

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra antropologie a genetiky člověka**



**Molekulárně genetická analýza  
u pacientů s podezřením na mikroleční syndrom**

**Bakalářská práce**

Roman Šolc

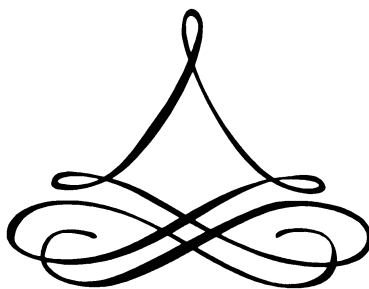
Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Kateřina Zídková, Ph.D.

PRAHA 2008

## **Poděkování**

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce, dr. Kateřině Zídkové, za věnovaný čas a velkou ochotu při odborném vedení práce. Doc. Ivanu Mazurovi za pomoc při hledání tématu bakalářské práce. Dr. Jiřímu Královi za otevření oken do onoho úžasného světa cytogenetiky. A v neposlední řadě dr. Blance Vackové za nedocenitelnou pomoc v boji s úředním šimlem.

Na závěr bych rád poděkoval svým rodičům a přátelům za všestrannou pomoc a podporu.



## **Motto**

„CAUSA LATET, VIS EST NOTISSIMA.“  
„Příčina je skryta, výsledek je všeobecně známý.“

Publius Ovidius Naso

## **Abstrakt**

Mentální retardace, izolovaná i spojená s dysmorfiiemi či malformacemi, pro vědce zůstává etiologickou záhadou. Příčina je neznámá v 50 – 80 % případů. Odhaduje se, že asi 5 % mentálních retardací je způsobeno tzv. mikrolecemi, drobnými chromozómovými delecemi o velikosti menší než 3 – 5 Mb, které nelze detekovat klasickým cytogenetickým proužkováním. K detekci se proto využívají moderní molekulárně cytogenetické metody, jako je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), komparativní genomová hybridizace (CGH) nebo multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Mikrolece mohou být intersticiální nebo terminální a byly pozorovány v mnoha oblastech lidského genomu. Způsobují tzv. mikroleční syndromy, komplexní postižení, která zahrnují poruchy mentálního i tělesného vývoje. K dnešnímu dni jich bylo popsáno více než sto. Vzhledem k obtížné diagnostice, fenotypové variabilitě a relativně krátké době, po kterou jsou mikroleční syndromy zkoumány, se lze domnívat, že jejich počet není zdaleka konečný a že podíl mentálních retardací, které způsobují, může být výrazně podhodnocen.

## **Klíčová slova**

mikrolece, mikroleční syndrom, mentální retardace, molekulární cytogenetika, fluorescenční in situ hybridizace, komparativní genomová hybridizace, multiplex ligation-dependent probe amplification

## **Abstract**

Mental retardation both isolated and associated with dysmorphies or malformations continues to be an etiological mystery to scientists. Its cause is unknown in 50–80% of cases. It is estimated that about 5% of mental retardations is caused by so-called microdeletions, small chromosomal deletions the size less than 3–5 Mb, which are impossible to detect by classic cytogenetic banding. Therefore, modern molecularly cytogenetic methods such as fluorescent in situ hybridization (FISH), comparative genomic hybridization (CGH) or multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) are used for detection. Microdeletions can be interstitial or terminal and they were observed in many regions of human genom. They cause so-called microdeletion syndromes, global disorders including both mental and physical development defects. More than one hundred of these syndromes have been described till now. Taking into consideration the difficult diagnosis, the phenotype variability and the fact that the syndromes have been investigated for a relatively short time, it is possible to suppose that their number is not final and that the portion of mental retardations which they cause can be considerably underestimated.

## **Keywords**

microdeletion, microdeletion syndrome, mental retardation, molecular cytogenetics, fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, multiplex ligation-dependent probe amplification

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>4</b>
1.1 Mentální retardace.....	4
1.2 Historický exkurz.....	6
<b>2. Molekulární podstata mikrodelečních syndromů</b> .....	<b>8</b>
2.1 Mikrodelece.....	8
2.2 Mikrodeleční syndromy.....	10
<b>3. Metody</b> .....	<b>11</b>
3.1 Cytogenetické pruhování.....	12
3.2 Fluorescenční in situ hybridizace.....	13
3.3 Komparativní genomová hybridizace.....	14
3.4 Multiplex ligation-dependent probe amplification.....	15
<b>4. Příklady mikrodelečních a delečních syndromů</b> .....	<b>17</b>
4.1 Mikrodeleční syndromy ovlivňované genetickým imprintingem.....	17
4.1.1 Prader-Williho syndrom a Angelmannův syndrom.....	17
4.1.2 Beckwith-Wiedemannův syndrom.....	19
4.2 Mikrodeleční syndromy bez vlivu genetického imprintingu.....	21
4.2.1 Monosomie 1p36.....	21
4.2.2 Williamsův syndrom.....	23
4.2.3 Monosomie 10q.....	24
4.2.4 Smith-Magenisův syndrom.....	25
4.2.5 Miller-Diekerův syndrom.....	26
4.2.6 DiGeorgův syndrom / Velokardiofaciální syndrom.....	27
4.3 Deleční syndromy.....	29
4.3.1 Cri du chat syndrom.....	30
4.3.2 Wolf-Hirschhornův syndrom.....	31
<b>5. Závěr</b> .....	<b>33</b>
Vysvětlivky lékařských pojmů.....	34
Použité zkratky.....	35
Citovaná literatura.....	36

## 1. Úvod

Mentální retardace, izolované i spojené s malformacemi či dysmorfiemi, jsou velkou etiologickou záhadou dnešní medicíny i přírodovědy. U velké části pacientů můžeme najít příčinu přímo v DNA, ať už se jedná o genové mutace či chromozómové aberace, avšak v převažující většině případů není původ retardace znám. S pomocí moderních metod (FISH, CGH, MLPA, Real Time PCR, SNP...) bylo objeveno, že původ postižení části pacientů tkví v malých submikroskopických delecích o rozsahu asi 1,5 – 3 Mb, jež byly označeny jako mikrolece (či „kryptické“ delece). Právě k nim upírá pohledy mnoho dnešních vědců.

### 1.1 Mentální retardace

Mentální retardace se v lidské populaci vyskytuje relativně hojně. Může se projevovat buď izolovaně, nebo ve spojení s faciálními i tělesnými malformacemi, dysmorfiemi a jinými poruchami. V celkovém počtu tvoří lidé s mentální retardací (izolovanou i spojenou s malformacemi) přibližně 2 – 3 % populace (Vissers et al., 2003).

Mentální retardace se projevuje v různé intenzitě a způsobuje spojité spektrum fenotypových projevů. Jako základní kritérium dělení se používá IQ (viz tab.1).

**Tabulka 1**

*Klasifikace mentální retardace – převzato ze Zhang et al., 2005*

stupeň retardace (hodnota IQ)		fenotyp	
		dětství	dospívání
0	normální	žádná retardace	žádná retardace
1	hraniční (<70)	normální vývoj; mírná retardace zřejmá během prvních školních let	navštěvuje běžnou školu po mnoho let; potřebuje menší nebo větší výpomoc
2	velmi mírná (<65)	normální vývoj během prvních let života; mírná retardace je od 2. – 3. roku života	navštěvuje běžnou školu po několik let; potřebuje větší výpomoc; má jednoduché schopnosti čtení, psaní a počítání

3	mírná (<50)	vývoj opožděn o několik měsíců; retardace zřejmá od 1. – 2. roku života	rozumí všemu včetně dlouhých vět; má velmi jednoduché schopnosti čtení, psaní a počítání
4	středně těžká (<35)	vývoj opožděn o mnoho měsíců; retardace zřejmá od 1. roku života	rozumí téměř všemu; používá krátké věty a mnoho znaků
5	vážná (<20)	vývoj opožděn až o rok; retardace zřejmá v průběhu 1. roku života	rozumí jednoduchým, běžným větám a jednotlivým slovům; používá věty o 2 – 3 slovech a mnoho znaků; chodí
6	velmi vážná (<10)	vývoj opožděn o několik let; retardace zřejmá do 6 měsíců života	rozumí několika slovům; obvykle chodí, někdy s podporou; nemluví nebo používá jen několik slov
7	hluboká	nemůže sedět bez pomoci ani v 5 letech	neodpovídá nebo jen málo; může sedět a stát bez pomoci; chůze je vzácná

Etiologie mentální retardace je však stále objasněná jen velmi málo. Není totiž způsobována vždy jednou a tou samou příčinou, ale může být konečným důsledkem různých podnětů. Různí autoři uvádějí, že u 50 – 80 % pacientů není známá základní příčina retardace (de Vries et al., 1997; Rauch et al., 2006). Jednou z příčin jsou různé chromozómové abnormality, které byly (v různých průzkumech) nalezeny u 4 – 28 % pacientů (de Vries et al., 1997; de Vries et al., 2003). Z toho asi 5 % tvoří přestavby submikroskopické (de Vries et al., 2003). Tyto submikroskopické přestavby se podílí pravděpodobně spíše na vzniku závažnějších stupňů mentální retardace, neboť u pacientů se střední a vážnou formou retardace (IQ < 50) se vyskytují u 7,4 % případů, zatímco u pacientů s mírnou formou retardace (IQ 50-70) jen u 0,5 % případů (Knight et al., 1999 in de Vries et al., 2003).

Konkrétní příčiny mentální retardace jsou velmi různorodé. Ze studie, kterou provedli Rauch et al. a jež zahrnuje 670 pacientů, vyplývá, že k nejčastějším příčinám patří Downův syndrom (trisomie chromosomu 21) – 9,2 % ze všech pacientů, mikrolece 22q11.2 – 2,4 %, Williamsův syndrom (mikrolece 7q11.23) – 1,3 %, syndrom fragilního X – 1,2 %, Cohenův syndrom (mutace v genu COH1 v oblasti 8q22) – 0,7 %, monosomie 1p36 (terminální mikrolece 1p36.3) – 0,6 %, Angelmannův syndrom (maternální mikrolece v oblastech 15q11 – 15q13) – 0,4 %, Coffin-Lowryho syndrom (mutace genu RPS6KA3 v oblasti Xp22.2) – 0,4 %, neurofibromatóza typu 1 (mutace genu pro neurofibromin v oblasti

17q11.2) – 0,4 % a Prader-Williho syndrom (paternální mikrodelece v oblastech 15q11 – 15q13) – 0,4 %. V celkovém součtu byly mikrodeleční syndromy příčinou retardace u 5,3 % pacientů. (Rauch et al., 2006) Je tedy zřejmé, že mikrodelece hrají nezanedbatelnou roli v etiologii mentální retardace a zaslouží si odpovídající pozornost.

## 1.2 Historický exkurz

Lidská cytogenetika prošla v průběhu posledního půlstoletí bouřlivým vývojem. A to jak z pohledu ryze biologického, tak medicínského a v neposlední řadě i metodického a technologického. Vrcholem tohoto vývoje se v posledních letech stalo podrobné mapování celého lidského genomu.

Už od okamžiku správného rozluštění lidského karyotypu – 46 chromozómů, z toho 22 párů autozómů a 2 gonozómy (Tjio et Levan, 1956 in Krantz et Spinner, 2007), staly se chromozómy objektem zájmu při pátrání po etiologii různých vývojových poruch. V poměrně krátké době došlo k odhalení souvislosti mezi některými známými syndromy a přítomností nadbytečného chromozómu v karyotypu pacienta. Prvním odhalením byla trisomie dvacátého prvního páru způsobující Downův syndrom (Lejeune et al., 1959 in Krantz et Spinner, 2007) a další následovala.

Dalším pokrokem byla objevení role, kterou hrají abnormální chromozómové přestavby v souvislosti s maligní transformací buněk a rakovinným bujením. K prvním objevům v této oblasti došlo u pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií (Nowell et Hungerford, 1960 in Krantz et Spinner, 2007).

