

# Specific Array-CGH Design and Application in Skeletal Dysplasia

## İskelet Displazilerine Özgü Array-CGH Dizaynı ve Uygulaması

Aydın H, Kalaycı Yiğın A, Özdemir F, Seven M

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

### ABSTRACT

*Skeletal dysplasia (SD) and associated disorders classified 42 groups and 436 defined diseases. Totally 364 genes are associated with SD. The design of high-resolution array-CGH allows research to be done with advanced technology in the genetic diseases that still unknown etiology and molecular basis. The aim of this study was to design a new high-resolution arrayCGH microchip for skeletal dysplasias. To work; Eight patients who were admitted to Cerrahpaşa Medical Faculty, Medical Genetics Department, and diagnosed as skeletal dysplasia but had no known chromosomal abnormalities, any change that can be detected by routine molecular techniques or no metabolic cause were included. We designed a microarray slight containing 14127 probes for the intronic and exonic regions of the 226 SD genes and also the 44K Array-CGH probe group that is standardized by ISCA. Data obtained from these designed array-CGH slides were evaluated with the CytoGenomics program. The investigation by this method achieved 85% success in patients. We detected copy number changes in 7 out of 8 patients. The detected changes have the possibility of being candidate genes for related syndromes. We think that the designed microarray slight will be useful for re-identifying the criteria of SD and new subgroups and also describing the candidate genes of SD with unknown etiology.*

### ÖZET

*İskelet displazileri 42 ana gruba ayrılan 436 hastalıktan oluşmaktadır. Bu hastalıklar yaklaşık 364 genin bir veya birkaçı ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek rezolüsyonlu array-CGH dizaynı, etiyojisi ve moleküler temelleri iyi bilinmeyen genetik hastalıklarda, ileri teknolojik araştırmaların yapılmasına olanak sağlamaktadır.*

*Bu çalışma için iskelet displazilerine özgü yüksek rezolüsyonlu yeni bir arrayCGH mikroçip tasarlanması amaçlandı.*

*Çalışmaya; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran ve iskelet displazisi tanısı alan, ancak etiyojisinde bilinen herhangi bir kromozomal anomali, rutin moleküler tekniklerle tespit edilebilen bir değişim veya metabolik bir neden bulunamayan 8 hasta dahil edildi.*

*Tüm genom incelemesi için ISCA tarafından tasarlanan 44K array-CGH prob grubuna ilave olarak iskelet displazilerinde tanımlanan 226 gen bölgesine özgü, ekzonik ve intronik alanları da kapsayacak şekilde 14127 adet prob kullanarak yeni bir mikroçip dizayn edildi. Tasarlanan bu array-CGH slaytlarından elde edilen veriler CytoGenomics programıyla değerlendirildi. Hazırlanan mikroçiplerle incelenen hastalarda %85 oranında başarı sağlandı. Analiz edilen 8 hastanın 7'sinde anlamlı kopya sayısı değişikliği saptandı. Belirlenen bu değişikliklerin ilişkili sendromlar için aday genler olabileceği, bu tasarımın modifiye şekilleriyle iskelet displazisi tanı kriterlerinin yeniden belirlenebileceği, yeni alt tiplendirmelere yol gösterebileceği ve etiyojisi bilinmeyen displazilerin moleküler temellerinin açıklanmasına imkan sağlayabileceği düşünülmektedir.*

### Key Words:

*Skeletal Dysplasia,  
Array-CGH,  
Design of Microarray.*

### Anahtar Kelimeler:

*İskelet Displazisi,  
Array-CGH,  
Mikroarray Dizaynı.*

## GİRİŞ

İskelet displazisi (İD); kemik ve kıkırdığın şekil, boyut ve yoğunluk değişimini içeren; genetik nedenlerle ekstremiteler, göğüs, kafatası ve vertebra gibi iskeleti oluşturan yapıların anormal gelişimiyle karakterize heterojen bir hastalık grubudur (1). 3000 ila 6000'de 1 görüldüğü tahmin edilmekte ve perinatal ölümlerin %0,9'unun İD'lerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (2,3).

