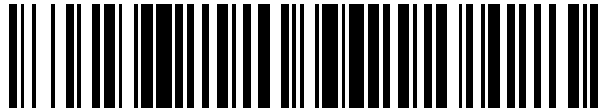


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 946**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 10760024 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2473626**

54 Título: **Método basado en matrices para detección de variaciones en el número de copias en el locus HLA para la determinación genética de susceptibilidad al desarrollo de malformaciones venosas en los segmentos extracraneales de las venas cefalorraquídeas y matriz del mismo**

30 Prioridad:

**01.09.2009 IT TO20090672**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.05.2014**

73 Titular/es:

**LONDON EQUITABLE LIMITED IN ITS CAPACITY  
AS TRUSTEE OF THE THINK TANK TRUST  
(100.0%)  
18c Curzon Street Mayfair  
London W1J 7SX, GB**

72 Inventor/es:

**ZAMBONI, PAOLO;  
FERLINI, ALESSANDRA y  
BOVOLENTA, MATTEO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 459 946 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método basado en matrices para detección de variaciones en el número de copias en el locus HLA para la determinación genética de susceptibilidad al desarrollo de malformaciones venosas en los segmentos extracraneales de las venas cefalorraquídeas y matriz del mismo

### Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a un método basado en matrices para la detección de variaciones en el número de copias en el locus HLA para la determinación genética de susceptibilidad al desarrollo de malformaciones venosas en los segmentos extracraneales de las venas cefalorraquídeas asociadas con la esclerosis múltiple. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico genético para la determinación del riesgo de correlación genotipo-fenotipo de desarrollo de malformaciones venosas asociadas con la esclerosis múltiple.

### Antecedentes de la invención

La esclerosis múltiple es la enfermedad neurológica más frecuente en la población adulta joven catalogada en trastornos neurodegenerativos de etiología desconocida. Se ha propuesto que causas inflamatorias, infecciosas, y autoinmunes tienen un papel patogénico en esta enfermedad, aunque la relación entre estos factores y la etiología de la enfermedad aún no se ha esclarecido.

Desde el punto de vista genético, estudios en gemelos y hermanos sugieren que los genes de susceptibilidad pueden desempeñar un papel en esta enfermedad. La esclerosis múltiple tiene, de hecho, un componente hereditario clínicamente significativo.

Se realizó un estudio de asociación del genoma completo con el fin de identificar alelos asociados con el riesgo de esclerosis múltiple [7]. Un ensayo de desequilibrio de transmisión de 334.923 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en 931 trios de la familia reveló 49 SNP que tienen una asociación con la esclerosis múltiple. Los alelos de IL2RA e IL7RA y aquellos en el locus HLA se identifican como factores de riesgo hereditarios para la esclerosis múltiple. Sin embargo, la detección de los loci de susceptibilidad es un punto de partida importante, pero no aclara cuáles son exactamente los genes implicados en la transmisión de la enfermedad y a través de qué mecanismos moleculares. Además, no se ha demostrado una correlación entre variación del genotipo y fenómenos de fenotipo. Por dicha razón, es necesario localizar con precisión los loci de susceptibilidad y también correlacionarlos con la función de los genes componentes.

Se han realizado estudios de genes candidatos y estudios de asociación de todo el genoma, así como la detección de variaciones en el número de copias (CNV) en matrices basadas en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que implican más de cien mil marcadores y se han identificado varios loci de susceptibilidad en el genoma humano, siendo el locus HLA en 6p21.32 el locus asociado con más seguridad [1-6]. Se han descrito algunos otros loci de susceptibilidad posibles, aunque de significación estadística incierta [7,8].

Cuando se usan matrices basadas en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) e incluso cuando los controles se asignan al azar con precisión, se pueden producir errores indetectables vinculados especialmente a los orígenes geográficos de la población, a las diferencias conocidas en la densidad de los SNP, que dependen de los diferentes cromosomas humanos o incluso de regiones genómicas implicadas. Estos errores pueden engrosar las diferencias aparentemente significativas entre pacientes y controles (inflación genómica) que generan falsos positivos o falsos negativos, y que finalmente dificultan un verdadero reconocimiento de los loci asociados [8].

Con el fin de superar este problema "potencial", se tiene que analizar un número enorme de individuos tal como lo recomienda el Wellcome Trust Case Control Consortium y tal como se informó recientemente [8], para obtener datos imparciales y para replicar las asociaciones en los loci identificados. Sin embargo, los propios Autores concluyen que se requieren estudios funcionales.

### Sumario de la invención

Por lo tanto, teniendo en cuenta estas premisas, se siente la necesidad de mejores soluciones que permitan una detección fiable de factores de predisposición genética de los pacientes para el desarrollo de malformaciones venosas asociadas con la esclerosis múltiple.

El objetivo de la presente divulgación es proporcionar dichas soluciones mejoradas.

De acuerdo con la invención, el objetivo anterior se consigue gracias a la materia objeto recordada específicamente en las reivindicaciones siguientes, que se entiende que forman una parte fundamental de la presente divulgación.

Una realización de la presente divulgación proporciona un método para el diagnóstico *in vitro* del riesgo de desarrollo de al menos una malformación venosa cefalorraquídea extracraneal en un paciente, que comprende la etapa de detectar el número global de variaciones en el número de copias extragénicas (CNV) en el locus HLA-DRA del cromosoma 6p21, en el que el número de CNV extragénicas se correlaciona con dicho riesgo.

La presente divulgación desvela un kit para realizar dicho método de diagnóstico. Más específicamente, el kit comprende sondas de CGH que cubren la región del locus HLA-DRA para la detección de las CNV en el cromosoma 6p21 en el ADN genómico de los pacientes.

Una realización adicional de la presente divulgación se refiere a una matriz de CGH que cubre totalmente la región del locus HLA-DRA para ver la detección de las CNV en el cromosoma 6p21 en el ADN genómico de los pacientes.

Los datos que se desvelan en el presente documento demuestran una correlación significativa entre el número de CNV encontradas en la región de HLA-DRA y el número de malformaciones venosas, más específicamente de malformaciones venosas cefalorraquídeas crónicas, identificadas en los pacientes. La presente divulgación demuestra que el número de CNV polimórficas múltiples identificadas en el locus HLA son determinantes implicados posiblemente en la manifestación fenotípica para esta nueva asociación de malformaciones venosas/esclerosis múltiple.

### Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas de los dibujos, en las que:

- **Figuras 1A y 1B:** Distribución genómica de las CNV Conocidas entre los pacientes estudiados a lo largo del locus HLA-DRA. En el gráfico se indica el nucleótido de partida para cada CNV. En color blanco se resaltan las regiones de los genes de HLA.
- **Figura 2:** Ejemplificación de malformación venosa estenosante asociada con MS. A) Estenosis significativa (flecha) de la vena yugular interna izquierda (L IJV). B) Obstrucción membranosa de la salida de la vena Ácigos (o AZY) en la vena cava superior (SVC).
- **Figuras 3 a 5:** Análisis de regresión lineal. Una correlación significativa entre el número de CNV (figura 3), CNV intragénicas (figura 4) y CNV extragénicas (figura 5) y se encontró el número de malformaciones venosas detectadas por medio de venografía selectiva ( $r = 0,53$ ,  $r^2 = 0,28$ ,  $p < 0,05$ ).
- **Figura 6:** Número de CNV totales (A), intragénicas (B) y extragénicas (C) conocidas indicadas en la Base de datos de las Variantes Genómicas por paciente.
- **Figura 7:** Enlaces funcionales de los genes conocidos dentro de la red del locus HLA en trastornos de neurodegeneración, esclerosis múltiple e inmunidad (A) y angiogénesis y rutas de formación venosa (B).
- **Figura 8:** El perfil de CGH identificado en el paciente PF como ejemplo. La alteración múltiple del área del genoma es muy evidente.

### Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, se dan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión exhaustiva de las realizaciones. Las realizaciones se pueden poner en práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etc En otros casos, estructuras bien conocidas, materiales, u operaciones no se muestran ni se describen en detalle para evitar el oscurecimiento de aspectos de las realizaciones.

A lo largo de toda la presente memoria descriptiva, la referencia a "una realización" o "una realización" se refiere a que un elemento, estructura o característica determinados que se describen en conexión con la realización se incluye en al menos una realización. Por lo tanto, no todas las apariciones de las expresiones "en una realización" o "en una realización", en diversos lugares a lo largo toda la presente memoria descriptiva, se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los elementos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los títulos que se proporcionan en el presente documento son solamente por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones.

Para investigar la aparición de variaciones en el número de copias (CNV), subrayando desequilibrios en el genoma en el locus principal (HLA, cromosoma 6p21) asociado con la esclerosis múltiple (EM), los presentes inventores recurren a una matriz de hibridación genómica comparativa (CGH) con el fin de superar los errores inevitables asociados con las matrices basadas en los SNP.

En la actualidad está ampliamente reconocido que las variaciones en el número de copias (CNV) que por lo general varían de 1 kb a varios Mb contribuyen a las variaciones genéticas y a la susceptibilidad a enfermedades. Las CNV tienen en cuenta más variaciones de nucleótidos entre individuos; además, el significado funcional de las CNV podría ser más inmediato, especialmente para los situados dentro de los genes, regiones reguladoras o regiones

impresas conocidas, ya que la posible consecuencia del desequilibrio o desequilibrios en el genoma se pueden interpretar de una forma más directa.