Paralelně se rozvíjely i metody zkoumání karyotypu. Základní metodou, rozvíjející se od šedesátých do osmdesátých let, bylo cytogenetické proužkování. Rozlišovací schopnost této metody se postupně zvyšovala od méně než 400 proužků na genom až na přibližně 2000 proužků na genom (Yunis, 1981 in Krantz et Spinner, 2007). Přesto lze pomocí proužkování detekovat jen přestavby o velikosti větší než 5 – 8 Mb.

Nicméně, i tak bylo do poloviny osmdesátých let popsáno u pacientů s různorodými klinickými projevy množství trisomií, monosomií, translokací, duplikací, delecí, insercí, ringů a dalších přestaveb. Cytogenetický původ byl prokázán u delečních syndromů Wolf-Hirschhornova či Cri du chat. Dokonce byl popsán i u některých syndromů, které jsou typicky způsobeny mikrodelecemi, avšak část pacientů vykazuje delecí o velikosti zachytitelné proužkováním (např. Prader-Williho syndrom nebo DiGeorgův syndrom). Toto samozřejmě

bylo velkým přínosem pro diagnostiku, medicínské prognózy vývoje onemocnění i pro studium rizika dědičnosti daných onemocnění.

Polovina osmdesátých let přinesla další významný metodicko-technologický pokrok, totiž metody polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction) a zejména fluorescenční in situ hybridizace (FISH, fluorescent in situ hybridization) (Pinkel et al., 1986). Právě metoda FISH se stala oním mostem mezi molekulárně biologickou analýzou DNA a klasickou cytogenetikou. Díky této metodě bylo umožněno ještě podrobnější studium chromozómů a diagnostika malých chromozómových aberací. Takovéto aberace, které nejsou zachytitelné klasickým proužkováním, se označují jako „kryptické“ a zahrnují i mikrolece.

Jak od počátku devadesátých let postupovalo mapování lidského genomu, stále více sond bylo dostupných jak pro výzkumné, tak pro diagnostické medicínské účely. Stále více klinických syndromů a onemocnění odhalovalo své cytogenetické pozadí. Úskalím metody FISH (a zároveň předností) se stala právě její lokální specifita. Ještě před prováděním hybridizace bylo třeba mít velmi konkrétní představu, která oblast karyotypu má být prozkoumána, a podle toho se vybíraly vhodné sondy. I to se ovšem mělo změnit.

Krokem k obsáhlejšímu použití FISH se staly soubory tzv. subtelomerických sond, jejichž použití umožňovalo prozkoumání subtelomerických regionů všech pacientových chromozómů najednou. Jejich vývoj byl odpovědí na hypotézu, že polymorfismy v těchto oblastech mohou hrát roli v kryptických translokacích způsobujících u člověka patologie (Ledbetter, 1992).

Poté už šel vývoj přímo k metodám, jako je komparativní genomová hybridizace (CGH, comparative genomic hybridization) a její modifikace array-CGH, které umožňují prověřit naráz dokonce celý genom (Pinkel et al., 1998; Sebat et al., 2004; Vissers et al., 2003). Rozvoj zaznamenává také použití jednonukleotidových polymorfismů (SNP, single nucleotide polymorphisms) a array-SNP (Conrad et al., 2006; Redon et al., 2006). Tyto metody se úspěšně zavádějí do výzkumné i medicínsko-diagnostické praxe a neustále se zdokonalují, aby bylo dosaženo co největší efektivity, účinnosti a přesnosti.



## **2. Molekulární podstata mikrodelečních syndromů**

### **2.1 Mikrodelece**

Chromozómové aberace se vyskytují u 0,5 – 1 % živě narozených a jsou příčinou 25 % spontánních potratů a narození mrtvého plodu (během prvního trimestru dokonce 50 – 60 % potratů) (Shaffer et Lupski, 2000). Krátce po popsání lidského karyotypu byly objeveny případy aneuploidií (monosomie, trisomie, tetrasomie...) a později různé strukturní abnormality. Tyto abnormality zahrnují translokace, inverze, inserce, delece, duplikace a další chromozómové přestavby.

Jako delece jsou označovány takové přestavby, které vedou ke ztrátě genetického materiálu jednoho chromozómu, a tudíž k parciální monosomii deletované oblasti. Ztráta materiálu z konce chromozómu se označuje jako terminální delece, zatímco ztráta z nitra chromozómu jako intersticiální. Výsledný klinický obraz pacienta záleží na velikosti delece a na počtu a funkci genů lokalizovaných ve ztraceném segmentu.

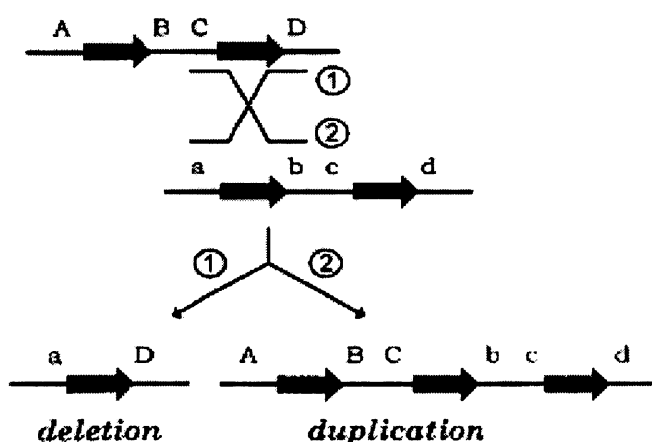
„Mikrodelece“ je označení pro delece, které jsou příliš malé, aby je bylo možné zachytit klasickými cytogenetickými technikami (cytogenetické proužkování), tj. menší než 3 – 5 Mb. Tyto ztráty mohou být odhaleny pouze pomocí molekulárně cytogenetických technik (zejména FISH). (Matthews, 1999) Téměř na všech raménkách všech chromozómů byly pozorovány mikrodelece s fenotypovým projevem (Ballif et al., 2007; De Vries et al., 2003). K mikrodelecím a jim reciprokým mikroduplikacím může dojít ve všech regionech lidského genomu, přesto je v některých oblastech pozorujeme výrazně častěji než v jiných. Existují i regiony, v nichž nebyla mikrodelece pozorována nikdy. Jedná se pravděpodobně o oblasti, jež kódují životu nezbytné faktory a jejichž delece je nejspíš letální. (Brewer et al., 1998)

Mikrodelece (a reciproké mikroduplikace) mohou vznikat jako důsledek inekválních crossing-overů mezi sesterskými chromatidami (intrachromozómový) nebo mezi homologními chromozómy (interchromozómový) v průběhu meiózy (Shaffer et Lupski, 2000). Druhou možností je vznik v důsledku rekombinace či nondisjunkce v průběhu mitózy. Často k ní dochází postfertilizačně, jen v některé z buněk velmi raných stádií vývoje zárodku, což vede k mozaicismu (Matthews, 1999).

K většině přestaveb dochází mezi bloky tzv. LCR (low copy repeats), místy sdílejícími více než 97 % homologií (Shaffer et al., 2007), roztroušenými ve specifických regionech genomu a často bohatými na GC páry (Chandley, 1989). Takto vznikající mikrodelece mívají

velmi podobný rozsah i body zlomu (73 % mikrodelecí, 82 % mikroduplikací), jiné mechanismy vedou k mikrodelecím s podstatně variabilnějším rozsahem (Shaffer et al., 2007). Shodné body zlomu a rozsah pozorujeme u převážně většiny intersticiálních mikrodelecí (Shaffer et Lupski, 2000).

Bloky LCR mají krom homologie společnou i velikost typickou pro konkrétní region genomu (od 10 do 400 kb) a vzdálenost mezi jednotlivými bloky repetice. Evolučně vznikaly nejspíše duplikací chromozómových segmentů. (Shaffer et Lupski, 2000)



**Obrázek 1**

*Mechanismus vzniku delecí a reciproké duplikace prostřednictvím LCR*

– převzato z Shaffer et Lupski, 2000

Horizontální linky znázorňují chromozómy obsahující bloky homologních LCR (tlusté šipky). Písmena „A,B,C,D“ a „a, b, c, d“ znázorňují unikátní sekvence lemující repetice na homologních chromozómech. Rekombinací (např. inekvální crossing-over) dochází k delecí (1) a reciproké duplikaci (2).

Velká pozornost se věnuje terminálním (a někdy i intersticiálním) mikrodelecím zahrnujícím subtelomerické oblasti, které jsou velmi bohaté na geny (Saccone et al., 1992) a stávají se častěji objektem přestaveb než ostatní části chromozómů (Mefford et Trask, 2002).

Každý lidský chromozóm je zakončen 3 – 20 kb repetitivní sekvencí (TTAGGG)<sub>n</sub> (Moyzis et al., 1988). Blíže centromere pozorujeme asi 100 – 300 kb tzv. TAR (telomere-associated repeats), distálněji jsou umístěny krátké bloky (pod 2 kb), zatímco proximálněji

delší (10 – 40 kb) (Flint et al., 1997). Tyto repetice tvoří polymorfismy. Zatímco kratší distální bloky jsou sdíleny mnoha chromosomy, delší distální jsou více specifické; sekvence jsou u některých chromozómů stejné, jiné chromozómy naopak sekvenční repetice neobsahují. To nasvědčuje tomu, že tyto polymorfismy pravděpodobně evolučně vznikly rekombinacemi mezi nehomologními chromozómy. (Shaffer et Lupski, 2000)

Ze srovnávání sekvencí lze odvodit, že proximální a distální repetice navzájem neinteragují; naopak různými způsoby interagují s korespondujícími repeticemi na nehomologních chromozómech (Flint et al., 1997). Tak dochází jak k reciprokým (translokace), tak nerekiprokým (terminální delece a mikrodelece) přestavbám (Shaffer et Lupski, 2000). Terminální delece mají (na rozdíl od intersticiálních) většinou variabilnější rozsah a body zlomu (Shaffer et Lupski, 2000).

## 2.2 Mikrodeleční syndromy

Komplexní postižení organismu v důsledku mikrodelece jsou označována jako „mikrodeleční syndromy“. Databáze OMIM (<http://www.ncbi.nih.gov>) v současnosti registruje více než 100 mikrodelečních syndromů různého typu, toto číslo však jistě není konečné.

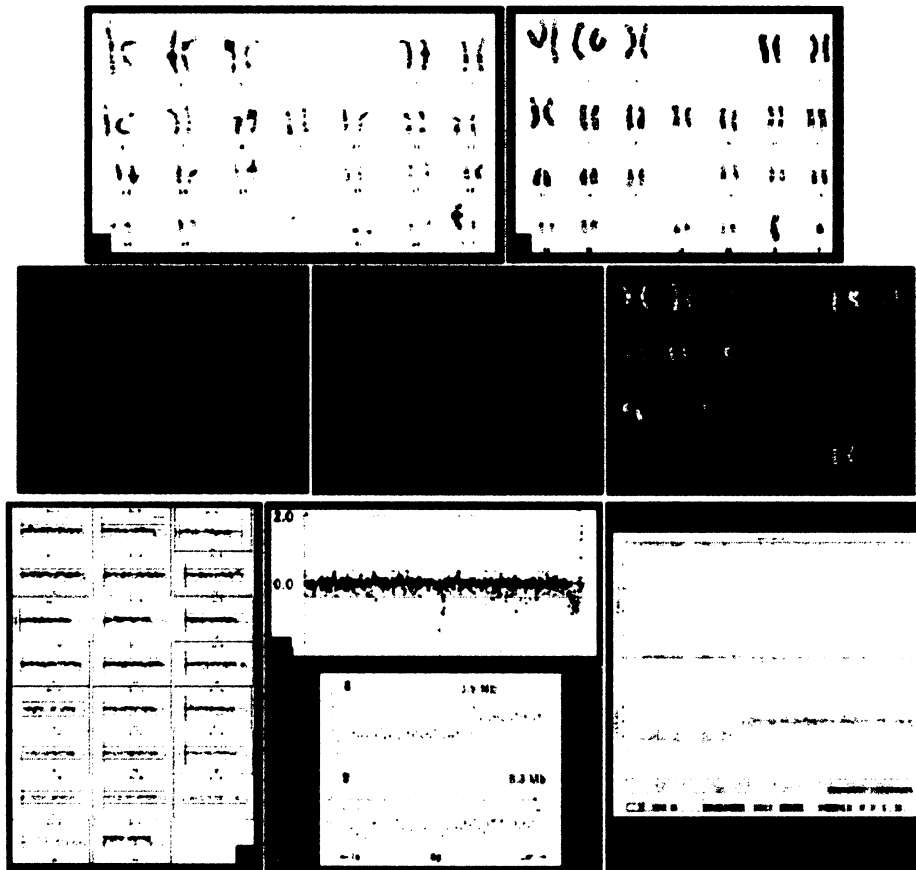
Většina z nich patří k tzv. syndromům přilehlých genů („contiguous gene syndromes“), což znamená, že anomálie fenotypu jsou způsobeny delecí několika sousedících genů. Absence jednotlivých genů je vázána na variabilitu ve velikosti mikrodelece (zejména u terminálních mikrodelecí), což je jedním z důvodů variability ve fenotypu pacientů.