İD, Uluslararası İskelet displazisi Derneği (ISDS) tarafından klinik, moleküler, biyokimyasal ve/veya radyolojik kriterlere göre 436 hastalıktan oluşan 42 gruba ayrılmıştır. Bunlarla ilişkili bir veya birden fazla

genin içinde yer aldığı toplam 364 farklı gen tanımlanmıştır. Moleküler çalışmalarla belirlenen değişimler genellikle patojenik, olası patojenik, klinik önemi bilinmeyen ya da hastalığa neden olduğu bilinmeyen varyantlar olarak sınıflandırılmaktadır (4).

İnsan genom projesinin sağladığı gelişmeler sayesinde iskelet displazileri daha kolay anlaşılır hale gelmiştir. Gelişen teknoloji ile iskelet gelişimi, büyümesi ve devamını sağlayan çok sayıda genler ve yolaklar tanımlanmıştır. Genler ile klinik ve biyokimyasal sonuçlar arasında nasıl bir ilişki olduğunu tanımlayabilen temel moleküler mekanizmalar giderek daha fazla anlaşılmaktadır (5).

Received: 17.10.2019

Accepted: 24.10.2019

Correspondence: Prof. Dr. Mehmet Seven, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. Email: [mimseven@istanbul.edu.tr](mailto:mimseven@istanbul.edu.tr) Phone: +90 212 4143000-21304 Pbx: +90 212 4143184

Cite this article as: Aydın H, Kalaycı Yiğın A, Özdemir F, Seven M. Specific Array-CGH Design and Application in Skeletal Dysplasia. Phnx Med J. 2019;1(1):26-30.

Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH), submikroskopik DNA kopya sayısı değişikliklerini haritalama ve tespit olanağı sağlayan yüksek çözünürlükte gelişmiş bir teknolojidir. Array-CGH düzenli bir sıra ve boyutta yerleştirilen problemlerle genomdaki çok küçük değişimlerin tespitine imkan sağlamaktadır. Array-CGH, tasarım ve üretime bağlı olarak farklılık gösterirken, tüm genom analizlerine olanak sağlayabilen bir yöntemdir. Aday gen araştırmalarına da tartışılmaz katkılar sağlamaktadır. Array-CGH moleküler etiyojisi bilinmeyen bozukluklarda tüm genom incelemelerinde ilk basamak olarak kullanılabilir bir yöntemdir. Ayrıca moleküler etiyojisi bilinen hastalıklarda, ilgili genin nükleotid dizisi incelenmesine rağmen, herhangi bir değişiklik tespit edilemediği durumlarda da ilk basamak olarak kullanılabilir (6,7).

Bu çalışmada; İD ile ilgili olduğu düşünülen genomik bölgeleri yüksek rezolüsyonlu tek bir slaytta toplayarak hastalığın etiyojisinin belirlenmesine yönelik çalışmalara imkan sağlanması, embriyolojik olarak kemik ve kırıldak gelişiminde etkili olan genomik bölgelerin belirlenmesine katkıda bulunulması, heterojen ve dört yüzden fazla alt tipi belirlenmiş olan İD'li hastalarda olası mikrodelsiyon veya duplikasyon gibi yeniden düzenlenmelerin klinik bulgularla ilişkilendirilmesi ve İD'lerin alt tipleriyle ilişkili submikroskopik değişikliklerin tespiti durumunda bu hastalıkla ilişkili yeni genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL METOD

Çalışma grubu, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Polikliniğinde İD tanısı konularak izlenen hastalar arasından seçilerek oluşturuldu. Hasta grubuna etiyojisinde bilinen herhangi bir moleküler değişim bulunmayan vakalar dahil edildi. Çalışmaya alınacak hastalar, detaylı öykü, fizik muayene, radyolojik görüntülemeler, biyokimyasal ve metabolik testler ile moleküler analizler yapıldıktan sonra belirlendi. Bu hastalar arasından iskelet anomalisi olmayan veya bilinen genin incelenmesi tamamlanmayanlar ve İD içermeyip multipl konjenital anomalisi olanlar çalışma dışında bırakıldı.