5 La ventaja de buscar las CNV mediante la técnica de CGH es la posibilidad de correlacionar directamente las CNV validadas, conocidas con una función posible, ambas relacionadas con el gen específico sin equilibrar y con otras regiones genómicas con variaciones en copias. De hecho, el enfoque de CGH permite localizar con precisión las CNV identificadas en regiones no génicas, correlacionadas posiblemente con la función reguladora de genes, cambios epigenéticos u otras funciones no codificantes.

10 El desarrollo de plataformas de alto rendimiento robustas basadas en la hibridación genómica comparativa (CGH) capaz de identificar miles de variaciones genómicas ha mejorado en gran medida la investigación en esta dirección, tal como se ha demostrado recientemente en un trastorno neurodegenerativo importante, la esclerosis lateral amiotrófica, en la que parece que duplicados y supresiones microscópicas no polimórficas son frecuentes en casos esporádicos.

15 Los presentes inventores diseñaron una matriz de CGH específica del locus con el fin de explorar la aparición de las CNV en la región del locus HLA-DRA (6.899.999 bp; cromosoma 6p21: 29.900.001-36.800.000 pb) en 15 pacientes con la asociación peculiar de insuficiencia venosa cefalorraquídea crónica (CCSVI) y fenotipo de MS.

20 Los presentes inventores ya describieron la asociación peculiar de insuficiencia venosa cefalorraquídea crónica (CCSVI) en pacientes con Ms en el documento WO 2009 107 152. En la solicitud, los inventores demostraron que la CCSVI se debe a malformaciones venosas estenosantes (VM) que afectan a las venas álgicas y yugular, lo que conduce a anomalías significativas en la hemodinámica del flujo de salida venoso cerebral. El retorno venoso cerebral obstaculizado como consecuencia de las malformaciones venosas extracraneales es peculiar de MS, y no se encontró en varios pacientes afectados por otros trastornos neurodegenerativos, tales como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica.

25 En total, los pacientes mostraron 322 CNV de las cuales 225 eran extragénicas y 97 eran intragénicas. Los presentes inventores identificaron 234 CNV polimórficas conocidas en los 15 pacientes que tienen ese fenotipo "más" (es decir, fenotipo de VM-CCSVI y MS). En cuanto a la distribución de las CNV polimórficas identificadas en estos pacientes, los presentes inventores observaron un pico en el número de CNV dentro de la región de HLA. Fuera de esta región específica, sin embargo, el número de CNV por paciente sigue siendo elevado, aunque con una distribución variable.

30 Es de interés que el número total de CNV mostró una correlación con el número de VM estenosante tal como se demuestra por venografía en los segmentos extracraneales de las venas cefalorraquídeas, con una tendencia hacia la significación.

35 La contribución a la correlación se debe ciertamente a las CNV extragénicas, que están correlacionadas de forma significativa con el número de VM estenosante ( $r = 0,53$ ,  $r^2 = 0,28$ ,  $p < 0,05$ ).

Este resultado sugiere que la contribución de las CNV extragénicas en el desarrollo de la VM asociada está relacionada con su acción reguladora en el proceso de la angiogénesis.

40 La región estudiada contiene 211 genes conocidos. Usando la herramienta bioinformática funcional, los presentes inventores identifican muchos genes que interactúan en los circuitos tanto neurodegenerativos como de angiogénesis. En particular, HSPA1L, HSP1A y HSP1B y la red de genes HLADQ2 en ambas rutas. Las proteínas de choque térmico (HSP) representan un grupo de proteínas reguladoras implicadas en diversos procesos, que incluyen inmunidad y angiogénesis. En particular, la expresión de HSPA1L está modulada por el factor de transcripción de ETS1 y por SP100, un antígeno autoinmune nuclear. Es de interés que los genes regulados de forma negativa por ETS1 y regulados de forma positiva por SP100, tal como HSPA1L, tienen propiedades antimigratorias o antiangiogénicas.

45 MS tiene un componente hereditario principal muy bien conocido ya que su susceptibilidad está asociada con la región de MHC de clase II, especialmente los haplotipos HLA-DRB5\*0101-HLA-DRB1\*1501-HLA-DQA1\*0102-HLADQB1\*0602, que dominan la contribución genética al riesgo de MS [20]. Es interesante saber que HLADQA2 está implicado con enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T CD4(+) proinflamatorios, tales como MS y diabetes de tipo 1 [21]. CD4 también es un inhibidor muy bien conocido de la angiogénesis tumoral [22], lo que apoya de este modo una relación entre las dos rutas. La interpretación de la interacción entre rutas obviamente es compleja, pero sugiere relaciones biológicas y funcionales entre estos genes así como, curiosamente, entre angiogénesis e inmunidad.

50 En consonancia con el significado general de las CNV extragénicas, implicadas supuestamente en la regulación de la expresión genética, los presentes inventores descubrieron que este descubrimiento es interesante, ya que apoya la posibilidad de que el número de variaciones estructurales que aparecen dentro de las regiones reguladoras puede representar una susceptibilidad creciente en la "alteración" genómica para fenotipos de VM asociados con MS.

Con respecto a los genes candidatos específicos cuya expresión se podría ver alterada potencialmente por desequilibrios genómicos o "perturbaciones", el análisis de las rutas sugiere que los genes implicados en la angiogénesis y en la inmunidad son las proteínas más interesantes.

5

### Métodos

#### Sujetos

En el estudio entraron quince pacientes afectados por la evolución clínica de recaída-remisión de MS diagnosticada de acuerdo con los criterios revisados de Mc Donald tal como se desvela en [11]. Los presentes inventores determinaron la puntuación de la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) tal como se desvela en [12], así como la puntuación de la gravedad de la esclerosis múltiple (MS-SS) tal como se desvela en [13, 14].

La Escala Ampliada del Estado de Discapacidad de Kurtzke (EDSS) es un método para cuantificar la discapacidad en la esclerosis múltiple. La EDSS clasifica el nivel de discapacidad de una persona. Las puntuaciones de EDSS varían de 0-10, con las mayores puntuaciones indicando la discapacidad más grave. La MS-SS es una relación entre la EDSS y la duración de la enfermedad, siendo la evolución clínica de MS más agresiva de acuerdo con el tiempo en el que se ha alcanzado una determinada puntuación.

20

En la población actual, MS se asoció con la malformación venosa CCSVI documentada mediante un protocolo de venografía selectiva/Doppler en Color secuencial tal como se desvela en la solicitud de patente internacional N° PCT/IT2008/000129 así como en [9]. Las características clínicas y demográficas de los pacientes seleccionados se proporcionan en la Tabla 1. Los pacientes firmaron un consentimiento informado. La información detallada sobre cada uno de los 15 pacientes se proporciona en la tabla 2.

25

Tabla 1.

Parámetros	Recaída remisión de esclerosis múltiple nº 15 Media (IR)
Edad, años	36 (12)
Sexo M/F	7/8
Duración de la enfermedad, años	6 (9)
EDSS	1,5 (1)
MS-SS	2.6 (3,8)
Número de VM	2 (1)
CNV Totales	23 (13)

Tabla 2.

CÓDIGO DE PACIENTE	SEXO	EDAD	Nº DE VM	AÑOS DE DURACIÓN DE ENFERMEDAD MS	EDSS	MS-SS	Número de CNV
PB	F	36	2	15	7	8,17	8
RM	M	31	3	3	1,5	3,34	31
DD	M	46	4	3	2	4,82	39
GE	M	46	2	6	1	1,13	20
BL	M	40	3	14	1,5	1,03	18
CC	M	32	3	4	1	1,45	14
FR	M	46	3	12	1	0,64	22

PF	F	27	2	4	1	1,45	12
CM	F	46	2	15	4	5,09	23
MU	M	40	2	9	1	0,88	10
CF	F	30	2	5	1,5	2,6	29
HH	F	36	3	3	1,5	3,34	15
LS	F	25	4	3	2	4,82	20
VF	F	36	2	6	0,5	0,25	12
MC	F	37	2	3	1,5	3,34	52

El ADN de los 15 pacientes se extrajo con el protocolo recomendado por Agilent usando el Kit de Sangre y Tejido de DNeasy de. El ADN de los 15 pacientes se extrajo con el protocolo recomendado por Agilent. La calidad del ADN altamente concentrado se comprobó con un Nanodrop (relación 260/280 = 1,8 y relación 260/230 = 2,0). La integridad del ADN se evaluó en gel de agarosa a un 1 % en TBE 1X.

### Análisis Estadístico

Los datos clínicos se proporcionan como media e intervalo intercuartil. Las correlaciones genotipo-fenotipo se analizaron por medio de análisis de regresión lineal, incluyendo evaluación de la pendiente, Intercepción de X e Y, seguido de Ensayo de Ejecución. Se consideró que los valores de  $p < 0,05$  eran significativos.