Fenotyp zbývajících syndromů je úplně či téměř úplně důsledkem delece jednoho konkrétního genu, který delece zahrnuje, zatímco ostatní deletované geny se na klinickém obrazu pacienta neprojevují. U takovýchto syndromů může být shodný fenotyp výsledkem jak delece, tak bodové mutace příslušného genu.

Vzhledem k časté variabilitě a vzájemnému překryvu fenotypů řady mikrodelečních syndromů lze předpokládat, že jejich záchytnost v populaci je dosti podhodnocena.

### 3. Metody

Typickým nástrojem klasické cytogenetiky, užitečným a efektivním, bylo a je cytogenetické pruhování. Ovšem se stoupající technickou vyspělostí a nároky vědců a klinických cytogenetiků se objevily techniky nové, pomocí kterých bylo možné zkoumat přímo molekulární strukturu chromozómů. Tím byla jako nový obor zavedena molekulární cytogenetika. Dále popisované metody molekulární cytogenetiky (FISH, CGH) i molekulární genetiky (MLPA) jsou pouhou ukázkou těch zřejmě nepoužívanějších z širokého spektra metod používaných v rámci vědeckého zkoumání i klinické praxe.



Obrázek 2

*Vývoj chromozómové diagnostiky – převzato z Krantz et Spinner, 2007*

A: cytogenetické pruhování, B: cytogenetické pruhování digitalizované počítačem, C: FISH, D: subtelomerní FISH, E: mFISH, F,G,H: array CGH, I: array SNP

### 3.1 Cytogenetické pruhování

Cytogenetické pruhování je základní metodou klasické cytogenetiky a stalo se nedocenitelným pomocníkem pro karyotypování a jiná cytogenetická zkoumání. Stalo se jedním ze základních pilířů cytogenetiky a i v dnešní době se ho hojně využívá v přírodovědě i medicínské diagnostice jakožto základního vyšetření. To i přesto, že vlastní mechanismus pruhování nebyl dodnes zcela vysvětlen. Dodnes bylo vyvinuto několik různých pruhovacích technik, z nichž nejstarší je tzv. Q pruhování, které bylo poprvé použito koncem šedesátých let 20. století.

Rozlišujeme tyto pruhovací techniky :

*G pruhování* (Giemsa banding) – nejpoužívanější pruhovací technika, jež zbarvuje hlavně AT bohaté oblasti genomu; podle výsledku G pruhování byly také označeny regiony lidského genomu

*R pruhování* (reverse banding) – pruhování komplementární k G pruhování, zbarvuje zejména CG bohaté oblasti genomu

*Q pruhování* (quinacrine banding) – fluorescenční pruhování, stejný vzhled chromozómů jako při G pruhování

*C pruhování* (centromeric banding) – zbarvuje heterochromatin zejména v centromerické a přilehlých oblastech chromozómů

*N pruhování* (NOR banding) – varianta C pruhování, zbarvuje zejména heterochromatin asociovaný s tzv. NORy (nucleolus organizer region)

*T pruhování* (telomeric banding) – varianta R pruhování, zbarvuje zejména heterochromatin v distálních oblastech chromozómů

*D pruhování* (DNase I sensitivity banding) – pruhování je indukováno metodou in situ nick translace, výsledný vzor je podobný G pruhování

Klasické G a R pruhování vytváří v lidském metafázním karyotypu necelých 500 pruhů. Modernější použití méně spiralizovaných profázních chromozómů (tzv. high resolution banding) poskytuje až 2000 pruhů.

Pomocí pruhovacích technik bylo identifikováno mnoho aneuploidii (trisomie, monosomie) a chromozómových aberací (translokací, delecí, insercí, inverzí...). Analýza je však limitována velikostí přestavby, která musí být větší než 5 – 8 Mb.

(Salman et al., 2004)

### 3.2 Fluorescenční in situ hybridizace

První používání molekulárních sond koncem osmdesátých let odstartovalo nový rozkvět cytogenetiky a zahájilo éru molekulární cytogenetiky. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) od té doby dostala řady obměn, variací a rozvinutí, na jejímž konci stojí nejmodernější molekulárně cytogenetické metody jako CGH a především array CGH.

Princip metody FISH tkví v tom, že oligonukleotidové sondy s navázaným fluorochromem se nechají interagovat na principu komplementarity s denaturovanou testovanou DNA. Analýza přestává být vázána na dělicí se buňky (jako v případě pruhování), nýbrž může být prováděna i na interfázních buňkách (Pinkel et al., 1986), což je významné především z hlediska rychlé prenatalní diagnostiky.

Rozlišujeme tři typy sond :

*lokus-specifické sondy („genové“)* – hybridizují s jedinečnými sekvencemi v genomu; používají se k odhalení translokací, inverzí, duplikací a delecí, syndromů přilehlých genů nebo markerových chromozómů

*sondy pro repetitivní sekvence („satelitní“)* – hybridizují s repetitivními sekvencemi zejména v centromerických a subtelocentrických oblastech; centromerické sondy se využívají k detekci aneuploidií a markerových chromozómů, subtelomerické naopak k odhalení drobných přestaveb (zejména translokací)

*celochromozómové sondy („malovací“)* – hybridizují s mnohočetnými chromozómovými sekvencemi, lze jimi označit celý chromozóm; používají se k vyšetření chromozómových přestaveb

(Salman et al., 2004; Shaffer et Bejjani, 2006)

Pro vyšetření s podezřením na mikrodeleci v určitém regionu (ale i translokaci, duplikaci...) se většinou používají dvojice sond s fluorochromy odlišné barvy. Zatímco první sonda je komplementární k sekvenci v podezřelém regionu, druhá (tzv. kontrolní) se váže na centromeru nebo na vzdálenou oblast na opačném raménku. Tak lze vystopovat, zda podezřelá oblast je „na svém místě“, zda byla deletována (signál chybí), duplikována (signál je zdvojený) či translokována (signál je lokalizován na jiném chromozómu, než kontrolní signál). (Pinkel et al., 1986)

Zásadním nedostatkem „klasické“ FISH byla paradoxně jedna z jejích velkých předností, totiž specifita. Bylo nutné předem vtypovat a velmi úzce vymežit podezřelý region a ten otestovat, nebylo totiž možné použít více než dva fluorochromy. Tato obtíž byla

během času překonána rozvinutím nových technik založených na FISH (zejména celochromozómových sond).

K pokročilejším modifikacím metody FISH patří například tzv. GISH (genomic in situ hybridization), v níž se používá jako sonda celogenomová DNA a využívá se zvláště k evolučním studiím. Dále tzv. CISS (chromosomal in situ suppression), která jako sondy užívá též celogenomovou DNA, avšak předem zhybridizovanou s vlastními repetitivními sekvencí, které se tímto vyvážou. K nejpokročilejším a i klinicky používaným metodám patří tzv. mFISH (multicolour FISH) a SKY (spectral karyotyping). V nich se používá kombinatorní značení sond (sondy každého chromozómu jsou značeny specifickou kombinací fluorochromů). Pomocí počítačového programu lze poté přiřadit jednotlivým chromozómovým párům tzv. pseudobarvy, buď podle kombinace fluorochromů (mFISH) nebo na základě emisního spektra (SKY). S ohledem na kombinatoriku lze takto označit celý lidský genom s pomocí pouhých pěti fluorochromů. (Salman et al., 2004)

I tyto celogenomové malovací techniky jsou ale limitovány velikostí přestaveb, které musí být větší než 2 – 3 Mb (Saracoglu et al., 2001).

Jednou z nejmodernějších variací metody FISH je také metoda CGH, které je věnována samostatná kapitola.

### **3.3 Komparativní genomová hybridizace**

Jako první popsali metodu komparativní genomové hybridizace (CGH) Kallioniemi et al. už v roce 1992. Přesto trvalo nějakou dobu, než se prosadila a stala jednou z nejperspektivnějších současných metodik. Její hlavní využití spočívá ve vyšetřování chromozómových změn v nádorových buňkách.

Podstata metody CGH tkví v tom, že se pracuje se dvěma buněčnými populacemi (testovanou a kontrolní), jejichž celé genomy slouží jako sondy. Sondy z testované DNA se označí jedním flurochromem, sondy z kontrolní DNA odlišným fluorochromem a oboje se nechají kohybridizovat s normálními „zdravými“ chromozómy. Poté se pomocí počítače snímají signály, za normálního stavu by měly být chromozómy rovnoměrně „obarveny“ oběma barvami. Pokud v některém místě převládá jen barva kontrolních sond, pak je zde testovaná DNA deletována. Pokud převládá barva testované sondy, pak v tomto místě pravděpodobně došlo k amplifikaci na testované DNA. (Pinkel et al., 1998)

Jasnou výhodou CGH je zejména to, že vyšetřované somatické (nebo nádorové) buňky nemusí být v mitóze, neboť se pracuje s celou izolovanou DNA.

Metoda CGH však má také některé nevýhody. Asi největší je, že jí nelze prokázat balancované přestavby (translokace, inverze), neboť není změněn počet kopií DNA sekvence. Navíc konkrétní přestavby musí být přítomné nejméně u 50 % buněk (což je komplikací spíše při zkoumání nádorových než somatických buněk). (Wei et al., 2003; Salman et al., 2004)

Určitou obměnou CGH je nová perspektivní metoda označovaná jako „microarray“ či „array-CGH“. V tomto případě se sondy nenechávají hybridizovat s celými chromozómy, ale s velkým počtem malých úseků genomu. Ty jsou ve formě mikroskopických teček navázány na nevelké ploše podložního skla (Bejjani et Shaffer, 2006). Metoda array-CGH se ukázala jako velmi praktická (ačkoli zatím finančně nákladná) a přínosná. Pomocí array-CGH bývají detekovány drobné chromozómové přestavby u 5 – 17 % pacientů, kteří prošli běžným cytogenetickým testováním bez abnormálního nálezu, což ji řadí k nejuspěšnějším metodám detekce kryptických přestaveb (Shaffer et Bejjani, 2006).

### **3.4 Multiplex ligation-dependent probe amplification**

Metoda multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) je ze zde popisovaných metod nejnovější, poprvé byla popsána Schoutenem et al. až roku 2002. Zdá se být velmi perspektivní jednak pro relativně snadné provedení a jednak pro vyšší rozlišovací schopnost. Pomocí MLPA se totiž dají detekovat chromozómové přestavby menší než 1 Mb (Rooms et al., 2006). Lze ji použít jak k jemnému prozkoumání určité oblasti genomu (Fernández et al., 2005), tak ji můžeme použít k celogenomové analýze (např. všech subtelomerických oblastí) v jedné reakci (Rooms et al., 2005). Využívána je pro odhalení delecí a duplikací úseků DNA i konkrétních genů, charakterizaci dalších chromozómových aberací, detekci chromozómových aneupolidií a některých mutací, či pro výzkum nádorových buněk (Schouten et al., 2002).

