. Bakker, T. Letteboer, B. van Nesselrooij, R. Hochstenbach, M. Poot and E. Cuppen. "Chromothripsis as a Mechanism Driving Complex *De novo* Structural Rearrangements in the Germline." *Hum Mol Genet* 20, no. 10 (2011): 1916-24.
- Kloosterman, W. P., M. Tavakoli-Yaraki, M. J. van Roosmalen, E. van Binsbergen, I. Renkens, K. Duran, L. Ballarati, S. Vergult, D. Giardino, K. Hansson, C. A. Ruivenkamp, M. Jager, A. van Haeringen, E. F. Ippel, T. Haaf, E. Passarge, R. Hochstenbach, B. Menten, L. Larizza, V. Guryev, M. Poot and E. Cuppen. "Constitutional Chromothripsis Rearrangements Involve Clustered Double-Stranded Dna Breaks and Nonhomologous Repair Mechanisms." *Cell Rep* 1, no. 6 (2012): 648-55.
- Lapierre, J. M., V. Cacheux, N. Collot, F. Da Silva, N. Hervy, D. Rivet, S. Romana, J. Wiss, B. Benzaken, A. Aurias and G. Tachdjian. "Comparison of Comparative Genomic Hybridization with Conventional Karyotype and Classical Fluorescence in Situ Hybridization for Prenatal and Postnatal Diagnosis of Unbalanced Chromosome Abnormalities." *Ann Genet* 41, no. 3 (1998): 133-40.
- Lee, C., A. J. Iafrate and A. R. Brothman. "Copy Number Variations and Clinical Cytogenetic Diagnosis of Constitutional Disorders." *Nat Genet* 39, no. 7 Suppl (2007): S48-54.
- Liang, J. S., K. Shimojima and T. Yamamoto. "Application of Array-Based Comparative Genome Hybridization in Children with Developmental Delay or Mental Retardation." *Pediatr Neonatol* 49, no. 6 (2008): 213-7.
- Lieber, M. R. "The Mechanism of Double-Strand Dna Break Repair by the Nonhomologous Dna End-Joining Pathway." *Annu Rev Biochem* 79, (2010): 181-211.

- Lieber, M. R., J. Gu, H. Lu, N. Shimazaki and A. G. Tsai. "Nonhomologous Dna End Joining (Nhej) and Chromosomal Translocations in Humans." *Subcell Biochem* 50, (2010): 279-96.
- Liu, P., A. Erez, S. C. Nagamani, S. U. Dhar, K. E. Kołodziejska, A. V. Dharmadhikari, M. L. Cooper, J. Wiszniewska, F. Zhang, M. A. Withers, C. A. Bacino, L. D. Campos-Acevedo, M. R. Delgado, D. Freedenberg, A. Garnica, T. A. Grebe, D. Hernández-Almaguer, L. Immken, S. R. Lalani, S. D. McLean, H. Northrup, F. Scaglia, L. Strathearn, P. Trapane, S. H. Kang, A. Patel, S. W. Cheung, P. J. Hastings, P. Stankiewicz, J. R. Lupski and W. Bi. "Chromosome Catastrophes Involve Replication Mechanisms Generating Complex Genomic Rearrangements." *Cell* 146, no. 6 (2011): 889-903.
- Lupski, J. R. "Genomic Disorders: Structural Features of the Genome Can Lead to Dna Rearrangements and Human Disease Traits." *Trends Genet* 14, no. 10 (1998): 417-22.
- Malhotra, D. and J. Sebat. "Cnvs: Harbingers of a Rare Variant Revolution in Psychiatric Genetics." *Cell* 148, no. 6 (2012): 1223-41.
- Mani, R. S. and A. M. Chinnaiyan. "Triggers for Genomic Rearrangements: Insights into Genomic, Cellular and Environmental Influences." *Nat Rev Genet* 11, no. 12 (2010): 819-29.
- Miller, D. T., M. P. Adam, S. Aradhya, L. G. Biesecker, A. R. Brothman, N. P. Carter, D. M. Church, J. A. Crolla, E. E. Eichler, C. J. Epstein, W. A. Faucett, L. Feuk, J. M. Friedman, A. Hamosh, L. Jackson, E. B. Kaminsky, K. Kok, I. D. Krantz, R. M. Kuhn, C. Lee, J. M. Ostell, C. Rosenberg, S. W. Scherer, N. B. Spinner, D. J. Stavropoulos, J. H. Tepperberg, E. C. Thorland, J. R. Vermeesch, D. J. Waggoner, M. S. Watson, C. L. Martin and D. H. Ledbetter. "Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies." *Am J Hum Genet* 86, no. 5 (2010): 749-64.
- Neill, N. J., B. S. Torchia, B. A. Bejjani, L. G. Shaffer and B. C. Ballif. "Comparative Analysis of Copy Number Detection by Whole-Genome Bac and Oligonucleotide Array Cgh." *Mol Cytogenet* 3, (2010): 11.
- Novelli, A., F. R. Grati, L. Ballarati, L. Bernardini, D. Bizzoco, L. Camurri, R. Casalone, L. Cardarelli, P. Cavalli, R. Ciccone, M. Clementi, L. Dalprà, M. Gentile, G. Gelli, P. Grammatico, M. Malacarne, A. M. Nardone, V. Pecile, G. Simoni, O. Zuffardi and D. Giardino. "Microarray Application in Prenatal Diagnosis: A Position Statement from the Cytogenetics Working Group of the Italian Society of Human Genetics (Sigu), November 2011." *Ultrasound Obstet Gynecol* 39, no. 4 (2012): 384-8.