### Diseño de micromatrices, hibridación y análisis de datos

El diseño de micromatrices de MS-CGH se realizó usando la versión 5.4 de la base de datos eArray de Agilent basada en la web (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) [16]. La función de búsqueda de aCGH de alta densidad dentro de eArray se usó para girar la región genómica de chr6: 29.900.001-36.800.000 (secuencia de referencia humana de marzo de 2006, Versión 36.1 del NCBI, hg18;) en un conjunto de sondas seleccionando el número máximo de sondas de CGH de oligonucleótidos 60mer exónicos, intrónicos e intragénicos disponibles en la base de datos. Este conjunto de sondas incluía 43102 sondas que se usaron para alcanzar el formato de matriz de 4 x 44 K, creando cuatro matrices de 44 K idénticas en una sola platina del microscopio para análisis simultáneo de cuatro muestras diferentes.

Esta plataforma denominada MS-CGH es una micromatriz de Alta Densidad con una resolución de una sonda cada 160 bp que permite la determinación rápida del perfil molecular que identifica la presencia de variaciones en el número de copias (CNV) en heterocigosis o en homocigosis en la región genómica estudiada.

El marcado y la hibridación se realizaron siguiendo los protocolos proporcionados por Agilent (CGH Basada en Matrices de Oligonucleótidos para el protocolo v5.0 de Análisis de ADN Genómico de Agilent) tal como se describe en [17]. En resumen, el ADN genómico de un control y de un paciente en la misma cantidad se digirieron con enzimas de restricción AluI y RsaI en tubos separados. Los fragmentos de ADN obtenidos de cada muestra se amplificaron en presencia de Cianina 3-dUTP (muestra de control) y Cianina 5-dUTP (muestra del paciente). Después de una etapa de purificación y de cuantificación de la incorporación de las Cianinas, las muestras se combinaron y se hibridaron en la micromatriz durante 17 horas a 65 °C.

La matriz se analizó con el escáner de Agilent y con el software de Extracción de Características (v9.1). Un resumen gráfico y el análisis de los datos se obtuvieron usando el software de análisis de ADN (v4.0.36). Para la identificación de duplicaciones y supresiones, los presentes inventores usaron la configuración convencional del análisis estadístico ADM-2 proporcionado por el software de análisis de ADN (Workbench genómico 5.0 de Agilent) disponible gratuitamente en el sitio web de Agilent Technologies.

De acuerdo con esta configuración y en el caso de los genes autosómicos, se visualizan supresiones heterocigóticas con valores de menos 1 y supresiones homocigóticas como infinito negativo (-4 en análisis de CGH). Los valores correspondientes para las duplicaciones heterocigóticas y homocigóticas son más 0,5 y más 1 respectivamente. Se necesitaron al menos 4 sondas no superpuestas consecutivas que alcanzan estos valores para una llamada positiva, junto con la ausencia de las SNP conocidas en la región cubierta por las sondas significativas. Todos los 15 pacientes se realizaron por duplicado en la matriz con el fin de proporcionar robustez y validez a los resultados.

### Análisis bioinformático de redes de genes

El análisis de rutas y la minería de la bibliografía se realizaron usando el software Pathway Studio de Ariadne Genomics Inc. La base de datos de Pathway Studio contiene millones de sucesos de regulación y de interacción a partir de todos los resúmenes de Pubmed y más de 350.000 artículos de texto completo extraídos mediante

tecnología de procesamiento del lenguaje natural MedScan. Los presentes inventores han usado la herramienta de navegación gráfica en Pathway Studio denominada "Build pathway" para encontrar evidencias de bibliografía que apoyen la asociación funcional de genes medidos con angiogénesis y otros procesos relacionados con la formación de vasos sanguíneos así como inmunidad y neurodegeneración.

5

**Resultados**

**Datos de CGH-MATRIZ**

10 Los presentes inventores identificaron 234 CNV polimórficas conocidas en los 15 pacientes por comparación con la base de datos de CNV [18]. Este descubrimiento confirmó que el locus HLA es altamente polimórfico en términos de desequilibrios genómicos tal como se esperaba considerando la alta densidad conocida de los SNP. La distribución de las CNV entre pacientes en términos tanto numéricos como de densidad de las mismas se muestra en las Figuras 1A y 1B.

15

La Tabla 3 indica todas las CNV identificadas en pacientes. Las CNV en la última columna de la tabla se identifican con el mismo número de catálogo de la Base de datos de Variantes Genómicas y se puede buscar en el Navegador del Genoma de la UCSC y en la Base de datos de Variantes Genómicas en sí misma. La Figura 8 informa sobre el perfil de CGH identificado en el paciente PF, como ejemplo.

20

**Tabla 3.**

Código del Paciente	Chr.	Inicio	Fin	genes	gs_hg18_CNV_20080404
BL	chr6	32536756	32766992		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_32789, CNV_31279, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791, CNV_23801, CNV_1709, CNV_32792, CNV_23802, CNV_6759, CNV_6761, CNV_32793, CNV_32794, CNV_7568, CNV_23283, CNV_32795, CNV_6764, CNV_32796, CNV_7569
BL	chr6	32564230	32565022		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31200, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
BL	chr6	32595206	32595421	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237
BL	chr6	32596430	32597048	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
BL	chr6	32600343	32605108	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
BL	chr6	32630548	32633760	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
BL	chr6	32644521	32654562	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32792

ES 2 459 946 T3

BL	chr6	32654143	32654521	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
BL	chr6	32668385	32668850		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
BL	chr6	32680250	32680644		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
BL	chr6	32712472	32712943		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
BL	chr6	32720046	32720535	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
BL	chr6	32720570	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
BL	chr6	32728265	32728541		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
BL	chr6	32728938	32731038		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
BL	chr6	32734749	32739935	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
BL	chr6	32786798	32787270		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_31281
BL	chr6	34425436	34426875	NUDT3	CNV_7572
CF	chr6	31387332	31418253		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758, CNV_23799
CF	chr6	32680250	32680644		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
CM	chr6	29929774	29935498		CNV_8209, CNV_3599
CM	chr6	30761724	30763025	KIAA1949	CNV_3600, CNV_31270
CM	chr6	31311983	31314021		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7561
CM	chr6	31384822	31392869		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758



ES 2 459 946 T3

CM	chr6	31390259	31390381		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10146
CM	chr6	31392907	31418253		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7564, CNV_32780, CNV_10146, CNV_23799
CM	chr6	31456523	31457088		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564
CM	chr6	31457088	31457425		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564
CM	chr6	31646140	31646463		CNV_2625
CM	chr6	32229423	32230350	PPT2	CNV_3602
CM	chr6	32506490	32506778		CNV_3603, CNV_4493
CM	chr6	32536756	32531232		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567
CM	chr6	32563017	32683706	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791, CNV_23801, CNV_1709, CNV_32792, CNV_23802, CNV_6759, CNV_6761
CM	chr6	32564230	32564724		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
CM	chr6	32596430	32597048	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
CM	chr6	32600343	32605108	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
CM	chr6	32672694	32673267		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
CM	chr6	32680250	32680644		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
CM	chr6	32737867	32739304	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
CM	chr6	32742604	32743626		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
CM	chr6	32767739	32772277		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_32797
CM	chr6	32784811	32785414		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_31281

ES 2 459 946 T3

CM	chr6	32786798	32786971		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_31281
CM	chr6	32799007	32799166		CNV_3603, CNV_32799
CM	chr6	35586239	35586376	TULP1	CNV_3607
CM	chr6	35702110	35704258	FKBP5	CNV_3607
CM	chr6	35761904	35762281	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
CM	chr6	35785199	35785703	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
CM	chr6	35870799	35870982	CLPS	CNV_3607, CNV_0286, CNV_31285, CNV_7575
CC	chr6	31191344	31191466	PSORS1C1	CNV_3601, CNV_8131
CC	chr6	32605201	32627687	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791, CNV_23801
CC	chr6	32680250	32680644		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
CC	chr6	32715940	32716099	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
CC	chr6	32723584	32723758		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
CC	chr6	32739728	32740502	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
CC	chr6	32763291	32763593		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7568
CC	chr6	32796711	32797255		CNV_3603, CNV_32799
CC	chr6	32799007	32799166		CNV_3603, CNV_32799
CC	chr6	32800626	32800785		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
CC	chr6	32800937	32801062		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
CC	chr6	32801490	32801789		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
CC	chr6	32977765	32979689		CNV_0076, CNV_3604
CC	chr6	35761943	35762129	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
DD	chr6	29962127	30021448		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_6756, CNV_6763, CNV_6760, CNV_6757, CNV_6765, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126, CNV_23797, CNV_6486, CNV_32777
DD	chr6	30053593	30053867	HLA-29.1	CNV_3599, CNV_2622, CNV_31269, CNV_4669
DD	chr6	30063205	30063591	HLA-29.1	CNV_3599, CNV_2622, CNV_31269, CNV_4669

ES 2 459 946 T3

DD	chr6	30761724	30763025	KIAA1949	CNV_3600, CNV_31270
DD	chr6	30844693	30845056		CNV_3600
DD	chr6	31157798	31159289		CNV_3601, CNV_31271
DD	chr6	31345211	31345844		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7561, CNV_31272, CNV_5387, CNV_8508, CNV_32779
DD	chr6	31360138	31361802		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5367, CNV_8508, CNV_5222, CNV_7562, CNV_2624, CNV_31279
DD	chr6	31387332	31392906		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758
DD	chr6	31393365	31418253		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7564, CNV_32780, CNV_10146, CNV_23799
DD	chr6	31457088	31457425		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564
DD	chr6	32229423	32230350	PPT2	CNV_3602
DD	chr6	32507789	32508030		CNV_3603, CNV_4493
DD	chr6	32563017	32733981	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791, CNV_23801, CNV_1709, CNV_32792, CNV_23802, CNV_6759, CNV_6761, CNV_32793, CNV_32794, CNV_7568, CNV_23283
DD	chr6	32564372	32564724		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
DD	chr6	32587915	32592942		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
DD	chr6	32591668	32592671		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
DD	chr6	32596475	32597048	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
DD	chr6	32600343	32605108	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791