Tüm İD'li hastalara karyotip analizi yapıldı. Herhangi bir kromozomal anomali saptanan hastalar ve doğumsal metabolik bozukluklara bağlı oluşan İD'li vakalar çalışmaya dahil edilmedi. Bu amaçla hastalara idrarda organik asit ve kanda amino asit analizi ile metabolik testler yapıldı. Değerlendirmeler sonucunda 6'sı erkek, 2'si kız olmak üzere toplam 8 hasta çalışıldı.

Tüm hasta ve ailelerinden bilgilendirilmiş onam alındı. Hastalardan örnek alım ve analiz çalışmalarına etik kurul onayı alındıktan sonra başlandı.

## İskelet Displazilerine Özgü Yüksek Rezolüsyonlu Array-CGH Tasarımı

ISDS tarafından İD ile ilişkilendirilmiş 226 gen bölgesiyle birlikte Uluslararası Sitogenetik Array Standardizasyon Grubu (ISCA) tarafından belirlenen kromozomal bölgelerin de incelenmesini sağlayabilecek şekilde tüm genomu tarayan, lokusa özgü tasarım olanağı sunan gelişmiş teknolojiler kullanılarak Array-CGH slayt tasarımı yapıldı. Yüksek özgüllükte eşleşmeye olanak sağlayan 60 mer problemler içeren, isteğe bağlı tasarım yapılmasına olanak sunan Agilent Inc. tarafından üretilen "SurePrint G3 Custom CGH, 8x60K" slaytı ile çalışma yapıldı. Prob dizaynı için [earray.chem.agilent.com/earray](http://earray.chem.agilent.com/earray) mikroarray programı kullanıldı. Programın kullanımımıza sunduğu problemler, ilgili lokusları kapsayan 200–500 bç aralığında olacak şekilde, yüksek rezolüsyonlu bir mikroçip üzerine yerleştirildi. Böylece hassas (zoom-in) incelemeye olanak sunan bir slayt hazırlanmış oldu. Analizde sinyal kirliliği oluşmaması ve değerlendirmenin güvenli aralıkta yapılabilmesi için prob yerleşimi, sinyal log<sub>2</sub> değeri -1 ve +1 aralığında olacak şekilde tasarlandı. İD için belirlenen 226 gen bölgesini incelemek amacıyla ilgili genlerin ekzonik ve intronik alanlarını kapsayan 14127 prob kullanıldı. ISCA'nın tanımladığı 44000 adet prob, incelediğimiz lokuslar dışında olabilecek kopya sayısı değişimlerini (CNV) yakalayabilmek amacıyla tüm genomu kapsayacak şekilde mikroçipe ilave edildi. Tarama cihazından elde edilen prob sinyallerini sağlıklı okuyabilmesi için sistem içinden bir normalizasyon ve 5 tekrarlık bir replikasyon grubu belirlenip tasarıma dahil edildi.

UCSC genome browser aracılığıyla, tasarladığımız problemlerin hem ilgili lokuslar hem de tüm genom üzerindeki dağılımı incelendi ve prob tasarımı konfirme edildi.

Sonuç olarak, tüm genomu taramaya uygun olan 44000 proba, İD ile ilgili 226 gene özgü 14127 prob eklenerek mikroçip tasarımı tamamlandı.

## DNA izolasyonu

DNA eldesi ticari DNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile gerçekleştirildi. Çalışma saflık değeri 1.7 – 1.85 arasında olan DNA örnekleriyle yapıldı.