Na rozdíl od předchozích metod není MLPA odvozena od metody FISH, ale od metody polymerázové řetězové reakce (PCR), její podstata je tedy poněkud odlišná. Spočívá v použití dvou sond pro každou cílovou sekvenci. Každá z nich je složená ze dvou částí. První sonda je složená z cílové sekvence (20 – 30 nukleotidů) a ze sekvence pro synteticky připravený primer. Druhá sonda obsahuje rovněž cílovou sekvenci (25 – 43 nukleotidů) a sekvenci pro jiný syntetický primer, ovšem mezi nimi je vložen variabilně dlouhý (s konkrétní délkou pro



konkrétní cílovou sekvencí) náhodně sestavený fragment. Tyto sondy se nechají hybridizovat s testovanou DNA, na níž nasednou těsně vedle sebe, a pomocí ligázy se sondy spojí. Poté se nechá proběhnout denaturace a sondy se systémem PCR amplifikují. Amplifikovaný produkt se elektroforeticky dělí pomocí variabilních sekvencí. Následuje počítačová analýza fragmentů, která vyhodnotí, jak jsou cílové sekvence ve vyšetřovaném genomu zastoupeny. (Schouten et al., 2002; Sellner et Taylor, 2004)

Přestože metoda MLPA má mnohé klady, v lecčems předčí své předchůdkyně a přinesla množství nových poznatků, i ona má některé nedostatky či nevýhody. Jejím prostřednictvím nelze například vypátrat balancované translokace (Rooms et al., 2005). Dalším nedostatkem je, že metodě MLPA můžou uniknout některé malé terminální delece, které však dokáže zachytit metoda FISH (Koolen et al., 2004).

## **4. Příklady mikrolečních a delečních syndromů**

Molekulárně genetické metody mohou sloužit k diagnostice, lokalizaci a popisu mikrolecí. Jimi způsobované mikroleční syndromy si můžeme rozdělit na dvě skupiny. U první skupiny syndromů se projevuje vliv genetického imprintingu, takže projev syndromu je závislý od toho, který z dvojice chromozómů je postižen. U druhé skupiny tento vliv není prokázán a následky delecí jsou v případech obou chromozómů stejné. Molekulárně genetické metody se uplatňují také při zkoumání klasických delečních syndromů, zejména při hledání kritických regionů pro jednotlivé fenotypové projevy.

### **4.1 Mikroleční syndromy ovlivňované genetickým imprintingem**

V případě syndromů podmíněných imprintingem může dojít k tomu, že mikrolece stejné oblasti způsobuje dva různé syndromy, podle toho, zda je situována na maternálně či paternálně zděděném chromozómu (např. Prader-Williho a Angelmanův syndrom). Nebo způsobuje syndrom pouze mikrolece buď na maternálním, nebo paternálním chromozómu (např. Beckwith-Wiedemannův syndrom).

#### **4.1.1 Prader-Williho syndrom a Angelmanův syndrom**

Typickým příkladem závislosti fenotypového projevu mikrolece na parentálním původu postiženého chromozómu je dvojice Prader-Williho syndrom (PWS; prvně popsán Praderem, Labhartem a Willim roku 1956) a Angelmanův syndrom (AS; poprvé popsán Angelmanem roku 1965).

Oba tyto syndromy se vyskytují v populaci s četností přibližně 1/10 000 – 1/15 000 (Cassidy et al., 2000). Fenotypy pacientů s těmito syndromy jsou značně odlišné.

K typickým projevům PWS patří oči ve tvaru mandle, úzké čelo, trojúhelníkový tvar horního rtu, hypotonie, hypogonadismus, hyperfagie a související obezita, malé ruce a nohy, poruchy funkce endokrinního systému a centrálního nervového systému, mentální retardace a poruchy chování (agresivita, lhaní...) (Papavramidis et al., 2006). AS se projevuje zejména neschopností mluvit, mikrocefalií, šilháním, prominující bradou, makroglosií, hypotonií, hypopigmentací, psychomotorickou retardací, mentální retardací, bezdůvodnými výbuchy šťastné nálady, epileptickými záchvaty, hyperaktivita, poruchami spánku a fascinací vodou (Clayton-Smith et Laan, 2003).

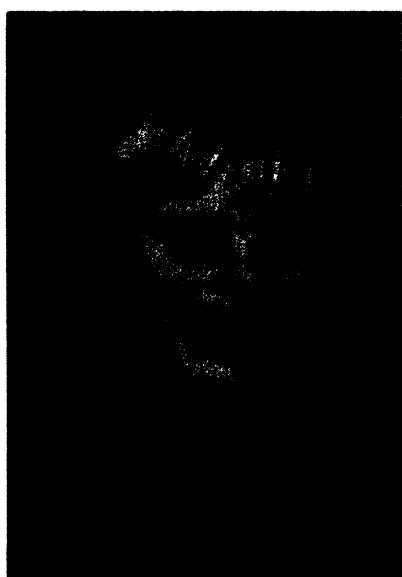
Přesto mají oba tyto syndromy stejnou molekulární příčinu – hemizygotitu nebo uniparentální disomii oblasti 15q11 – 15q13 v proximální části dlouhého raménka patnáctého chromozómu. PWS se projeví, pokud je deletována oblast na paternálně zděděném chromozómu nebo je maternálně disomická, AS se projeví, pokud je deletována oblast na maternálně zděděném chromozómu nebo je paternálně disomická. Příčinou tohoto jevu je genetický imprinting, který způsobuje rozdílnou expresi genů z maternálního a paternálního chromozómu, a tudíž i odlišný fenotyp při poškození.

AS je pravděpodobně způsobován absencí produktů jednoho konkrétního genu, a to UBE3A, který je exprimován na maternálním chromozómu, zatímco na paternálním je umlčen. Tento gen kóduje protein E6-AP, který slouží jako přenašeč malých ubiquitinových molekul. (Scheffner et al., 1995 in Cassidy et al., 2000) PWS je způsobován absencí exprese většího množství genů, nejméně dvou, jež jsou exprimovány pouze z paternálního chromozómu. Nejsou ještě dobře charakterizovány, zatím nejlépe popsán je gen SNRPN, jenž kóduje malé jaderné ribonukleoproteiny, které jsou součástí spliceosomů. (Cassidy et al., 2000) Porušení ovšem může být ovšem také jen centrum imprintingu (klíčovou roli zde hraje gen SNURF), což způsobí jeho defekt a následně některý ze syndromů. Dále jsou v kritickém regionu lokalizovány tři geny pro podjednotky receptoru pro neurotransmitter GABA, které nepodléhají imprintingu. (Cassidy et al., 2000)

Asi 70 % případů PWS i AS je způsobeno mikrodelecí v oblastech 15q11 – 15q13 (Cassidy et al., 2000). Ve velké většině případů jsou veliké 4 Mb a mají shodné body zlomu (Christian et al., 1995). Mikrodelece způsobují přibližně stejný podíl PWS i AS, uniparentální disomie (maternální) stojí za 25 – 28 % případů PWS, zatímco paternální disomie způsobuje pouze 3 – 5 % AS; pravděpodobně protože paternální nondisjunkce je méně častá než maternální (Cassidy et al., 2000). Asi 2 – 5 % pacientů s PWS i AS mají narušeno centrum imprintingu. Většinou se jedná o velmi malou delecí či o mutaci (Ohta et al., 1999), ale v některých případech nebylo zaznamenáno ani toto poškození, přestože genová exprese je narušena (Buiting et al., 1998). Necelé 1 % případů PWS i AS má svůj původ v translokaci či jiné komplexnější přestavbě karyotypu (Cassidy et al., 2000). Asi 10 – 15 % případů AS je způsobeno mutací přímo v genu UBE3A (Kishino et al., 1997 in Cassidy et al., 2000). Etiologie zbývajících asi 10 % případů AS je neznámá (Cassidy et al., 2000). Obecně lze prokázat, že pacienti s uniparentální disomií či defekty centra imprintingu mají mírnější projevy syndromů, než pacienti s mikrodelecí. Příčinou by mohla být hemizygotita genů nepodléhajících imprintingu u pacientů s delecí (Cassidy et al., 2000).

**Obrázek 3**

*Pacientka s Prader-Williho syndromem*  
– převzato z McEntagart et al., 2000



**Obrázek 5**

*Pacient s Beckwith-Wiedemannovým syndromem*  
– převzato ze Slavotinek et al., 1997



**Obrázek 4**

*Pacientka s Angelmanovým syndromem*  
– převzato z Laan et al., 1999

#### **4.1.2 Beckwith-Wiedemannův syndrom**

Beckwith-Wiedemannův syndrom (BWS) je další ukázkou zásadní role genetického imprintingu pro expresi některých genů. A přestože mikrolece je jen zřídka příčinou vzniku tohoto syndromu, jistě stojí za povšimnutí a další rozebrání.

BWS byl poprvé popsán Beckwithem a Wiedemannem roku 1963, resp. 1964. Mezi typické příznaky pacientů patří makroglosie (97 % pacientů), pre- nebo postnatální gigantismus (88 %), poruchy břišní stěny – omfalokéla, pupečnicková kýla (80 %), špatně vyvinuté ušní boltce nebo jen posteriorně umístěné ušní jamky (76 %), hypoglykémie (63 %), obličejový nevus flammeus (62 %), anomálie ledvin (59 %), hemihypertrofie (24 %), vrozené srdeční vady (6,5 %), abnormální otáčení střední části střeva (5 %), neoplasmy (4 %), mírná až vážná mentální retardace (4 %), polydaktylie (3 %), rozštěp patra (2,5 %) (Elliott et al., 1994 in Chen, 2007). Incidence BWS je u všech etnik asi 1/13 700 a je rovnoměrně rozdělena mezi muže i ženy (Pettenati et al., 1986 in Weksberg et al., 2005).

Postiženou oblastí genomu je u převážné většiny pacientů s BWS oblast 11p15. V ní se nachází přibližně 1 Mb úsek DNA, v němž se velmi výrazně uplatňuje genetický imprinting. Tvoří ji dvě domény, distální doména 1 a proximální doména 2, které jsou odděleny dvěma geny, na něž imprinting nemá vliv. Doména 1 obsahuje zejména geny IGF2 (insulin-growth factor II), který působí jako embryonální růstový faktor a regulátor buněčné proliferace, H19, který exprimuje netranslační, biologicky aktivní mRNA s tumor-supresorovou funkcí, a centrum imprintingu DMR1. Doména 2 pak zahrnuje geny KCNQ1, kódující proteiny se strukturálními znaky napětově řízených draslíkových kanálů, CDKN1C (cyclin-dependent kinase inhybitor 1C), jenž slouží jako negativní regulátor buněčné proliferace a tumor-supresorový gen, centrum imprintingu DMR2 a gen KCNQ1OT1 (KCNQ1-overlapping transcript 1), který je umístěn na nekódujícím vlákně v oblasti genu KCNQ1, avšak přesahuje až do oblasti DMR2, a který exprimuje nekódující RNA. (Chen, 2007)

Nejčastější příčinou (asi 50 % pacientů) BWS je ztráta methylace v oblasti DMR2 na maternálním chromozómu, která může být způsobena buď prostou epimutací (ztrátou methylových skupin), nebo krátkou intersticiální mikroleleci, což je ovšem výrazně méně častý případ. Asi 2-7 % případů způsobuje naopak zvýšená methylace v oblasti DMR1. Velmi častými příčinami jsou dále paternální uniparentní disomie (asi 20 %) a mutace v genu CDKN1C (asi 10 %). Méně než 2 % tvoří výraznější chromozómové přestavby (translokace, inserce, duplikace) a u zbylých 13-15 % případů zůstává příčina neznámá. (Weksberg et al., 2005)

Ačkoli převážná většina případů se vyskytuje sporadicky, malá část pacientů vykazuje autosomálně dominantní dědičnost (Ping et al., 1989). Zajímavostí týkající se chromozómálních přestaveb je, že zatímco translokace a inverze jsou typicky děděny maternálně, duplikace naopak paternálně (Slavotinek et al., 1997; Weksberg et al., 2005).