ES 2 459 946 T3

DD	chr6	32658647	32659246	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
DD	chr6	32689971	32716235	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31290, CNV_4767, CNV_32793, CNV_32794, CNV_7568
DD	chr6	32699139	32699290		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
DD	chr6	32712472	32712943		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
DD	chr6	32718420	32731038	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
DD	chr6	32718654	32718952	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
DD	chr6	32719432	32720046	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
DD	chr6	32720611	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
DD	chr6	32723425	32728264		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
DD	chr6	32739094	32739774	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
DD	chr6	32761602	32762261		CNV_3603, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
DD	chr6	32763120	32763367		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7568
DD	chr6	32786798	32790418		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_31281
DD	chr6	32798813	32800626		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
DD	chr6	32810657	32810878		CNV_3603
DD	chr6	32817895	32818011	HLA-DQA2	CNV_7570
DD	chr6	33069396	33075621		CNV_0076, CNV_3604
DD	chr6	34773702	34779441		CNV_3605
DD	chr6	35761943	35762075	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
DD	chr6	35862999	35868527	C6orf127	CNV_3607, CNV_0286, CNV_31285, CNV_7515

ES 2 459 946 T3

FR	chr6	29962649	30017382		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558; CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_6756, CNV_6763, CNV_6760, CNV_6757, CNV_6765, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126, CNV_23797, CNV_6486
FR	chr6	31387332	31418253		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758, CNV_23799
FR	chr6	31457088	31457425		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564
FR	chr6	32563235	32740502	HLA-DRBS	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791, CNV_23801, CNV_1709, CNV_32792, CNV_23802, CNV_6759, CNV_6761, CNV_32793, CNV_32794, CNV_7568, CNV_23283
FR	chr6	32569230	32565022		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
FR	chr6	32590368	32592554		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
FR	chr6	32596475	32597048	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
FR	chr6	32599429	32600342	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
FR	chr6	32600917	32605108	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
FR	chr6	32630548	32631353	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
FR	chr6	32644521	32650183	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32792
FR	chr6	32680250	32680699		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767

ES 2 459 946 T3

FR	chr6	32712300	32712943		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
FR	chr6	32719305	32719932	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
FR	chr6	32720046	32720535	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568; CNV_23283
FR	chr6	32720570	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
FR	chr6	32728265	32728737		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
FR	chr6	32734749	32734935		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
FR	chr6	32743627	32744515		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
FR	chr6	32760501	32761273		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
FR	chr6	32786937	32787270		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_31281
FR	chr6	35761943	35762281	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
GE	chr6	29940096	30017382		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_23095, CNV_22632, CNV_23796, CNV_32776, CNV_4669, CNV_6756, CNV_6763, CNV_6760, CNV_6757, CNV_6765, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126, CNV_23797, CNV_6486
GE	chr6	29981807	29982868		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956
GE	chr6	31367445	31367910		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274

ES 2 459 946 T3

GE	chr6	31384717	31418029		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758, CNV_23799
GE	chr6	31390259	31390381		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10146
GE	chr6	31457088	31457425		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564
GE	chr6	32477682 32506490	32477991 32506778	BTNL2	CNV_7566 CNV_3603, CNV_4493
GE	chr6	32507919	32508030		CNV_3603, CNV_4493
GE	chr6	32563017	32744157	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791, CNV_23801, CNV_1709, CNV_32792, CNV_23802, CNV_6759, CNV_6761, CNV_32793, CNV_32794, CNV_7568, CNV_23283
GE	chr6	32587915	32592942		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
GE	chr6	32600917	32605108	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
GE	chr6	32658039	32659542	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
GE	chr6	32699503	32701186		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
GE	chr6	32718420	32723425	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
GE	chr6	32719432	32720268	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
GE	chr6	32720611	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
GE	chr6	32738284	32738429	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
GE	chr6	32739094	32739452	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568

ES 2 459 946 T3

GE	chr6	35761943	35762281	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
HH	chr6	31387332	31418253		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758, CNV_23799
LS	chr6	31387332	31392974		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758
LS	chr6	32563017	32563369		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237
MU	chr6	29995047	29998209		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126
MU	chr6	32600917	32604580	HLA-DRB5	CHV_3603, CNV_9493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
MU	chr6	32605201	32628505	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791, CNV_23801
MU	chr6	32664486	32667076	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
MU	chr6	32700842	32700989		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
MU	chr6	32711745	32712127		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32794, CNV_7568
MU	chr6	32760784	32761389		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
MU	chr6	32763120	32763593		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7568
MU	chr6	32798352	32802221		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
MU	chr6	35761943	35762281	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286



ES 2 459 946 T3

MC	chr6	29950578	30017155		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_23095, CNV_22632, CNV_23796, CNV_32776, CNV_4669, CNV_6756, CNV_6763, CNV_6760, CNV_6757, CNV_6765, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126, CNV_23797, CNV_6486
MC	chr6	29982195	29982333		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956
MC	chr6	29985562	30001164		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126
MC	chr6	29985909	29986570		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956
MC	chr6	29988968	29994086		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126
MC	chr6	30006771	30010434		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956, CNV_23797, CNV_6486
MC	chr6	31387332	31418029		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145, CNV_10146, CNV_6758, CNV_23799
MC	chr6	32563017	32567703		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
MC	chr6	32564548	32565176		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
MC	chr6	32587803	32588104		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
MC	chr6	32605201	32605946	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791

ES 2 459 946 T3

MC	chr6	32667923	32668136		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
MC	chr6	32668136	32668384		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
MC	chr6	32703944	32707105		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
MC	chr6	32711745	32712681		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32794, CNV_7568
MC	chr6	32720611	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
MC	chr6	32728386	32728737		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
MC	chr6	32739606	32740000	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
PF	chr6	30006771	30010434		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_9031, CNV_7956, CNV_23797, CNV_6486
PF	chr6	31384822	31386601		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_2624, CNV_31274, CNV_7563, CNV_7564, CNV_32780, CNV_1708, CNV_10145
PF	chr6	31457088 32506490	31457425 32506778		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564, CNV_3603, CNV_4493
PF	chr6	32600343	32605108	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
PF	chr6	32680250	32680644		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
PF	chr6	32717273	32717335	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
PF	chr6	32799007	32799166		CNV_3603, CNV_32799
PF	chr6	32800937	32801062		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
PF	chr6	32801490	32801789		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
PF	chr6	35586239	35586376	TULP1	CNV_3607
PF	chr6	35761943	35762281	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
PB	chr6	31456117	31456849		CNV_3601, CNV_8131, CNV_7564

ES 2 459 946 T3

PB	chr6	32563017	32605362	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791
PB	chr6	32593105	32598770	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
PB	chr6	32596367	32597048	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
PB	chr6	32667923	32668384		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
PB	chr6	32694846	32696612		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
PB	chr6	32737298	32739452	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
PB	chr6	32741720	32741876	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
RM	chr6	29962127	30017382		CNV_8209, CNV_3599, CNV_7558, CNV_2622, CNV_9032, CNV_31269, CNV_32776, CNV_4669, CNV_6756, CNV_6763, CNV_6760, CNV_6757, CNV_6765, CNV_9031, CNV_7956, CNV_1124, CNV_1126, CNV_23797, CNV_6486
RM	chr6	30761842	30763025	KIAA1949	CNV_3600, CNV_31270
RM	chr6	31361260	31361802		CNV_3601, CNV_8131, CNV_5387, CNV_8508, CNV_5222, CNV_7562, CNV_2624, CNV_31274
RM	chr6	32226417	32226779	PRRT1	CNV_3602
RM	chr6	32229121	32230350	PPT2	CNV_3602
RM	chr6	32260717	32261345	PBX2	CNV_3602
RM	chr6	32507870	32508030		CNV_3603, CNV_4493
RM	chr6	32536756	32537232		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567

ES 2 459 946 T3

RM	chr6	32563017	32763367	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790, CNV_32791, CNV_23801, CNV_1709, CNV_32792, CNV-23802, CNV_6759, CNV_6761, CNV_32793, CNV_32794, CNV_7568, CNV_23283, CNV_32795, CNV_6764
RM	chr6	32563017	32592942		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
RM	chr6	32564010	32564512		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
RM	chr6	32587915	32588033		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
RM	chr6	32596475	32597048	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
RM	chr6	32600343	32605946	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
RM	chr6	32613338	32627232	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
RM	chr6	32667923	32668136		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
RM	chr6	32679817	32680250		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
RM	chr6	32682524	32683273		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_6759, CNV_6761
RM	chr6	32693553	32703913	32703913	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
RM	chr6	32702660	32702818		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
RM	chr6	32703944	32707105		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
RM	chr6	32719403	32719774	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
RM	chr6	32720611	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283