## Array-CGH Uygulama Protokolu

Çalışma SurePrintG3 Human CGH Microarray Kit, 8x60K (Agilent Inc.) protokolundeki enzimatik yöntemle yapıldı. Enzimatik yöntemde DNA'da 200–500 bç'lik fragmanlar oluşturularak daha kolay hibridizasyon sağlanmaktadır. Çalışma protokolüne uygun şekilde sırayla enzim kesimi, işaretleme, işaretlemenin saflaştırılması, hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası yıkama yapıldı.

**Tablo 1:** Hastaların klinik, radyolojik ve laboratuvar bulguları

Olgu	Fizik Muayene Bulguları	Radyolojik Bulgular	Karyotip	Metabolik testler
1	Ekstremitelerde multipl şişlik, deformasyon, hemanjiomlar	Multipl enkondrom ve punktata lezyonlar,	46, XY	N
2	Frontal çöküklük, brakisefali, dismorfik yüz	Sintelensefali, wormian kemik veya split metopik sütün	46, XY	N
3	Ağır kifoskolyoz	Hemivertebral, rotoskolyoz,	46, XX	N
4	Dismorfik yüz, kısa boy, pektus karinatum	Horizontal asetabulum, metafizyel düzensizlik, skolyoz, vertebralarda yarıklanma, ileri kemik yaşı	46, XY	N
5	Dismorfik yüz, kısa boyun	Horizontal asetabulum, pelviste "İsveç anahtarı" femur başı, coxa vara, ileri kemik yaşı,	46, XX	N
6	Makrosefali, kısa boy, mezomelik kısıklık	Spondiler ve metafizer düzensizlik, mezomelik kısıklık, gecikmiş kemik yaşı	46, XY	N
7	Dismorfik yüz, aglossi, bifid uvula, adaktili, hafif MR	Metatarsal terminal ameli, adaktili	46, XY	N
8	Dismorfik yüz, korneal opasite	Platispondili, metafizyal düzensizlik, diafizyal şekil bozukluğu, femur başında düzleşme, asetabular çatıda silinme ve pelvis restriksiyonu, serebellar vermis hipoplazisi, serebellar molar diş işareti	46, XY	N

N: Normal

### Slaytların Taranması ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Slayt, yıkama sonrası tarama için, Agilent Nukleik Asit Tarayıcı'ya yerleştirildi. Okuma profili Agilent G3 CGH 8x60K'a için ayarlandı. Analiz için elde edilen veriler Agilent CytoGenomics 1.5 programına Design dosyaları ile beraber yüklendi. Yapılan analizde amplifikasyon için temel olarak 0.4, delesyon için 0.6'nın üstü anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

#### Hastaların Bulguları

Çalışmaya, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Polikliniğinde takip edilen 2'si kız, 6'sı erkek olmak üzere, iskelet displazili toplam 8 hasta alındı. Kızların yaş ortalaması 16<sup>6/12</sup> yaş, erkek hastaların yaş ortalaması 11 yaş, tüm hastaların yaş ortalaması ise 12<sup>4/12</sup> yaş olarak hesaplandı. Hastaların en küçüğü 1<sup>6/12</sup> yaşında, en büyüğü ise 39 yaşındaydı. Her bir hastanın klinik ve laboratuvar bulgusunun bağımsız ve farklı olması nedeniyle olgular tek tek ele alınarak değerlendirildi (Tablo 1) ve örnek olarak olgu 1, 3 ve 4'e ait radyolojik bulgular Şekil 1'de sunuldu.

#### Array-CGH Bulguları

Çalışmada array-CGH protokolü uygulamasının ilk aşaması olan enzimatik kesim sonrası hasta ve referans DNA'larının jel görüntüleri kaydedildi.