BWS je také spojen s řadou neoplasmů, a to jak v prenatálním, tak v postnatálním období vývoje pacienta. Nejčastěji jde o nefroblastom (tzv. Wilmsův tumor) (DeBaum et al., 2002), dále například o hepatoblastom (Hamada et al., 2001) a jiné. V poslední době se pozornost zaměřuje také na souvislost mezi BWS a pankreatoblastomem (Muguerza et al., 2005). Vše naznačuje tomu, že v postižené oblasti 11p15 se nacházejí dva regiony související s tumory (Weksberg et al., 2003). Neboť zatímco u pacientů s Wilmsovým tumorem nacházíme špatnou funkci DMR1 a H19 z domény 1 (Blik et al., 2001; Engel et al., 2000), u pacientů s hepatoblastomy, rhabdomyosarkomy či neuroblastomy jsou změny lokalizovány v doméně dvě, konkrétně jde hlavně o funkci DMR2 a KCNQ1OT1 (Weksberg et al., 2001).

## 4.2 Mikrodeleční syndromy bez vlivu genetického imprintingu

Pokud se v oblasti mikrodelece neobjevuje vliv imprintingu, není pro projev syndromu podstatné, zda je poškozen maternálně či paternálně zděděný chromozóm. Mnoho mikrodelecí je situováno do distálních subtelomerických oblastí a často se jedná o delece terminální (např. Miller-Diekerův syndrom nebo syndrom Monosomie 1p36). Druhou významnou skupinu tvoří mikrodelece v proximálních oblastech blízko centromery, které jsou téměř výhradně intersticiální (např. Williamsův syndrom nebo Smith-Magenisův syndrom).

### 4.2.1 Monosomie 1p36

Terminální delece v distální oblasti 1p36 krátkého raménka jednoho z chromozómů prvního páru se jeví být nejčastější lidskou terminální delecí (Heilstedt et al., 2003b). Způsobuje asi 52 % případů syndromu parciální monosomie 1p36, tento syndrom však bývá způsobován i intersticiální delecí (29 % případů), či komplexnější přestavbou karyotypu (19 % případů) (Shaffer et al., 2006). Celková incidence se odhaduje přibližně na 1/5 000 živě narozených (Heilstedt et al., 2003a). K příznakům syndromu monosomie 1p36 patří velká přední fontanela (100 % pacientů), poruchy motoriky (92 %), střední až vážná mentální retardace (92 %), růstová retardace (85 %), špičatá brada (80 %), poruchy zraku (75 %), epileptické záchvaty (72 %), plochý nos a kořen nosu (65 %), klinodaktylie (64 %), nízko posazené uši (59 %), ušní asymetrie (57 %), poruchy sluchu (56 %), hrubé chování (56 %), ztlustělé ušní boltce (53 %) a hluboko posazené oči (50 %) (Shapira et al., 1997). Pacienti projevují také další poruchy chování, např. 55 % z nich vykazuje sebepoškozující sklony (Gajecka et al., 2007).

Část pacientů vykazuje poněkud odlišný fenotyp – nejvýraznějším znakem je záměna růstové retardace za obezitu, makrosomii, se sklony k hyperfagii. První teorie mluvily o dvou diskrétních skupinách pacientů a uvažovaly o možném vlivu genetického imprintingu, či o souvislosti s rozsahem delece (Keppler-Noreuil et al., 1995). Ovšem následné výzkumy vyvrátily možnost vztahu mezi velikostí delece a rozsahem fenotypového projevu (Gajecka et al., 2007). Ani vliv imprintingu nebyl dosud prokázán, ačkoli by se mohl na konečném fenotypu drobnou mírou podílet. Zdá se však, že variabilita fenotypu souvisí spíše s konkrétní pozicí delece – buď s pozičním efektem nebo s konkrétními deletovanými geny (Gajecka et al., 2007). Převážná většina pacientů s monosomií 1p36 totiž vykazuje delecí v nejdistančnější subtelomerické oblasti, kde je velké množství a vysoká hustota genů, které mohou a nemusí

být do delece (ať terminální či intersticiální) pojaty (Zenker et al., 2002). Fenotypové projevy delecí těchto genů by poté mohly být zesilovány či zeslabovány působením proximálněji umístěných genů, a to s ohledem i na jejich případnou delecí (Gajecka et al., 2007). Intenzita některých projevů s velikostí delece prokazatelně koreluje, např. stupeň mentální retardace (Wu et al., 1999). Převážná většina pacientů má IQ nižší než 60 (Shapira et al., 1997). Nicméně téměř všichni pacienti i s jen velmi malými delecemi (méně než 3 Mb) se projevují základními fenotypovými rysy (Gajecka et al., 2007). I z toho lze usoudit, že většina důležitých genů je situovaných v nejdistančnější subtelomerické oblasti, která je deletovaná u všech pacientů (Wu et al., 1999). Pravděpodobně se však jedná jen o některé kritické geny z této na geny bohaté oblasti (Heilstedt et al., 2003b).

Syndrom parciální monosomie 1p36 je způsobován hemizygotní delecí na krátkém raménku jednoho z chromozómů prvního páru, a to ve velmi variabilním rozsahu asi 1,5 Mb až po více než 10,5 Mb (Heilstedt et al., 2003b). Body zlomu lze pozorovat v oblastech 1p36.13 až 1p36.33, nejčastěji však v oblasti 1p36.22 (Slavotinek et al., 1999). Z toho 60 % delecí postihuje maternálně zděděný chromozóm, 40 % paternálně zděděný chromozóm (Heilstedt et al., 2003b). Delece na maternálním chromozómu bývají menší – zatímco 75 % delecí na maternálním chromozómu je menších než 5 Mb, 62,5 % delecí na paternálním chromozómu je větších než 5 Mb (Heilstedt et al., 2003b). Podobné fenotypové projevy jako u pacientů s parciální monosomií 1p36 byly pozorovány i u pacientů, u nichž byla nalezena duplikace i triplikace kritických oblastí (Gajecka et al., 2005).

Ke zkoumaným genům v subtelomerické oblasti krátkého raménka prvního chromozómu patří například GABRD (GABA receptor delta-subunit gene), gen kódující delta podjednotku receptoru pro neurotransmitter GABA, který je situován asi 1,5 Mb proximálně od telomery a který může mít svůj podíl na příčinách psychomotorické retardace, epilepsie, autismu nebo poruch řeči (Windpassinger et al., 2002). Dalším je KCNAB2, gen kódující alfa podjednotku napětím řízeného draslíkového kanálu, který je kandidátním genem pro dědičnou epilepsii a episodní ataxii typu 1 (Zuberi et al., 1999; Heilstedt et al., 2001).

Monosomie 1p36 donedávna unikala pozornosti, neboť je téměř nezachytitelná cytogenetickým proužkováním. Velmi dobře se na ní osvědčily modernější techniky FISH, CGH a array-CGH (Riegel et al., 1999; Yu et al., 2003; Gajecka et al., 2005) nebo použití molekulárně genetických technik jako je MLPA (Schouten et al., 2002).



**Obrázek 6**

*Pacientka s monosomií 1p36*

– převzato z Gajecka et al., 2007



**Obrázek 7**

*Pacientka s Williamsovým syndromem*

– převzato z Doyle et al., 2004



**Obrázek 8 (uprostřed)**

*Pacientka s monosomií 10q*

– převzato z Petersen et al., 1998

#### **4.2.2 Williamsův syndrom**

Williamsův syndrom (WS), někdy také nazývaný Williams-Beurenův syndrom, byl prvně popsán Williamsem v roce 1961. Jeho incidence se odhaduje na 1/20 000 živě narozených (Frangiskakis et al., 1996). K typickým příznakům WS patří abnormalní tělesný habitus, mírná až středně těžká nedoslýchavost, kardiovaskulární choroby a vysoký krevní tlak, anomálie trávicího traktu včetně divertikulozy, diabetes, bezpříznaková hypertyreóza, snížená hustota minerálů v kostech a velké množství psychických symptomů (Cherniske et al., 2004). IQ pacientů s WS se většinou pohybují při spodní hranici normálu nebo trpí lehčí mentální retardací. Jejich průměrné IQ je přibližně 60 (Bellugi et al., 1999). Lidé s WS bývají velmi vřelí a milí. Mají výborné vyjadřovací schopnosti a jsou až neuvěřitelně zdvořilí. Je pro ně typické, že se nebojí cizích lidí, snaží se navazovat co nejvíce kontaktů a projevují větší zájem o kontakt s dospělými než s vrstevníky. (Doyle et al., 2004) Častěji se u nich objevují také problémy s očima a zrakem – šilhání, snížená ostrost zraku nebo omezené prostorové vidění (Atkinson et al., 2001). Tyto obtíže mohou souviset s narušením drobných kmitavých pohybů oka (van der Geest et al., 2006), které jsou řízeny ze střední nepárové části mozečku (vermis), jež je u pacientů s WS často poškozena (Takagi et al., 1998). Lidé s WS mají mozeček oproti celému mozku (spíše menšímu než je obvyklé) neúměrně zvětšený, obzvláště vermis (Jones et al., 2002).

Příčinou WS je hemizygotní intersticiální delecce v proximální části dlouhého raménka sedmého chromozómu, v oblasti 7q11.23. Oblast, v níž se delecce vyskytují, je dlouhá asi 1,6 Mb a obsahuje asi dvacet genů (DeSilva et al., 2002). Klasický WS je zapříčiněn různými



delecemi většího rozsahu než 500 kb, které ale vždy zahrnují gen ELN, což je gen pro elastin; kromě toho se vyskytují i atypické delece, buď velikosti okolo 300 kb, nebo 83,6 kb (Ewart et al., 1993 in Frangiskakis et al., 1996). Tyto nejmenší delece (83,6 kb) zahrnují vždy dva geny – ELN a LIMK1, gen pro Lim-kinázu 1 (Mizuno et al., 1994 in Frangiskakis et al., 1996). Zejména ELN je pravděpodobně gen, který je zodpovědný za tělesné poruchy spojené s WS, zatímco psychické symptomy jsou spojené spíše se vzdálenějšími přilehlými geny. Pacienti s nejmenším typem delece (83,6 kb) totiž trpí různými tělesnými poruchami, typickými pro WS, avšak nikoli psychickými (Doyle et al., 2004).

#### 4.2.3 Monosomie 10q

Terminální nebo intersticiální delece v subtelomerické oblasti dlouhého raménka jednoho chromozómu z desátého páru se zlomy nejčastěji v oblastech 10q25 a 10q26 není příliš častým jevem. Přestože první případ byl popsán Lewandowským v roce 1978, roku 1998 bylo popsáno pouze 24 případů (Petersen et al., 1998) a roku 2004 necelých 50 (Scigliano et al., 2004). K nejčastějším příznakům patří mikrocefalie a brachycefalie, malformované ušní boltce, trojúhelníkovitý obličej, hypertelorismus, šilhání, prominující a široký kořen nosu, šikmo dolů směřující oční štěrbiny, obloukovitý horní ret a mikrognatie. Dalšími příznaky jsou nízká porodní váha, růstová retardace, vývojové a mentální poruchy, vrozené srdeční vady a anomálie močopohlavního ústrojí. (Petersen et al., 1998)

Delece, ať terminální či intersticiální, dosahuje různých rozměrů, a proto může být její odhalení technicky obtížnější. Zatímco terminální delecí, jejíž zlom je již v oblasti 10q25.3, odhalí už klasické G-proužkování (Petersen et al., 1998), pro odhalení terminálních i intersticiálních delecí se zlomy v 10q26.2 nebo 10q26.3 je třeba použít metodu FISH (Scigliano et al., 2004). Přesná poloha a rozsah delece výrazně ovlivňují fenotypový projev.

V distální oblasti dlouhého raménka chromozómu 10 je situováno několik významných genů, jmenujme například gen PAX2 (paired box 2) – jeden z devíti PAX genů, jejichž postižení souvisí s chorobou ONCR (optic nerve coloboma-renal disease) – který se nachází v oblasti 10q24.3 až 10q25.1 (Narahara et al., 1997). Pravděpodobně je tato oblast důležitá i pro mužskou pohlavní diferenciaci (Wilkie et al., 1993 in Waggoner et al., 1999).