RM	chr6	32728265	32731038		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
RM	chr6	32733982	32759283	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_32795, CNV_6764
RM	chr6	32735643	32735978	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
RM	chr6	32739094	32739452	HLA-DQB1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568
RM	chr6	32786937	32790418		CNV_3603, CNV_4767, CNV_7569, CNV_31281
RM	chr6	32798570	32801825		CNV_3603, CNV_32799, CNV_31282
RM	chr6	35761943	35762281	FKBP5	CNV_3607, CNV_0286
RM	chr6	35862999	35868527	C6orf127	CNV_3607, CNV_0286, CNV_31285, CNV_7575
VF	chr6	32563017	32588104		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
VF	chr6	32564548	32565176		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32790
VF	chr6	32605201	32605362	HLA-DRB5	CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_23237, CNV_32791
VF	chr6	32667923	32668136		CNV_3603, CNV_4493, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767
VF	chr6	32703944	32707105		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32793
VF	chr6	32711745	32712943		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_32794, CNV_7568
VF	chr6	32720611	32721540	HLA-DQA1	CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283
VF	chr6	32728265	32728737		CNV_3603, CNV_7567, CNV_31280, CNV_4767, CNV_7568, CNV_23283

**Correlación de genotipo-fenotipo: análisis estadístico**

- 5 Los presentes inventores correlacionaron el número de las CNV, con los parámetros clínicos de los pacientes (Figura 2, panel superior, Tabla 1). Para el número sobredimensionado de las CNV que afectan significativamente al Intercepto de X e Y, Pendiente y Ensayo de Ejecución, los presentes inventores excluyeron del análisis de regresión lineal al paciente codificado como MC (52 CNV frente a la media (IR) 23 (13) de nuestra población de pacientes, Tabla 1).
- 10 El análisis de regresión lineal demostró que el número global de las CNV se correlaciona con el número de VM extracraneal por venografía de los segmentos extracraneales de las venas cefalorraquídeas, con una tendencia

hacia la significancia ( $r = 0,52$ ,  $r^2 = 0,27$ ,  $p = 0,0545$ ) (panel A de la Figura 3 y de la Figura 6). Al dividir el análisis que correlaciona las CNV extragénicas (panel C de la Figura 5 y de la Figura 6) o las CNV intragénicas (panel B de la Figura 4 y de la Figura 6) con la VM extracraneal, los presentes inventores encontraron una correlación robusta y significativa con la anterior ( $r = 0,53$ ,  $r^2 = 0,28$ ,  $p < 0,05$ ).

### Rutas y análisis bioinformático funcional de la red de genes

Los 211 genes están contenidos dentro de la región que los presentes inventores cubrieron con la presente matriz de CGH.

Dado que el fenotipo de enfoque se caracteriza por esclerosis múltiple y malformación venosa, los presentes inventores aplicaron una herramienta bioinformática para seleccionar genes conocidos por estar implicados en la angiogénesis y en el desarrollo venoso, así como relacionados con esclerosis múltiple, inmunidad y neurodegeneración. De forma interesante, algunos genes están relacionados con estos procesos. HSPA1L y HSPA1A están relacionados con MS y diabetes y otros trastornos de inmunidad, y funciones reguladoras de remodelación de cromatina, neuroprotección, plegamiento de proteínas, y herramientas regenerativas-degenerativas como neurodegeneración, toxicidad neuronal, supervivencia celular, neuroprotección, transmisión sináptica o incluso factores de envejecimiento (senescencia y mantenimiento de telómeros). Además, parece que el gen GRM4 interactúa con muchas proteínas relacionadas con MS (Figura 7A). Centrándose en rutas funcionales específicas, como la angiogénesis, considerando evidentemente el fenotipo positivo de los pacientes presentes (malformación venosa) los presentes inventores obtuvieron un rompecabezas de interacciones más selectivo (Figura 7B). Los genes GRB2 y HSPA1A y B genes actúan directamente sobre el angiogénesis, se sabe que TAF11 está implicado en el paso arterial y el factor de transcripción de E2F1 se sabe que es un inductor positivo de la angiogénesis en la hepatitis y en el cáncer. De forma interesante, HLA-DQA2 también puede estar implicado en la angiogénesis por interacción con CD4.

La correlación encontrada entre genotipo (CNV) y genotipo (VM/CCSVI) está apoyada adicionalmente por las funciones reguladoras que se han indicado anteriormente en el proceso angiogénico. Las CNV tanto extragénicas como intragénicas con interacción conocida en la angiogénesis humana apoyan la hipótesis de que las variantes genéticas identificadas pueden determinar la desregulación en el proceso embrionario de la angiogénesis venosa, lo que conduce posiblemente al desarrollo de VM. A su vez, VM crea con el tiempo un estado conocido como CCSVI que está fuertemente asociado con MS.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Comabella M, et al. PLoS One 2008; 3:e3490.
2. Ramagopalan SV, et al. BMC Med Genet 2009; 10: 10.
3. Chao MJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 13069-74.
4. Aulchenko YS, et al. Nat Genet. 2008; 40: 1402-3.
5. Cronin S, et al. Hum Mol Genet. 2008; 17: 3392-8.
6. Blauw HM, et al. Lancet Neurol. 2008; 7: 319-26.
7. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, et al. N Engl J Med. 2007; 357: 851-62.
8. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Lancet Neurol. 2008; 7: 567-9.
9. Zamboni P, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009; 80: 392-9.
10. Zamboni P, et al. J Neurol Sci. 2009; 282: 21-7.
11. Polman CH, et al. Ann Neurol. 2005; 58: 840-6.
12. Kurtzke JF. Neurology. 1983; 33: 1444-52.
13. Roxburgh RH, et al. Neurology. 2005; 64: 1144-51.
14. Pachner AR, Steiner I. J Neurol Sci. 2009; 278: 66-70.
15. Menegatti E, Zamboni P. Curr. Neurovasc. Res. 2008; 5: 260-5.
16. Agilent Technologies eArray [<https://earray.chem.agilent.com/earray>]
17. Bovolenta M, et al. BMC genomics. 2008, 9: 572.
18. Base de datos de Variantes Genómicas [<http://projects.tcag.ca/variation>]
19. Singh AV, Zamboni P. J Cer Blood Flow Met 2009
20. Lincoln MR, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106 (18): 7542-7.
21. Podojil JR, Miller SD. Immunol Rev. 2009; 229 (1): 337-55.
22. Wieder T, et al. Cell Cycle. 2008; 7 (19): 2974-7.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para el diagnóstico *in vitro* de un riesgo de desarrollar al menos una malformación venosa cefalorraquídea extracraneal en un paciente, comprendiendo dicho método detectar el número global de variaciones en el número de copias extragénicas (CNV) en el locus HLA-DRA del cromosoma 6p21.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha detección se realiza en una muestra de ADN genómico de dicho paciente.
- 10 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha detección de dichas variaciones en el número de copias en el cromosoma 6p21 se realiza usando un método de CGH, un método de matriz de CGH o una matriz basada en polimorfismos de un solo nucleótido.
- 15 4. Matriz de CGH del locus HLA-DRA del cromosoma 6p21, en la que dicha matriz comprende un soporte sólido y una pluralidad de sondas de oligonucleótidos que cubren el locus HLA-DRA del cromosoma 6p21, en la que dichas sondas están relacionadas con dicho soporte sólido, y en la que dicha pluralidad de sondas de oligonucleótidos tiene una resolución de una sonda cada 160 bp de la secuencia de nucleótidos del locus HLA-DRA del cromosoma 6p21 y dichas sondas de oligonucleótidos son oligonucleótidos 60mer.
- 20 5. Matriz de CGH de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha pluralidad de sondas de oligonucleótidos comprende 43102 sondas.
- 25 6. Matriz de CGH de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que dicha matriz tiene un formato de 4 x 44 K.