- Oostlander, A. E., G. A. Meijer and B. Ylstra. "Microarray-Based Comparative Genomic Hybridization and Its Applications in Human Genetics." *Clin Genet* 66, no. 6 (2004): 488-95.
- Ostetrico-Ginecologica), SIGU (Società Italiana Genetica Umana) e SIEOG (Società Italiana di Ecografia. "Utilizzo Appropriato Delle Tecniche Di Cma (Chromosomal Microarrays Analysis) in Diagnosi Prenatale." 2014.
- Ottaviani, D., M. LeCain and D. Sheer. "The Role of Microhomology in Genomic Structural Variation." *Trends Genet* 30, no. 3 (2014): 85-94.
- Perry, G. H., A. Ben-Dor, A. Tsalenko, N. Sampas, L. Rodriguez-Revenge, C. W. Tran, A. Scheffer, I. Steinfeld, P. Tsang, N. A. Yamada, H. S. Park, J. I. Kim, J. S. Seo, Z. Yakhini, S. Laderman, L. Bruhn and C. Lee. "The Fine-Scale and Complex Architecture of Human Copy-Number Variation." *Am J Hum Genet* 82, no. 3 (2008): 685-95.
- Redon, R., S. Ishikawa, K. R. Fitch, L. Feuk, G. H. Perry, T. D. Andrews, H. Fiegler, M. H. Shapero, A. R. Carson, W. Chen, E. K. Cho, S. Dallaire, J. L. Freeman, J. R. Gonzalez, M. Gratacos, J. Huang, D. Kalaitzopoulos, D. Komura, J. R. MacDonald, C. R. Marshall, R. Mei, L. Montgomery, K. Nishimura, K. Okamura, F. Shen, M. J. Somerville, J. Tchinda, A. Valsesia, C. Woodwark, F. Yang, J. Zhang, T. Zerjal, L. Armengol, D. F. Conrad, X. Estivill, C. Tyler-Smith, N. P. Carter, H. Aburatani, C. Lee, K. W. Jones, S. W. Scherer and M. E. Hurles. "Global Variation in Copy Number in the Human Genome." *Nature* 444, no. 7118 (2006): 444-54.
- Reiter, L. T., P. J. Hastings, E. Nelis, P. De Jonghe, C. Van Broeckhoven and J. R. Lupski. "Human Meiotic Recombination Products Revealed by Sequencing a Hotspot for Homologous Strand Exchange in Multiple Hnpp Deletion Patients." *Am J Hum Genet* 62, no. 5 (1998): 1023-33.
- Riggs, E. R., L. Jackson, D. T. Miller and S. Van Vooren. "Phenotypic Information in Genomic Variant Databases Enhances Clinical Care and Research: The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium Experience." *Hum Mutat* 33, no. 5 (2012): 787-96.
- Riggs, E. R., K. E. Wain, D. Riethmaier, M. Savage, B. Smith-Packard, E. B. Kaminsky, H. L. Rehm, C. L. Martin, D. H. Ledbetter and W. A. Faucett. "Towards a Universal Clinical Genomics Database: The 2012 International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium Meeting." *Hum Mutat* 34, no. 6 (2013): 915-9.
- Riggs, E. R., K. E. Wain, D. Riethmaier, B. Smith-Packard, W. A. Faucett, N. Hoppman, E. C. Thorland, V. C. Patel and D. T. Miller. "Chromosomal Microarray Impacts Clinical Management." *Clin Genet* 85, no. 2 (2014): 147-53.
- Shaffer, L. G. and J. R. Lupski. "Molecular Mechanisms for Constitutional