Zdá se také, že u pacientů s delecí v 10q25 se vyskytují s větší frekvencí vrozené srdeční vady a genitální anomálie (v 71 %, resp. 86 %) oproti pacientům s delecí v 10q26 (v 21 %, resp. 26 %) (Waggoner et al., 1999). Naopak pacienti s delecí v 10q26 mají častěji poruchy chování (hyperaktivita, snížená schopnost soustředění, agresivita včetně sebepoškozujícího chování), než pacienti s delecí v 10q25 (Scigliano et al., 2004). Spor se

vede také o korelaci mezi velikostí delece a závažností růstové retardace a mikrocefálie. Zatímco někteří tuto hypotézu podporují (Wulfsberg et al., 1989 in Scigliano et al., 2004), jiní se staví proti ní (Petersen et al., 1998; Scigliano et al., 2004). Zaznamenaných a popsanych případů je však zatím příliš málo pro zodpovězení těchto otázek.

#### 4.2.4 Smith-Magenisův syndrom

Smith-Magenisův syndrom (SMS) byl poprvé popsán Smithem roku 1982. Jeho incidence v populacích všech etnik se odhaduje na 1/25 000 (Greenberg et al., 1991). K typickým symptomům SMS patří střední až těžká mentální retardace, brachycefalie a mikrocefalie, prominující čelo, široký plochý obličej, prognatie, krátké a široké ruce, poruchy zraku a sluchu, poruchy chování (agresivita, sebepoškozování) a poruchy spánku (Lockwood et al., 1988).

SMS je způsobován z 90 % intersticiální delecí v proximální oblasti 17p11.2 krátkého raménka jednoho ze sedmnáctého páru chromozómů (Vlangos et al., 2003). Z nich asi 76 % (Potocki et al., 2003) vykazuje velmi podobnou delecí o velikosti přibližně 3,5 Mb (Gropman et al., 2007). Tato delece vzniká během gametogeneze nealelickou homologní rekombinací mezi dvěma asi 200 kb dlouhými sekvencemi tzv. low-copy repeats (LCR), které postiženou oblast z obou stran lemují (Shaw et al., 2002). Asi u 12 % případů je rozsah delece menší, a naopak 10 % případů vykazuje delecí větší, navíc 2 % případů jsou způsobeny komplexnější karyotypovou přestavbou (Potocki et al., 2003). Nejmenší delece nedosahují velikosti ani 1,5 Mb, největší zahrnují kolem 9 Mb (Trask et al., 1996 in Vlangos et al., 2003). Fenotypový projev však je velmi podobný u všech pacientů bez ohledu na velikost delece (Potocki et al., 2003). Terminální delece se zlomem v této oblasti se nevyskylují, pravděpodobně jsou tak velké, že způsobují letalitu (Moncla et al., 1991).

Zbylé případy vykazují pouze heterozygotní mutaci v genu *RAI1* (regulátor transkripce) a typický fenotyp SMS se u nich nerozvíjí plně (Potocki et al., 2003). Všichni pacienti s delecí v 17p11.2 mají gen *RAI1* deletovaný (Seranski et al., 2000) a zdá se, že právě jeho absence způsobuje celkový fenotypový projev (Liburd et al., 2001). Pouze některé specifické znaky jsou zřejmě kódovány zvláštními geny, např. *MYO15A*, jehož ztráta je spojena s horšením citlivosti sluchu (Liburd et al., 2001).

Zajímavým projevem SMS, který má pravděpodobně svůj původ také v jiném genu, než je *RAI1*, jsou poruchy spánku a denních rytmů. Postižení chodí brzy spát, často se v noci budí, ráno se brzy probouzí a během dne usínají (DeLeersnyder et al., 2001). Příčinou toho je invertovaná sekrece melatoninu, tj. přes den vysoká, v noci nízká (Potocki et al., 2000). To je

zřejmě způsobeno delecí genu COPS3 (COP9 subunit 3), který kóduje podjednotku 3 komplexu pro převod signálu COP9 (Chamovitz et al., 1996).

#### Obrázek 9

*Pacientka se Smith-Magenisovým syndromem*

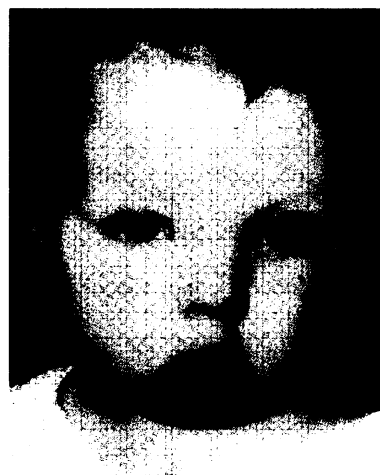
– převzato z Moncla et al., 1991



#### Obrázek 11

*Pacient s DiGeorgovým syndromem*

– převzato z Goodship et al., 1998



#### Obrázek 10

*Pacient s Miller-Diekerovým syndromem*

– převzato z Dobyns et al., 1991

#### 4.2.5 Miller-Diekerův syndrom

Miller-Diekerův syndrom (MDS) je nejvíce spojován s lissencefalií, což je vývojová vada mozkové tkáně způsobená chybnou migrací neuroblastů. Projevuje se v různé intenzitě, a proto se dělí do šesti stupňů podle snižující se závažnosti. Stupeň 1 znamená úplnou agyrii, stupně 2 a 3 přechod mezi agyrií a pachygyrií a stupeň 4 pouze pachygyri (de Rijk-van Andel et al., 1990 in Yingling et al., 2003). Zatímco pacienti s izolovanou formou lissencefalie trpí nejvýše stupněm 2 a lehčími stupni, lissencefalie pacientů s MDS velmi často dosahuje stupně 1 a projevuje se charakteristickými obličejovými znaky – prominující čelo s prohlubněmi na spáncích, krátký nos s obracejícím se chřipím, světlý zesílený horní ret, oči daleko od sebe, nízko položené uši a malá čelist. Způsobuje rovněž těžkou mentální a růstovou retardaci. MDS se dále projevuje hypotonií, srdečními malformacemi, omfalokélou, tříselnou kýlou, neprůchozím dvanácterníkem, anomálií ledvin, kryptorchismem, polydaktylií, klinodaktylií,

kamptodaktylií, příčnou dlaňovou rýhou nebo nadměrným množstvím plodové vody během těhotenství. (Dobyns et al., 1991) Poprvé byla lissencefalie spojená s dalšími postiženími (později označená jako MDS) popsána Millerem roku 1963 a poté až Diekerem roku 1969.

MDS i izolovaná forma lissencefalie jsou spjaty s hemizygotní delecí v subtelomerické oblasti krátkého raménka chromozómu 17, konkrétně v oblasti 17p13.3. Všichni pacienti s MDS a většina pacientů s izolovanou lissencefalií mají parciální monosomii v této oblasti (Ledbetter et al., 1992). Někdy se může jednat pouze o missense bodovou mutaci, ovšem tyto pacienti trpí mírnější formou lissencefalie a zejména podstatně mírnějšími vnějšími fenotypovými příznaky (Cardoso et al., 2000). Zásadním genem pro vznik lissencefalie je LIS1, který je umístěn ve vzdálenosti přibližně 2,9 Mb od konce chromozómu. Právě tento gen je deletován nebo jinak poškozen u všech pacientů s MDS i izolovanou lissencefalií. Ovšem zatímco delece u pacientů s izolovanou lissencefalií je umístěna spíše proximálně, blíže centromere, u pacientů s MDS je deletován úsek distálnější, blíže telomeře (Chong et al., 1997).

Je tedy zřejmé, že příčiny fenotypových projevů bylo třeba hledat v této distální 3 Mb oblasti. Bylo v ní identifikováno již 21 genů, ale předpokládá se, že jejich celkový počet může být 28 (Yingling et al., 2003). Navíc některé z nich musí mít podíl na vážnější formě lissencefalie. V průběhu podrobného studia byl objeven kritický region o velikosti přibližně 400 kb, který zahrnuje osm genů : PRP8, jedna z nejkonzervovanějších součástí spliceosomu, RILP (Rab7-interacting lysosomal protein), hrající roli ve vazbě mezi lysosomy a dynein-dynaktinovými motory, SREC (scavenger receptor expressed by endothelial cells), ovlivňující endocytosu modifikovaných lipoproteinů, PITP $\alpha$ , důležitý pro membránový transport a signalizaci pomocí inositolových lipidů, SKIP (skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase), který může negativně regulovat aktinový cytoskelet, MYO1C, člen rodiny myosinových motorů typu I, CRK, SH2/SH3 adaptorová molekula se dvojitým možným alternativním sestřihem, a 14-3-3 $\epsilon$ , multifunkční vnitrobuněčný protein. Právě tato oblast je pravděpodobně zodpovědná za vnější projevy MDS, neboť jimi trpí i pacienti s krátkou intersticiální delecí v této oblasti, kteří ovšem nemají lissencefalií (Cardoso et al., 2003). Delece jednoho z genů CRK či 14-3-3 $\epsilon$  nebo obou v kombinaci s delecí LIS1 je pravděpodobně také hlavní příčinou nejhoršího stupně lissencefalie (Cardoso et al., 2003).

#### **4.2.6 DiGeorgův syndrom / Velokardiofaciální syndrom**

Lidský chromozóm 22 se stává častým objektem různých přestaveb včetně mikrodelecí. Jako mikrodeleční syndromy byly popsány DiGeorgův syndrom (DGS; DiGeorgem roku

1965) a Velokardiofaciální syndrom (VCFS; Shprintzenem roku 1978). Molekulárně genetická analýza však dokázala, že oba tyto syndromy jsou projevem téže hemizygotní delecí na jednom z chromosomu 22. páru, konkrétně v oblasti 22q11.2 na dlouhém raménku. 83 % pacientů s DGS/VCFS má intersticiální delecí na chromozómu 22. Z toho 90 % stejnou asi 3 Mb rozsáhlou delecí, zbylí pacienti mají povětšinou delecí buď větší v rozsahu 4 – 6 Mb, nebo menší v rozsahu asi 1,5 Mb. U dalších pacientů se vyskytují delecí na chromozómu 10 nebo bodové mutace v genu TBX1. (Carlson et al., 1997) Spektrum fenotypových projevů DGS/VCFS je velmi pestré co do variability projevů, tak i do intenzity projevů – DGS a VCFS reprezentují ony póly intenzity projevů, DGS těžké a VCFS mírné (Edelmann et al., 1999).

K typickým faciálním dysmorfii u pacientů s DGS/VCFS patří hypertelorismus, napuclá oční víčka, přeskládané ušní boltce, hruškovitý nos, mikrogнатie a rozštěp patra (McDonald-McGinn et al., 1999 in Saitta et al., 2004).

75 % pacientů s delecí trpí srdečními vadami, které jsou nejčastější příčinou jejich smrti (Ryan et al., 1997). U některých lze pozorovat také anomálie distálního skeletu, obratlů a páteře (Kobrynski et Sullivan, 2007). Nežádka trpí pacienti i anomáliemi ledvin (ageneze, zdvojené ledviny, dysplastické ledviny nebo zdvojené močovody) (Ryan et al., 1997).

K výrazným znakům DGS/VCFS patří i degenerace či absence thymu, v následku čehož dochází u 75 – 80 % pacientů k nedostatečné produkci T-lymfocytů; necelé 1 % pacientů nemá dokonce žádné T-lymfocyty (Jawad et al., 2001). Zajímavé je, že nebyla pozorována žádná korelace mezi stupněm imunodeficiency a intenzitou dalšího fenotypového projevu (Sullivan et al., 1998). Důsledkem degenerace thymu bývá také hypokalcemie. Pacienti s DGS/VCFS také častěji trpí juvenilní reumatoidní artritidou, trombocytopenií a některými dalšími chorobami (Ryan et al., 1997).

IQ pacientů s delecí 22q11.2 se pohybuje v průměru kolem 70, vyskytuje se u nich žádná až středně těžká mentální retardace (Gerdes et al., 1999). Někteří pacienti vykazují hyperaktivitu, někdy také schizofrenii nebo autismus (Parissis et Milonas, 2005).