Distribución de las CNV conocidas por paciente - parte 1

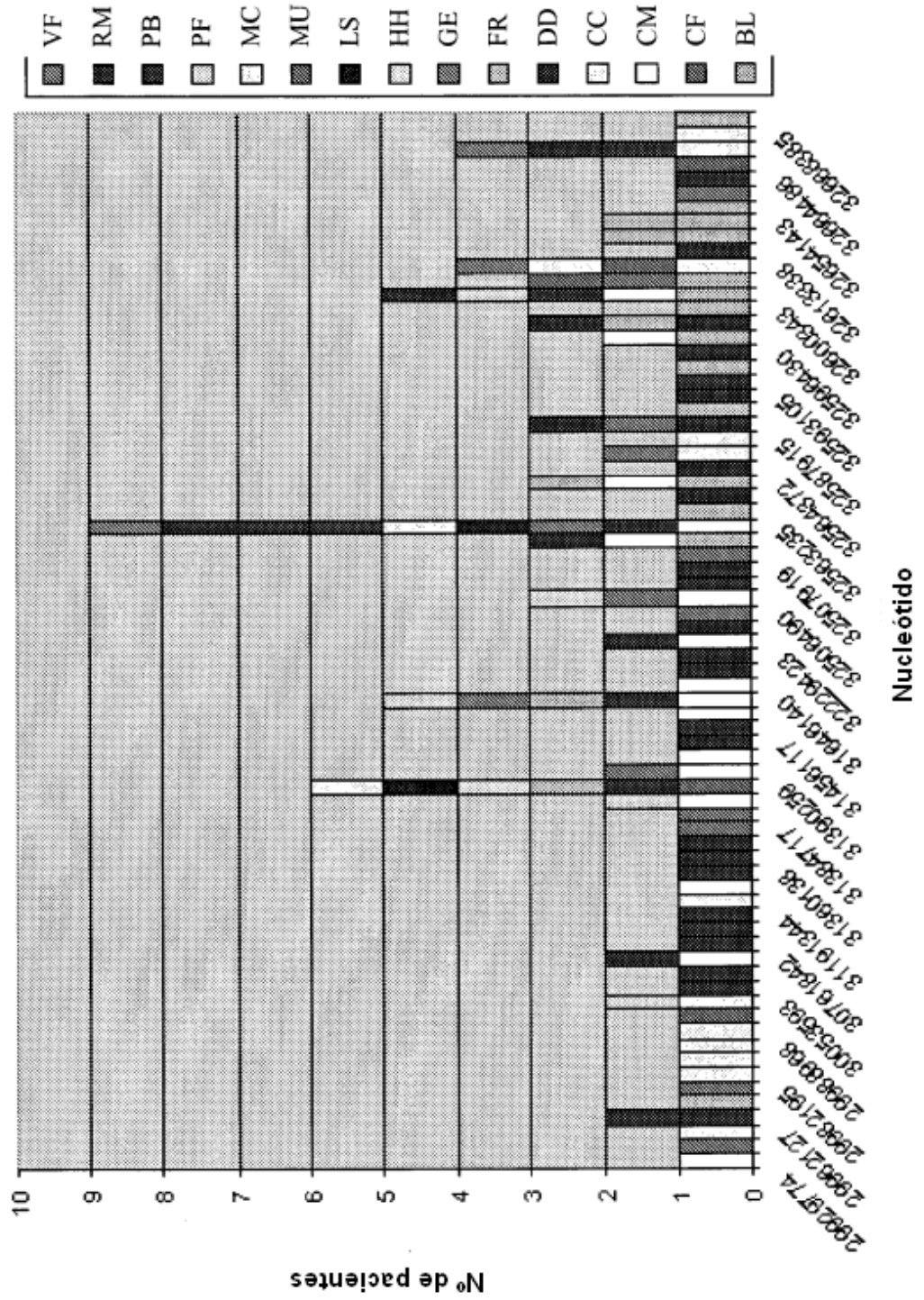
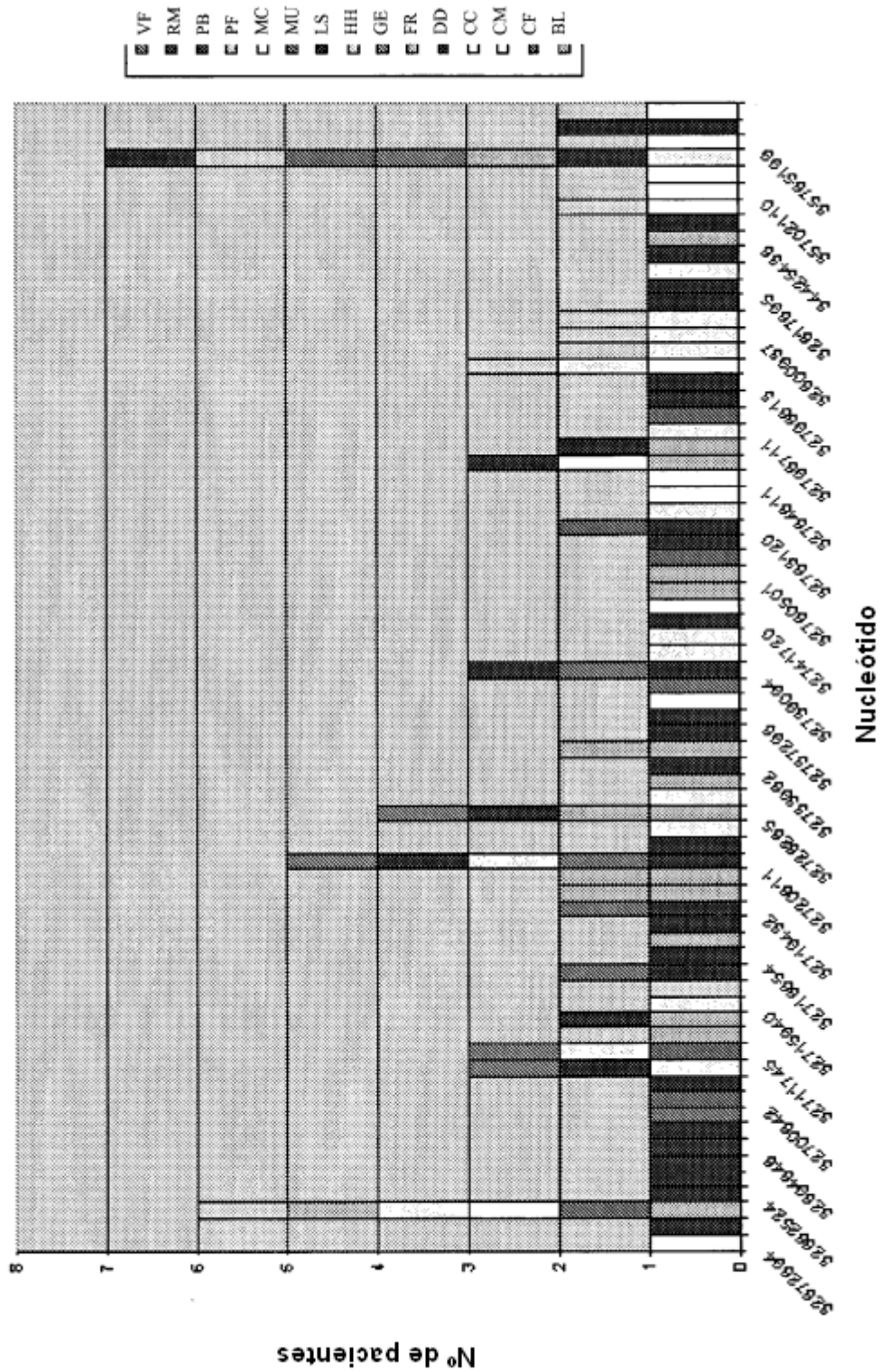