Protokolün işaretleme aşamasından sonra DNA ve boya konsantrasyonları ölçümleri kullanılarak işaretleme değeri, spesifik aktivite ve ürün (yield) değerleri hesaplandı. Hesaplanan değerlerin hibridizasyon için uygun olduğuna karar verilerek çalışmaya devam edildi.

Array-CGH laboratuvar işlemleri bittikten sonra tüm olguların bir arada olduğu slayt görüntüsü ve her bir olgu için ayrı QC raporu elde edildi.

Veriler Cytogenomics 1.5 versiyonu ile analiz edildi. Maffucci sendromu tanılı 1'nolu olgunun 14q13.1 bölgesinde 302013 bç uzunluğunda 0.6 değerinde amplifikasyon, İD tanılı 3 nolu olgunun sırasıyla 3q28 ve 11q11 bölgesinde 3755 ve 82635 bç uzunluğunda -0.9 ve -3.4 değerinde delesyon, İD tanılı 4 nolu olgunun sırasıyla 8p11.22, 8q24.3, 18q22.3 ve Xq21.1 bölgesinde 127265, 137335, 464417 ve 268412 bç uzunluğunda 1.15, 1.01, 0.78 ve 0.79 değerinde



**Şekil 1:** a-b) 3 no'lu olgunun fizik ve vertebral BT'de skolyoz görünümü, c) 1 no'lu olgunun sağ el grafisinde enkondrom ve punktata d) 4 no'lu olgunun torako-vertebral grafisinde skolyoz görünümü.

**Tablo 2:** Olgularda submikroskobik değişiklik gösteren bölgeler ve özellikleri

Olgu	Lokalizasyon	Değişim Boyutu	Band	Prob	Del/Dup
1	chr14:34618387-34920399	302013	q13.1	5	0.604464
3	chr11:55368154-55450788	82,635	q11	3	-3,433067
3	chr3:189364173-189367927	3,755	q28	4	-0,930716
4	chr8:39258894-39386158	127,265	p11.22	3	1,157281
4	chr8:145811171-145948505	137,335	q24.3	3	1,013028
4	chr18:68784844-69249260	464,417	q22.3	7	0,785639
4	chrX:77395711-77664122	268,412	q21.1	5	0,791744
5	chr7:125343961-125669552	325,592	q31.33	5	-0,953419
5	chr7:143852973-144204173	351,201	q35	5	0,826954
6	chr8:39258894-39386158	127,265	p11.22	3	-5,718045
6	chr10:46984913-47590995	606,083	q11.22	5	0,837165
6	chr15:20686196-22173977	1,487,782	q11.1 - q11.2	3	1,118392
7	chr3:189364173-189367927	3,755	q28	4	-1,155009
8	chr1:247962269-248563836	601,568	q44	11	0,752796
8	chr2:242930600-243007359	76,760	q37.3	4	-0,974070
8	chr10:46984913-47590995	606,083	q11.22	5	0,903783

\* del: delesyon (kayıp); dup: duplikasyon, (artış)

2 no'lu olguda herhangi bir değişim tespit edilmediği için tabloda yer verilmemiştir.