Pravděpodobnost výskytu DGS/VCFS u novorozenců je v průměru asi 1/5950, není však stejná u všech populací; zatímco u bělochů, černochů a Asiatů je přibližně 1/6000 – 1/6500, u hispánských populací je to 1/3800 (Botto et al., 2003). Asi 8 % pacientů zemře do jednoho roku života, z toho asi polovina do 1 měsíce (Ryan et al., 1997).

Jak bylo řečeno výše, u 83 % pacientů byla nalezena delecí v oblasti 22q11.2. Důvodem častých delecí (i duplikací, viz níže) jsou čtyři bloky LCR (low-copy repeats), označované písmeny A – D ve směru od centromery k telomeře, schopné rekombinace. Asi

87 % delecí zahrnuje úsek A-D, 8 % úsek A-B, 2 % úsek A-C a 2 % úsek mezi D a některým z nestandardních míst poblíž bloku A (Shaikh et al., 2000). Přibližně ve 28 % případech se jedná o delece zděděné (z toho v 75 % maternálně), ve zbylých případech se jedná o delece sporadické (Ryan et al., 1997). K aberantním přestavbám dochází pravděpodobně během meiózy pohlavních buněk (Saitta et al., 2004).

V oblasti 22q11.2 bylo lokalizováno asi 30 genů, z nichž velká pozornost je věnována TBX1, genu pro transkripční faktor hrající významnou roli v raném vývoji obratlů. Bodová mutace v tomto genu způsobuje totiž částečně fenotyp DGS/VCFS, a to zejména faciální dysmorfie (Yagi et al., 2003).

Fenotyp typický pro VCFS a navíc problémy se sluchem a anomálie ledvin způsobuje také parciální monosomie v oblasti 10p13 – 10p14 na krátkém raménku jednoho z chromozómů desátého páru (Berend et al., 2000). Tato delece mívá rozsah asi 2 Mb (Daw et al., 1996 in Berend et al., 2000) a vyskytuje se s frekvencí asi 1/200 000 (Berend et al., 2000). Následky této delece byly poprvé popsány Elliottem roku 1970 a někdy bývají označovány jako DiGeorgův syndrom II.

Stejný úsek se stejnými body zlomu (v blocích LCR), rovněž o velikosti nejčastěji 3 Mb a v některých případech 4 – 6 Mb nebo cca 1,5 Mb velký, který bývá u pacientů DGS/VCFS deletován, může být i duplikován (Ensenauer et al., 2003). Fenotypové projevy jsou velmi variabilní – lze pozorovat spojitě spektrum pacientů od těch, kteří neprojevují žádné signifikantní poruchy či anomálie, až po pacienty s těžkými postiženími velmi podobnými s DGS (Yu et al., 2008). Duplikace je klasifikována jako samostatný syndrom (Portnoi et al., 2005).

Delece v oblasti 22q11.2 se vyskytuje také u některých pacientů trpících CHARGE (coloboma, heart, atresia, retardation of growth, genitourinary problems, ear abnormalities).

### **4.3 Deleční syndromy**

Ačkoli jsou klasické deleční syndromy povětšinou průkazně detekovatelné cytogenetickým proužkováním, molekulárně genetické metody hrají významnou roli v jejich výzkumu. K nejfrekventovanějším a intenzivně zkoumaným patří syndrom Cri du chat a Wolf-Hirschhornův syndrom.

### 4.3.1 Cri du chat syndrom

První případ syndromu kočičího křiku (Cri du chat – CdCS) byl popsán roku 1963 Lejeunem. Jeho prevalence v populaci se odhaduje na 1/40 000 až 1/50 000 živě narozených (Cornish et al., 1999). Při narození se projevuje nízkou porodní váhou (100 % pacientů), mikrocefalií (100 %), mikrognathie (96,7 %), typické „mňoukání“ (95,9 %), abnormální dermatoglyfy (92 %), epikantus (90,2 %), velký kořen nosu (87,2 %), kulatý obličej (83,5 %), hypertelorismus (81,4 %), dolů ohnuté koutky úst (81 %), nízko posazené uši (69,8 %) a šikmo se svažující oční štěrbin (56,9 %) (Mainardi et al., 2006 in Mainardi, 2006). V průběhu vývoje se postupně objevují další symptomy – krátké philtrum (87,8 % pacientů), krátké metakarpální a metatarzální kosti (82,6 %, resp. 75 %), zubní předkus (75 %), obličej se protahuje a zužuje (70,8 %), oční štěrbin se srovnávají do horizontální roviny (70,2 %), plný spodní ret (45,2 %), divergentní šilhání (44,7 %), prominující nadočnicové oblouky (31 %) a šedivění vlasů (30,4 %) (Mainardi et al., 2006 in Mainardi, 2006). CdCS vykazuje mortalitu asi 10 %, z toho 75 % během prvního měsíce a 90 % během prvního roku života (Niebuhr, 1978 in Mainardi, 2006).

Příčinou CdCS je nejčastěji hemizygotní delecce v distální části jednoho z chromozómů pátého páru, a to v rozsahu 5 – 40 Mb (Simmons et al., 1995 in Mainardi, 2006). Zde se totiž vyskytuje vysoký počet repetitivních sekvencí, zejména v oblasti 5p15.2, což způsobuje nestabilitu tohoto regionu (Simmons et al., 1997). Nebyl prokázán žádný vliv genetického imprintingu, ačkoli je častěji (80-90 %) poškozen paternálně zděděný chromozóm (Mainardi et al., 2001). Podle studie Mainardiho et al. je 77,5 % případů CdCS způsobeno terminální delecí, 8,75 % intersticiální delecí, 5 % de novo translokací, 3,75 % zděděnou translokací, 3,75 % jsou mozaiky ze dvou linií a 1,25 % způsobuje delecce s původem v paternální inverzi (Mainardi et al., 2001). Byl dokonce zaznamenán případ, kdy pacient byl mozaikou tří linií – 73 % buněk s normálním karyotypem, 19 % buněk s terminální delecí se zlomem v 5p13.1 a 8 % buněk s duplikací oblasti 5p15.2 (Kitsiou et al., 2004).

Velikost delecce a intenzita fenotypových projevů spolu nekorelují (Marinescu et al., 1999). Avšak můžeme odlišit jednotlivé projevy v souvislosti s umístěním delecce. Zdá se proto, že existují vcelku diskrétně oddělené úseky, jejichž delecce způsobí konkrétní fenotypový projev. Mluví pro to i fakt, že jsou registrováni lidé s intersticiální delecí v oblasti 5p14 bez jakýchkoli klinických příznaků (Overhauser et al., 1986). Různé týmy mapovaly distální část raménka (pomocí metod FISH, CGH, PCR a dalších), nejčastěji hledaly kritické regiony pro mentální retardaci, vadu řeči, faciální dysmorfie a typické „mňoukání“. Velmi úplné mapování publikovali Zhang et al. Situovali kritický region pro vadu řeči do oblasti 3.2

– 6,4 Mb od telomery (části 5p15.31 a 5p15.32), pro „mňoukání“ do oblasti 6 – 7,5 Mb (5p15.31) a pro faciální dysmorfie do oblasti 9 – 11,4 Mb (5p15.2). A dále tři kritické regiony pro mentální retardaci – MR I v oblasti 8 – 9,3 Mb (5p15.31), MR II v oblasti 9,3 – 18,3 Mb (5p15.1 a 5p15.2) a MR III v oblasti 18,3 – 31,9 Mb (5p14) – jejichž delece způsobují různou intenzitu mentální retardace. Separátní delece v MR I způsobuje střední stupeň retardace, v MR II mírný a v MR III dokonce nezpůsobuje výrazné poruchy. Delece MR I ve spojení s delecí MR II nebo MR III způsobuje vážnou retardaci a nejzávažnější retardace je způsobena delecí všech tří kritických oblastí. (Zhang et al., 2005)

Intenzivní výzkum se věnuje i kandidátním genům. V oblasti 5p15.2 byly popsány geny SEMAF (lidský semaforin F gen) (Simmons et al., 1998) a CTNND2 kódující lidský  $\delta$ -katenin (Medina et al., 2000), jejichž delece mohou způsobit chybný vývoj nervové soustavy, což může způsobovat mentální retardaci. Jiné tři kandidátní geny jsou sledovány jako možní původci charakteristického „mňoukání“ (Wu et al., 2005).

### Obrázek 13

*Pacient s Wolf-Hirschhornovým syndromem*

– převzato ze Zollino et al., 2003



### Obrázek 12

*Pacient se syndromem Cri du chat*

– převzato z Cornish, 2002

### 4.3.2 Wolf-Hirschhornův syndrom

První pacient trpící Wolf-Hirschhornovým syndromem (WHS) byl popsán Hirschhornem a Cooperem roku 1961, další až roku 1965 Wolfem a jeho týmem. U živě narozených se vyskytuje s pravděpodobností asi 1/50 000 (Gorlin et al., 1990 in Shannon et al., 2001). WHS se vyznačuje vcelku vysokou letalitou, podle studie Shannona et al. umírá asi 17 % dětí s WHS do jednoho roku a 21 % do dvou let života, medián délky života studovaných pacientů byl 34 let. Nejčastějšími příčinami úmrtí byly anoxie, záněty dolních



cest dýchacích, vrozené srdeční vady a anomálie dalších vnitřních orgánů, zejména ledvin. (Shannon et al., 2001)

U naprosté většiny pacientů se vyskytují kraniofaciální defekty, epileptické záchvaty, růstová retardace a mentální retardace. Přibližně polovina pacientů vykazuje hypospadii, srdeční vady, rozštěp rtu a patra, kolobom, klinodaktylii, skoliózu a jiné kosterní defekty. Často se také objevují problémy se zuby a poruchy sluchu. (Battaglia et al., 2001 in Bergemann et al., 2005)

WHS je způsobován nejčastěji hemizygotní terminální či (méně často) intersticiální delecí v distální části krátkého raménka čtvrtého chromozómu. Asi 20 % postižených trpí delecí s bodem zlomu v oblasti 4p16.3 a má deletováno distálních cca 5 Mb; zbylí pacienti mají rozsáhlejší delecce se zlomy až do oblasti 4p14 (Shannon et al., 2001). Asi 72 % případů je způsobeno delecí de novo, dalších asi 20 % translokací (častěji paternálního původu) a zbylých asi 8 % jinými přestavbami (Shannon et al., 2001).

Při mapování deletovaných oblastí chromozómu byl jako první odhalen kritický region WHSCR přibližně v oblasti 1,9 – 2,1 Mb od telomery (Wright et al., 1997). Zahrnuje i kandidátní geny WHSC1 (také označovaný jako MMSET), který kóduje chromatin remodelující enzym, a WHSC2, jehož funkce není zcela objasněná a jehož význam pro WHS je v poslední době spíše zpochybňován, které jsou úplně nebo částečně deletovány u všech pacientů s WHS (Zollino et al., 2003; Bergemann et al., 2005). Ovšem delecce této oblasti zdaleka nestačí k plnému typickému projevu WHS. Jako druhý kritický region WHSCR2 byla označena distálněji přilehlá oblast 1,2 – 1,9 Mb od telomery, v níž je dle odhadů situována asi desítky genů, z nichž některé nebyly ještě popsány a zmapovány (Zollino et al., 2003). Šesti z nich je věnována výrazná pozornost; jedná se o geny LETM1, který kóduje transmembránový protein s doménami coiled-coil a lecinového zipu, FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3), transmembránová tyrosin-kináza s receptorem pro růstové faktory rodiny FGF, TACC3 (transforming acidic coiled-coil containing protein 3), jehož hemizygozita vede k apoptóze hematopoetických buněk a k retardaci růstu, SLBP (stem-loop-binding protein), vážící se k mRNA kódujícím histony, HDNTNP (human ortholog of dorsal neural tube nuclear protein), regulační protein přítomný v neurální trubici, a HSPX153, kódující transkripční faktory (Bergemann et al., 2005).