Figura 1A



Distribución de las CNV conocidas por paciente - parte 2



Nº de pacientes  
Figura 1B

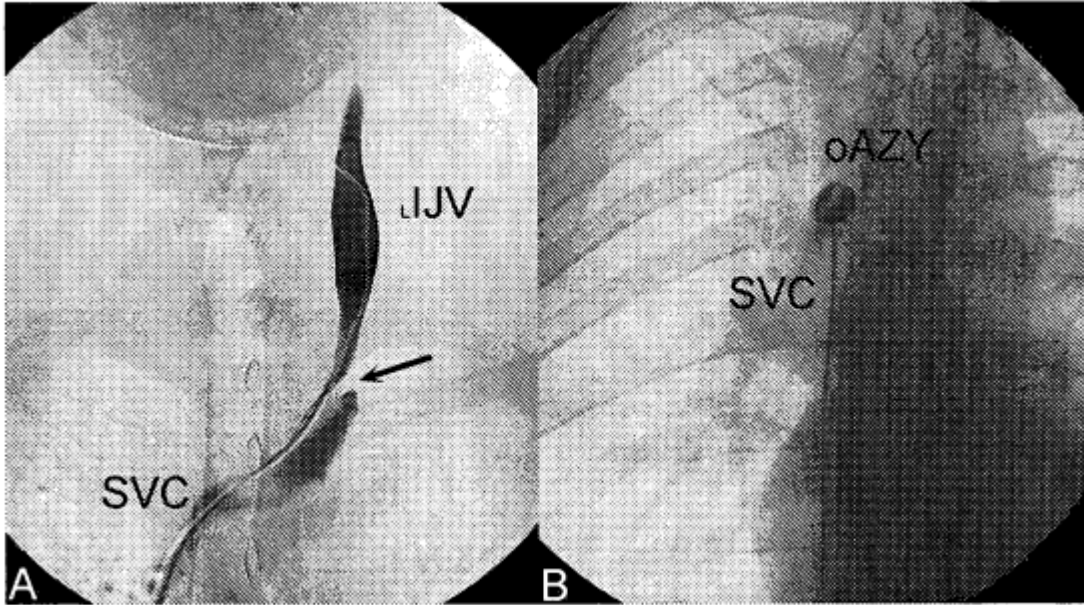


Figura 2

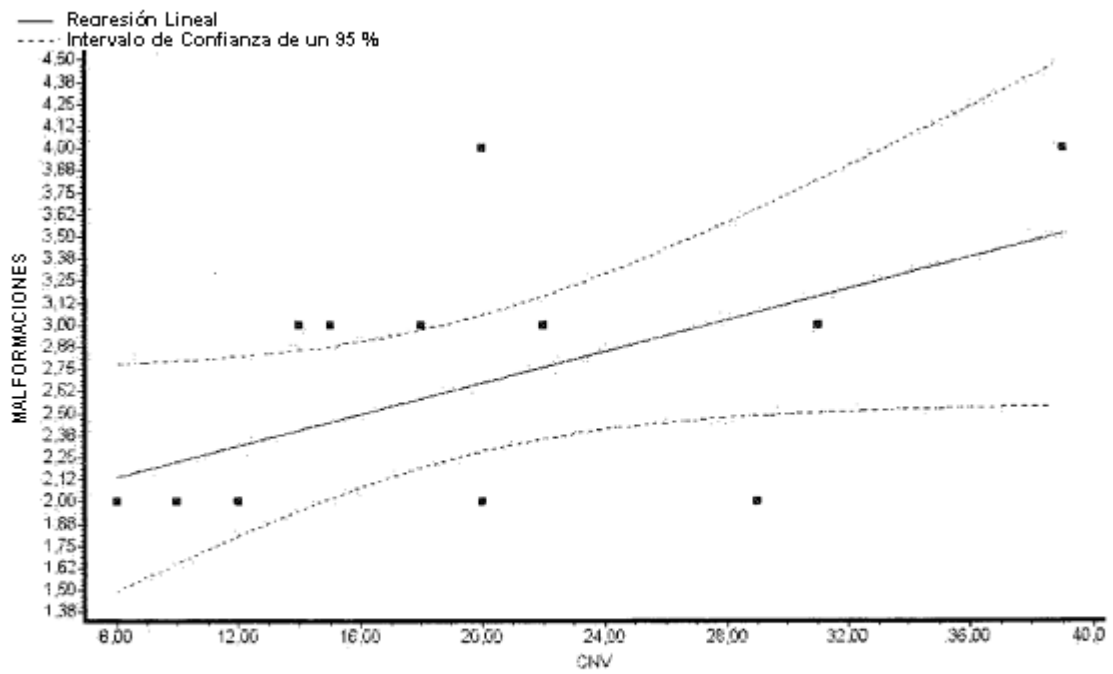


Figura 3

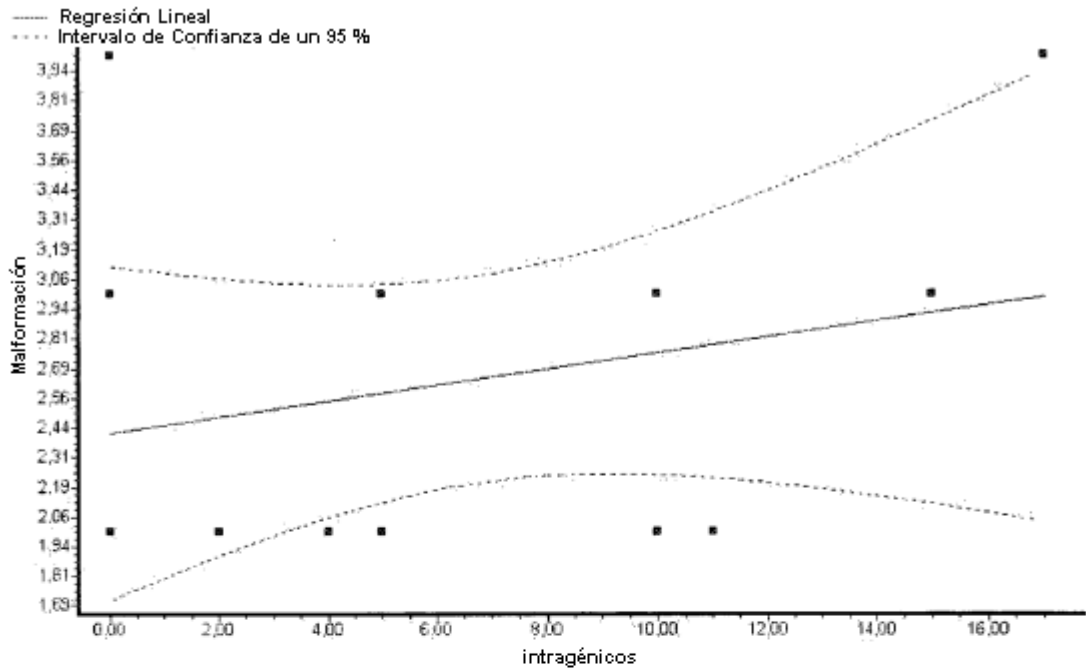


Figura 4