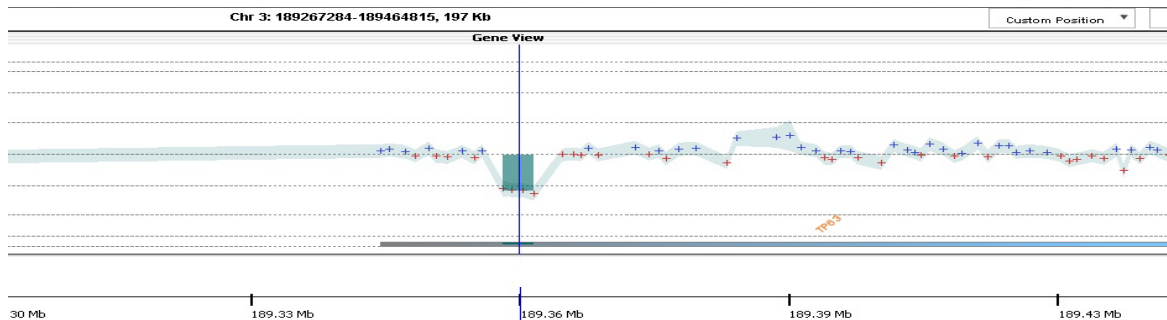
amplifikasyon, Desbuquois sendromu tanı 5'nolu olgunun 7q31.33 bölgesinde 325592 bç uzunluğunda -0.95 değerinde delesyon ve 7q35 bölgesinde 351201 bç uzunluğunda 0.82 değerinde amplifikasyon, İD tanı 6 nolu olgunun 8p11.22 bölgesinde 127265 bç uzunluğunda -5.71 değerinde delesyon ve 10q11.22, 15q11.1-q11.2 bölgesinde 606083 ve 1487782 bç uzunluğunda 0.83 ve 1.11 değerinde amplifikasyon, Aglossi-adaktile Sendromu tanı 7 nolu olgunun 3q28bölgesinde 3755 bç uzunluğunda -1.15 değerinde delesyon (Şekil 2), Joubert sendromu + İD tanı 8 nolu olgunun sırayla 1q44 ve 10q11.22 bölgesinde 601568 ve 606083 bç uzunluğunda 0.75 ve 0.90 değerinde amplifikasyon, ayrıca 2q37.3 bölgesinde 76760 bç uzunluğunda -0.97 değerinde delesyon olduğu saptandı. 2 nolu olguda ise herhangi bir değişim tespit edilmedi. Analiz verileri Tablo 2'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

İD için ISDS tarafından sınıflama yapılmasına rağmen tanı kriterlerinin belirlenmesi oldukça zordur. İD'nde klinik ve radyolojik bulguların birbirine benzemesi

nedeniyle en sağlıklı bilgi moleküler tanı yöntemleriyle elde edilmektedir. İD'lerin çoğunda ilişkili genler tanımlanmış, ilişkisi bilinmeyen genlerle ilgili moleküler çalışmalara devam edilmektedir (4). Etiyolojisi bilinmeyen bu tip İD'leri için günümüzde tüm ekzom sekanslama (WES), klinik ekzom (CES) ve İD'lerine özgü gen panelleri yeni nesil dizileme (NGS) gibi gelişmiş yöntemlerle tanı konulmaya çalışılmaktadır (8).

Akondroplazi, Apert Sendromu gibi İD vakalarında tek nükleotid değişimleri rol oynarken, epifizyal displazi olgularında mikrodelesyon ve mikroduplikasyon gibi mutasyonlar hastalığa neden olabilmektedir (9, 10). Kopya sayısı varyasyonları (CNV) DNA'nın bazı bölgelerinin kopya sayısındaki polimorfik farklılıklardır. Bu değişiklikler, 1 kilobazdan 10'larca megabaza uzayabilen DNA bölgeleri olup, tüm genoma dağılmış halde bulunurlar. Patolojik kopya sayısı değişiklikleri ise delesyon veya duplikasyon şeklinde olabilmektedir. Yapısal varyasyonlar genelde birçok geni ve bu genlerin anlatımını düzenleyen bölgeleri etkileyebilir. Ayrıca genomun bazı bölgelerinde



**Şekil 2:** 7 no'lu olguda tespit edilen delesyon görüntüsü.

belirgin bir fenotipe yol açmadıkları gibi bazen de gen dozajını ve anlatımını olumsuz etkileyebilirler. Bu etkileşim sonucunda, tek başlarına ya da başka genetik ve çevresel faktörlerle birlikte hastalık nedeni olabilmektedirler (6,7,11).