- Chromosomal Rearrangements in Humans." *Annu Rev Genet* 34, (2000): 297-329.
- Sharp, A. J., D. P. Locke, S. D. McGrath, Z. Cheng, J. A. Bailey, R. U. Vallente, L. M. Pertz, R. A. Clark, S. Schwartz, R. Seagraves, V. V. Oseroff, D. G. Albertson, D. Pinkel and E. E. Eichler. "Segmental Duplications and Copy-Number Variation in the Human Genome." *Am J Hum Genet* 77, no. 1 (2005): 78-88.
- Sibbons, C., J. K. Morris, J. A. Crolla, P. A. Jacobs and N. S. Thomas. "De novo Deletions and Duplications Detected by Array Cgh: A Study of Parental Origin in Relation to Mechanisms of Formation and Size of Imbalance." *Eur J Hum Genet* 20, no. 2 (2012): 155-60.
- Stankiewicz, P. and J. R. Lupski. "Genome Architecture, Rearrangements and Genomic Disorders." *Trends Genet* 18, no. 2 (2002): 74-82.
- Stephens, P. J., C. D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G. R. Bignell, L. J. Mudie, E. D. Pleasance, K. W. Lau, D. Beare, L. A. Stebbings, S. McLaren, M. L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, M. A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N. P. Carter, L. A. Morsberger, C. Jacobuzio-Donahue, G. A. Follows, A. R. Green, A. M. Flanagan, M. R. Stratton, P. A. Futreal and P. J. Campbell. "Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event During Cancer Development." *Cell* 144, no. 1 (2011): 27-40.
- Valli, R., C. Marletta, B. Pressato, G. Montalbano, F. Lo Curto, F. Pasquali and E. Maserati. "Comparative Genomic Hybridization on Microarray (a-Cgh) in Constitutional and Acquired Mosaicism May Detect as Low as 8% Abnormal Cells." *Mol Cytogenet* 4, (2011): 13.
- Vermeesch, J. R., P. D. Brady, D. Sanlaville, K. Kok and R. J. Hastings. "Genome-Wide Arrays: Quality Criteria and Platforms to Be Used in Routine Diagnostics." *Hum Mutat* 33, no. 6 (2012): 906-15.
- Vermeesch, J. R., H. Fiegler, N. de Leeuw, K. Szuhai, J. Schoumans, R. Ciccone, F. Speleman, A. Rauch, J. Clayton-Smith, C. Van Ravenswaaij, D. Sanlaville, P. C. Patsalis, H. Firth, K. Devriendt and O. Zuffardi. "Guidelines for Molecular Karyotyping in Constitutional Genetic Diagnosis." *Eur J Hum Genet* 15, no. 11 (2007): 1105-14.
- Vulto-van Silfhout, A. T., J. Y. Hehir-Kwa, B. W. van Bon, J. H. Schuurs-Hoeijmakers, S. Meader, C. J. Hellebrekers, I. J. Thoonen, A. P. de Brouwer, H. G. Brunner, C. Webber, R. Pfundt, N. de Leeuw and B. B. de Vries. "Clinical Significance of De novo and Inherited Copy-Number Variation." *Hum Mutat* 34, no. 12 (2013): 1679-87.
- Waldman, A. S. and R. M. Liskay. "Dependence of Intrachromosomal Recombination in Mammalian Cells on Uninterrupted Homology." *Mol*

Cell Biol 8, no. 12 (1988): 5350-7.

Wapner, R. J., C. L. Martin, B. Levy, B. C. Ballif, C. M. Eng, J. M. Zachary, M. Savage, L. D. Platt, D. Saltzman, W. A. Grobman, S. Klugman, T. Scholl, J. L. Simpson, K. McCall, V. S. Aggarwal, B. Bunke, O. Nahum, A. Patel, A. N. Lamb, E. A. Thom, A. L. Beaudet, D. H. Ledbetter, L. G. Shaffer and L. Jackson. "Chromosomal Microarray Versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis." *N Engl J Med* 367, no. 23 (2012): 2175-84.

Weterings, E. and D. J. Chen. "The Endless Tale of Non-Homologous End-Joining." *Cell Res* 18, no. 1 (2008): 114-24.

Weterings, E. and D. C. van Gent. "The Mechanism of Non-Homologous End-Joining: A Synopsis of Synapsis." *DNA Repair (Amst)* 3, no. 11 (2004): 1425-35.

Zhang, F., M. Khajavi, A. M. Connolly, C. F. Towne, S. D. Batish and J. R. Lupski. "The Dna Replication Fostes/Mmbir Mechanism Can Generate Genomic, Genic and Exonic Complex Rearrangements in Humans." *Nat Genet* 41, no. 7 (2009): 849-53.