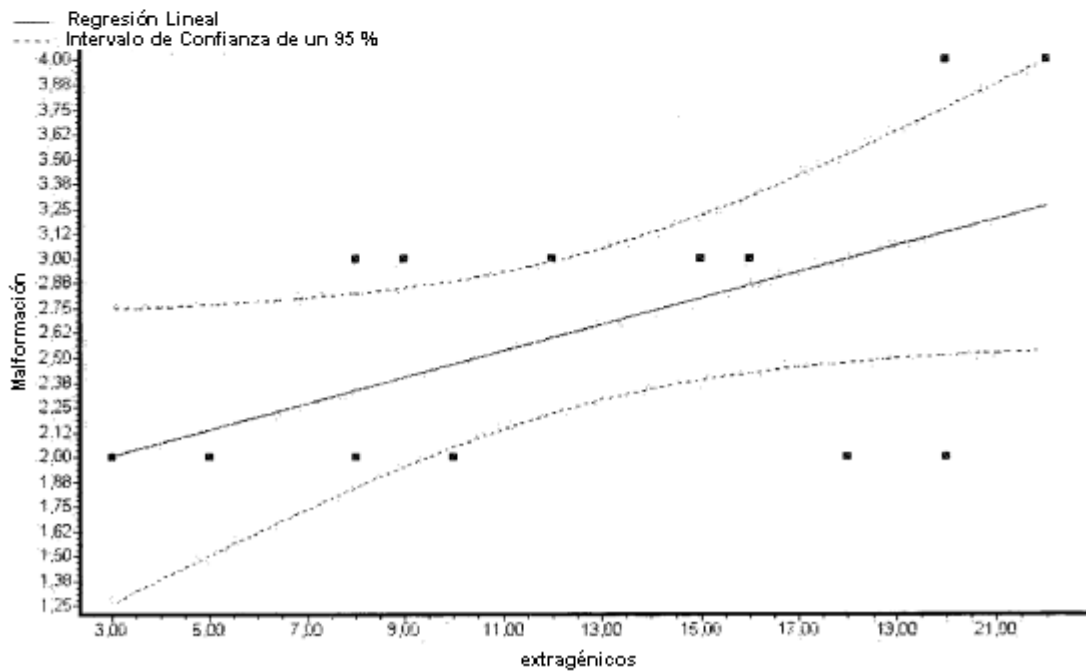


Figura 5

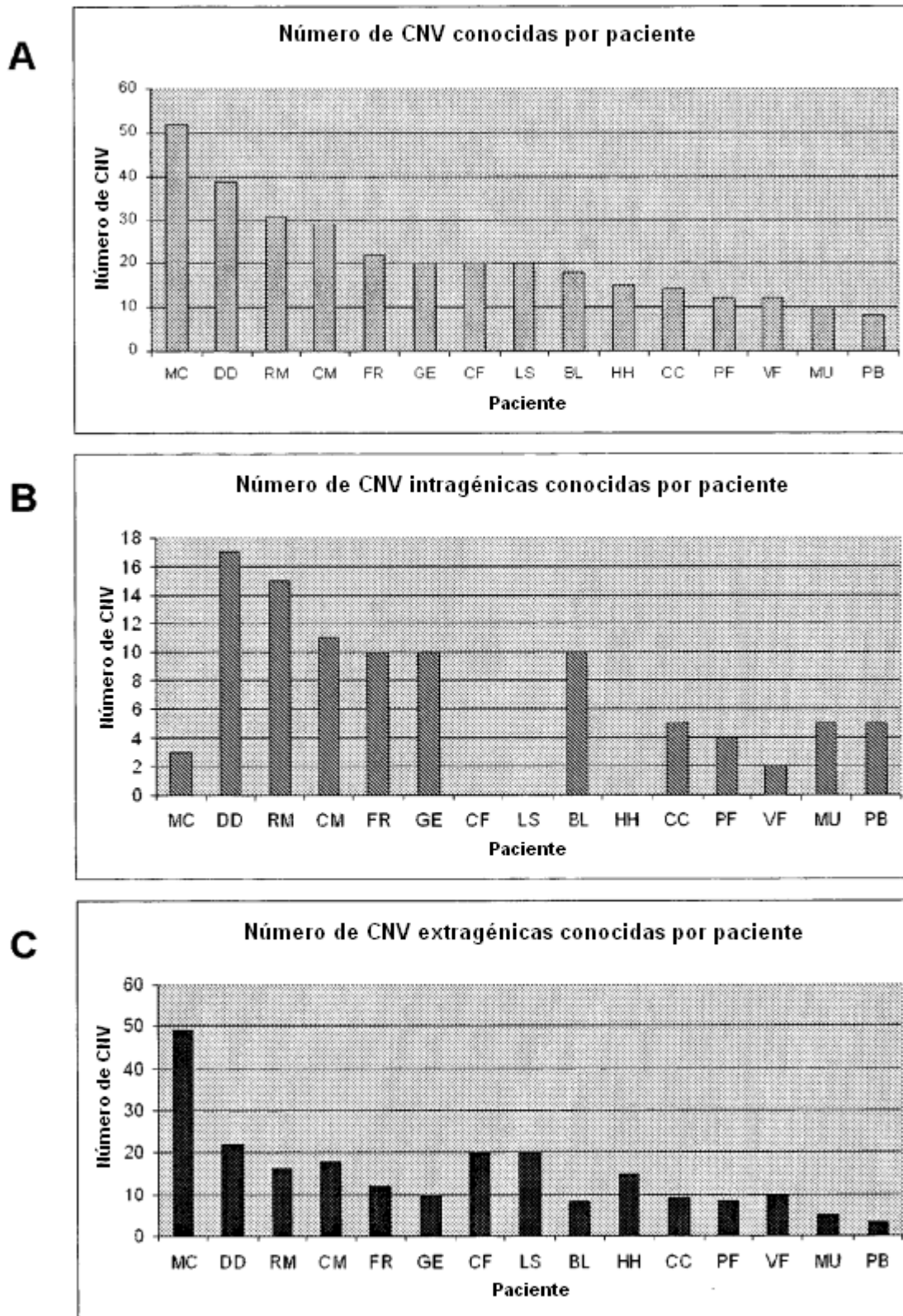


Figura 6

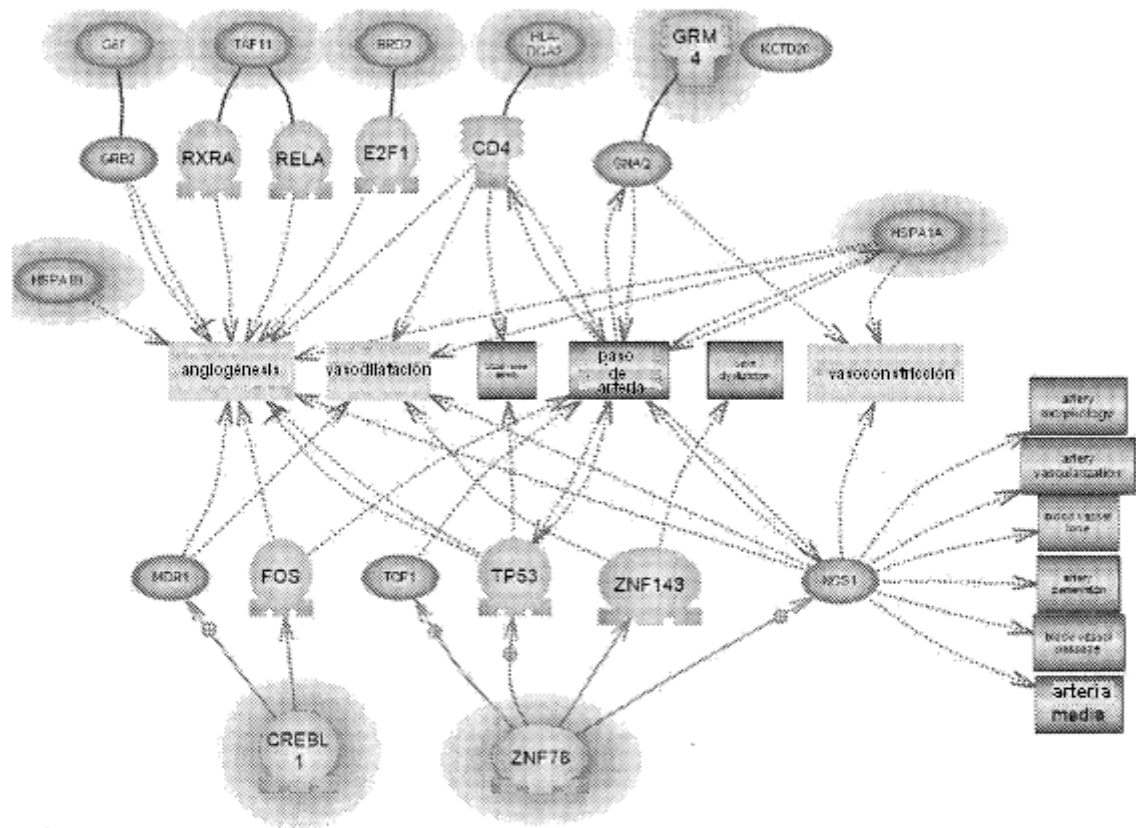


Figura 7A

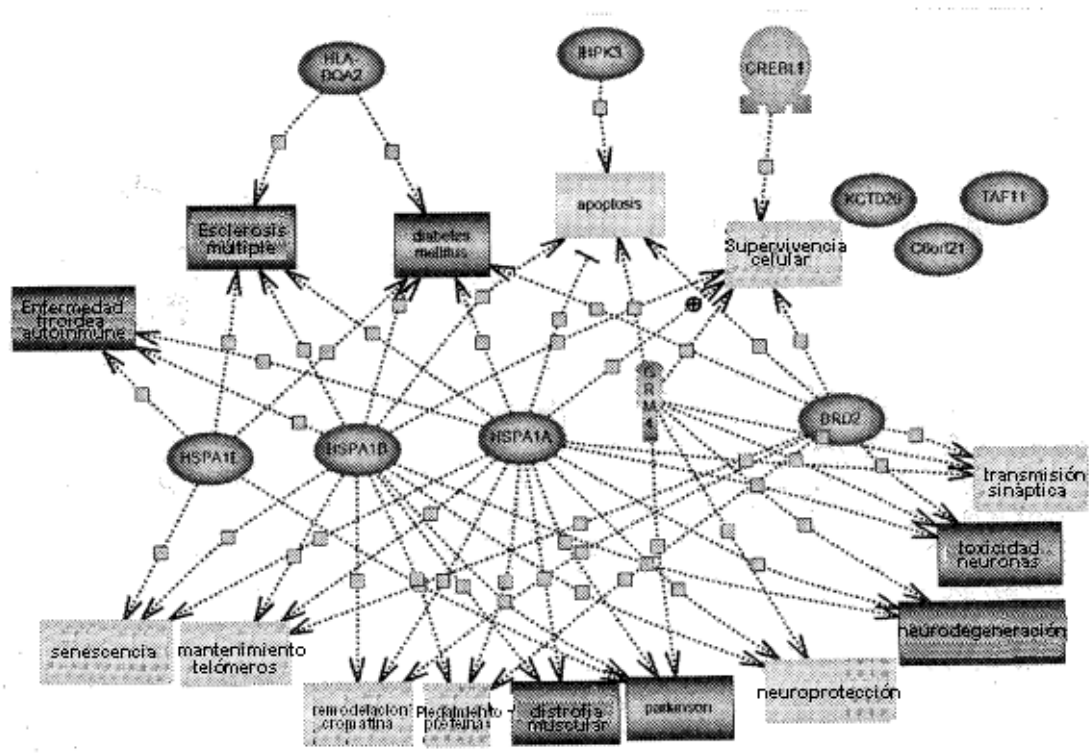


Figura 7B

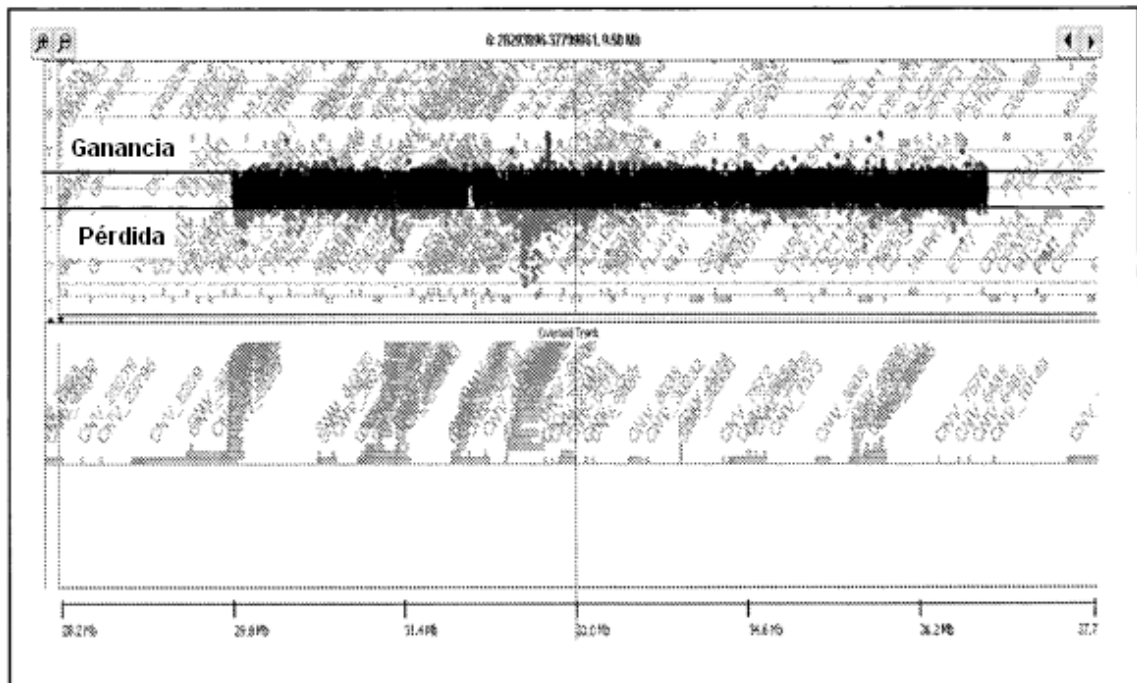


Figura 8