El-Gharbawy AH ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kleidokranial dizostozis ve hipofosfatazyalı bir olguda *RUNX2* geninin nükleotid dizi analizinde herhangi bir değişim bulunamamış, yüksek rezolüsyonlu array-CGH analizinde ise *RUNX2* geninin C-terminal kısmında mikrodelesyon olduğu tespit edilmiştir (12). Bu çalışma etiyojisi bilinmeyen olgularda öncelikli olarak mikrodelesyon/mikroduplicasyon araştırılması gerektiğine ve tasarladığımız slaytın önemine işaret etmektedir.

Tasarlanan bu yeni mikroçip ile analiz edilen 8 hastanın 7'sinde patojenik, klinik önemi bilinmeyen ya

da hastalığa neden olduğu düşünülmeyen varyantlar tespit edildi. Bir hastada ise herhangi bir değişiklik tespit edilmedi. Elde ettiğimiz veriler ışığında, tüm genom ve lokusa özgü prob grubları içermesi nedeniyle yeni tasarladığımız array-CGH mikroçip, moleküler etiyojisi saptanamamış iskelet displazilerinde ilk basamak tarama yöntemi olarak kullanıma uygun hale getirildi. Bu çalışmada, elde edilen verilerle tasarladığımız bu yeni mikroçipin güvenli bir şekilde kullanılabileceği gösterildi.

Elde edilen sonuçlara göre literatürde “zoom-in” ya da “high resolution” array-CGH olarak da geçen bu lokusa özgü mikroçip tasarımının yeni nesil dizileme tekniklerinden önce maliyeti düşürmesi nedeniyle ön tarama yöntemi olarak hem araştırma hem de rutin amaçla kullanılabileceği düşünülmektedir.

#### Çıkar çatışması

Tüm yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

#### Teşekkür

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 15497.

#### KAYNAKLAR

1. Urist M.R., Fundamental and Clinical Bone Physiology, Philadelphia: J.B. Lippincott, 1980.
2. Rasmussen S.A., Bieber F.R., et al., Epidemiology of osteochondrodysplasias: changing trends due to advances in prenatal diagnosis. Am J Med Genet. 1996; 61: 49–58.
3. Doray B., Favre R., et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasia: A report of 47 cases. Ann Genet. 2000; 43: 163–169.
4. K. A. Geister and S. A. Camper, “Advances in skeletal dysplasia genetics,” Annual Review of Genomics and Human Genetics 2015; vol. 16, pp. 199–227.
5. Savarirayan R., Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002; 16 (3): 547–560.
6. Lupski J.R., Stankiewicz P., Genomic Disorders, The Genomic Basis of Disease. Humana Press, 2006; Part 27: 389-400.
7. Jao-Shwann L., Shimojima K., Yamamoto T., Application of Array-based Comparative Genome Hybridization in Children with Developmental Delay or Mental Retardation. Pediatr Neonatol., 2008; 49 (6): 213–217.
8. Sung Yoon Cho, Dong-Kyu Jin. Guidelines for genetic skeletal dysplasia for pediatricians. Ann Pediatr Endocrinol Metab 2015;20:187-191.
9. Francomano C.A., Achondroplasia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-1998 Oct 12 [updated 2006 Jan 09].
10. Kannu P., Oei P., Slater H.R., Khammy O., Aftimos S., Epiphyseal dysplasia and other skeletal anomalies in a patient with the 6p25 microdeletion syndrome. Am J Med Genet Part A 2006; 140A: 1955–1959.
11. Stevenson R.E., Hall J.G., Skeletal Dysplasia. In: Human Malformations and Related Anomalies., 2nd Eds, Chapter 22, 2006; 997-1020.
12. El-Gharbawy A.H., Peeden J.N., Lachman R.S., Graham J.M., Moore S.R., Rimoïn D.L., Severe cleidocranial dysplasia and hypophosphatasia in a child with microdeletion of the C-terminal region of *RUNX2*. Am J Med Genet A. 2010 Jan; 152A (1): 169-74.