Velmi mírná varianta WHS s delecí v 4p16 byla dříve popisována jako Pitt-Rogers-Danksův syndrom (Battaglia et Carey, 1998).

## 5. Závěr

Techniky molekulární cytogenetiky prodělaly v průběhu posledních tří desetiletí bouřlivý vývoj. Byly (a jsou) postupně rozvíjeny, zdokonalovány a uváděny do výzkumné a klinické praxe. Ovšem s rostoucími možnostmi zkoumání pomocí těchto metod rostou i očekávání a požadavky cytogenetiků. Tato očekávání rozhodně nejsou planá. Nedávný vývoj jasně dokazuje, že inovační tempo molekulární cytogenetiky se nesnižuje. Mnohé metody ještě před několika lety technicky i finančně velmi nákladné se dnes běžně užívají ve výzkumu i klinické diagnostice. Je dobře možné, že brzy i metody dnes označované za nejmodernější budou zastaralé a nová – přesnější a dokonalejší – metodika ovládne pole cytogenetiky.

Molekulárně cytogenetické metody mají velkou zásluhu na objevení a zkoumání mikrodelečních syndromů. Přestože pozornost věnovaná mikrodelečním syndromům se čím dál více zvyšuje, mnohé pro nás stále zůstává skryté. Pravděpodobně zdaleka všechny ještě nebyly objeveny, zmapovány a popsány. Syndromy podrobněji popisované v této práci byly diagnostikovány u většího množství pacientů, mnoho mikrodelecí se však vyskytlo jen ojediněle či v několika málo případech. I odhad, že mikrodeleční syndromy zodpovídají za asi 5 % mentálních retardací, je zřejmě podhodnocený. Napovídají tomu jak relativně krátká dosavadní doba zkoumání, tak ještě ne zcela dokonalé metody a rovněž fenotypová variabilita mikrodelečních syndromů. Ale přes veškeré neznámé a málo známé, molekulární cytogenetika dokázala, že kryptické delece (ale i duplikace či translokace) už přestaly být oblastí poznání, o které platí ono známé „hic sunt leones“.

Výsledek je všeobecně známý, avšak příčina již pozvolna přestává být skrytá...

## Vysvětlivky lékařských pojmů

*agyrie* – vyhlazené mozkové fisury

*anoxie* – nepřítomnost kyslíku v organismu, orgánech, tkáních či buňkách

*ataxie* – porucha hybnosti projevující se např. nesouměrností pohybů a jejich špatnou koordinací

*atresie* – neprůchodnost dutého orgánu

*brachycefalie* – krátkolebost

*dermatoglyfy* – linie na prstech, dlaních a chodidlech

*divertikulóza* – mnohočetný výskyt divertiklů (vychlípenin stěny nebo sliznice) v trávicí trubici, nejčastěji tlustém střevě

*epikantus* – kožní řasa vycházející z horního víčka a zakrývající vnitřní koutek oka

*hemihypertrofie* – nesejná velikost obou polovin těla

*hyperfagie* – chorobné přejídání se

*hypertelorismus* – nadměrně vzdálené oči

*hypertyreóza* – zvýšená činnost štítné žlázy

*hypogonadismus* – porucha funkce pohlavních žláz vedoucí k nedostatečné tvorbě pohlavních hormonů a neplodnosti

*hypokalémie* – snížená hladina vápníku v krvi

*hypospadiie* – abnormální vyústění močové trubice na spodní straně penisu

*hypotonie* – snížené svalové napětí

*kamptodaktylie* – trvale sevřené prsty

*klinodaktylie* – malformace prstů, kdy střední článek má klínovitý tvar a koncový článek uhýbá do strany

*kolobom* – defekt duhovky, případně i dalších struktur oka

*kryptorchismus* – nesestouplé varle nebo varlata

*lissencefalie* – vývojová vada mozkové tkáně v průběhu embryonálního vývoje způsobená chybnou migrací neuroblastů, je charakteristická mimo jiné vyhlazenými mozkovými fisurami

*makroglosie* – nadměrně zvětšený jazyk

*makrosomie* – zvětšení celého těla či orgánů

*mikrocefalie* – předčasně ukončený vývoj mozku a mozkovny

*mikrognatie* – abnormálně málo vyvinutá čelist

*nevus flammeus* - řadí se mezi benigní nádory z krevních cév, jde o malformaci povrchových kožních cév, většinou tvoří různě velké, ostře ohraničené plochy barvy červené až červenomodré

*omfalokéla* – vyřeznutí střevních kliček do pupečníku

*pachygyrie* – široké a mělké mozkové fisury

*philtrum* – střední část horního rtu s vertikálně probíhajícím žlábkem

*polydaktylie* – zmnožení počtu prstů na horní nebo dolní končetině  
*prognatie* – výrazný růst a vysunutí horní čelisti i se zuby, které ret nestačí pokrývat  
*skolióza* – vychýlení páteře do strany

## **Použité zkratky**

*AS* ... Angelmanův syndrom  
*BWS* ... Beckwith-Wiedemannův syndrom  
*CdCS* ... Cri du chat syndrom  
*CGH* ... comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace)  
*CISS* ... chromosomal in situ suppression  
*DGS* ... DiGeorgův syndrom  
*FISH* ... fluorescent in situ hybridization (fluorescenční in situ hybridizace)  
*GABA* ... kyselina gama-aminobutanová  
*GISH* ... genomic in situ hybridization (genomová in situ hybridizace)  
*CHARGE* ... coloboma, heart defects, atresia of the nasal choanae, retardation of growth, genitourinary problems, ear abnormalities (kolobom, srdeční poruchy, atresie nosních choan, růstová retardace, problémy s močopohlavním traktem, abnormality uší)  
*LCR* ... low-copy repeats  
*MDS* ... Miller-Diekerův syndrom  
*mFISH* ... multicolour FISH (mnohobarevná FISH)  
*MLPA* ... multiplex ligation-dependent probe amplification  
*MMSET* ... multiple myeloma SET domain  
*NOR* ... nucleolus organizer region (oblast organizátoru jaderka)  
*PCR* ... polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)  
*PWS* ... Prader-Williho syndrom  
*SKY* ... spectral karyotyping (spektrální karyotypování)  
*SMS* ... Smith-Magenisův syndrom  
*SNP* ... single nucleotide polymorphisms (jednonukleotidové polymorfismy)  
*TAR* ... telomere associated repeats  
*VCFS* ... Velokardiofaciální syndrom  
*WHS* ... Wolf-Hirschhornův syndrom  
*WHSC1* ... Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1  
*WHSCR* ... Wolf-Hirschhorn syndrome critical region  
*WHSCR2* ... Wolf-Hirschhorn syndrome critical region 2  
*WS* ... Williamsův syndrom

## Citovaná literatura

### \* literatura citovaná sekundárně

- Atkinson J, Anker S, Braddick O, Nokes L, Mason A, Braddick F (2001) Visual and visuospatial development in young children with Williams syndrome. *Dev Med Child Neurol*, 43, 330-337
- Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG (2007) The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet*, 143A, 1850-1857
- Battaglia A, Carey JC (1998) Wolf-Hirschhorn syndrome and Pitt-Rogers-Danks syndrome. *Am J Med Genet*, 75, 541
- \* Battaglia A, Carey JC, Wright TJ (2001) Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Adv Pediatr*, 48, 75-113
- Bejjani BA, Shaffer LG (2006) Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *J Mol Diagn*, 8, 528-533
- Bellugi U, Adolphs R, Cassady C, Chiles M (1999) Towards the neural basis for hypersociability in a genetic syndrome. *Neuroreport*, 10, 1653-1657
- Berend SA, Spikes AS, Kashork CD, Wu JM, Daw SC, Scambler PJ, Shaffer LG (2000) Dual-probe fluorescence in situ hybridization assay for detecting deletions associated with VCFS/DiGeorge syndrome I and DiGeorge syndrome II loci. *Am J Med Genet*, 91, 313-317
- Bergemann AD, Cole F, Hirschhorn K (2005) The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Trends Genet*, 21 (3), 188-195
- Bliek J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, Mannens MM (2001) Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet*, 10, 467-476
- Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, Merritt RK, O'Leary LA, Wong LY, Elixson EM, Mahle WT, Campbell RM (2003) A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*, 112, 101-107
- Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D (1998) A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet*, 63, 1153-1159
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Färber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Bürger J, Nöthen, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AMW, Halley DJJ, Schrandt-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalonde M, Nicholls RD, Friend K, Schulze A, Matthijs G, Kokkonen H, Hilbert P, Van Maldergem L, Glover G, Carbonell P, Willems P, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B (1998) Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 63, 170-180
- Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, Kuc JA, Ramocki MB, Mewborn SK, Dudliceck LL, May LF, Mills PL, Das S, Pilz DT, Dobyns WB, Ledbetter DH (2000) The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet*, 9, 3019-3028
- Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH (2003) Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet*, 72, 918-930
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE (1997) Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet*, 61, 620-629
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA (2000) Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet*, 97, 136-146
- Clayton-Smith J, Laan L (2003) Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet*, 40, 87-95
- Conrad DR, Andrews TD, Carter NP, Hurler ME, Pritchard JK (2006) A high resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet*, 38, 75-81
- Cornish KM, Cross G, Green A, Willatt L, Bradshaw JM (1999) A neuropsychological-genetic profile of atypical Cri du chat syndrome: implications for prognosis. *J Med Genet*, 36, 567-570
- \* Daw SCM, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J-I, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T, Goodship J, Scambler P (1996) A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nature Genet*, 13, 458-460
- DeBaum MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP (2002) Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet*, 70, 604-611
- DeLeersnyder H, de Blois MC, Claustrat B, Romana S, Albrecht U, von Kleist-Retzow JC, Delobel B, Viot G, Lyonnet S, Vekemans M, Munnich A (2001) Inversion of the circadian rhythm of melatonin in the Smith-Magenis syndrome. *J Pediatr*, 139, 111-116
- \* de Rijk-van Andel JF, Arts WF, Barth PG, Loonen MC (1990) Diagnostic features and clinical signs of 21 patients with lissencephaly type 1. *Dev Med Child Neurol*, 32, 707-717
- DeSilva U, Elnitski L, Idol JR, Doyle JL, Gan W, Thomas JW, Schwartz S, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, McDowell JC, Blakesley RW, Bouffard GG, Thomas PJ, Touchman JW, Miller W, Green ED (2002) Generation and comparative analysis of approximately 3.3 Mb of mouse genomic sequence orthologous to the region of human chromosome 7q11.23 implicated in Williams syndrome. *Genome Res*, 12(1), 3-15
- De Vries BBA, van den Ouweland AMW, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJJ, Sandkuijl LA, Oostra BA, Tibben A, Niermeijer (1997) Screening and diagnosis for the Fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. *Am J Hum Genet*, 61, 660-667
- De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C (2003) Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 40, 385-398
- Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L, Ledbetter DH (1991) Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker Syndrome. *Am J Hum Genet*, 48, 584-594
- Doyle TF, Bellugi U, Korenberg JR, Graham J (2004) „Everybody in the world is my friend“ – hypersociability in young children with Williams syndrome. *Am J Med Genet*, 124A, 263-273

- Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE (1999) Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with Velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet*, 64, 1076-1086
- \* Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER (1994) Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet*, 46, 168-74
- Engel JR, Smallwood A, Harper A, Higgins MJ, Oshimura M, Reik W, Schofield PN, Maher ER (2000) Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet*, 37, 921-926
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM (2003) Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet*, 73, 1027-1040
- \* Ewart AK, Morris CA, Atkinson DL, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock D, Leppert M, Keating MT (1993) Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genet*, 5, 11-16
- Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, Garcia-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, Garcia-Alix A, Delicado A (2005) Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet*, 68, 373-378
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, 6, 1305-1314
- Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, Klein BP, Ensing GJ, Everett LA, Green ED, Pröschel C, Gutowski NJ, Noble M, Atkinson DL, Odelberg SJ, Keating MT (1996) LIM-kinase hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell*, 86, 59-69
- GajECKA M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet*, 145C, 346-356
- GajECKA M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Thiesen A, Rice R, Rice DP, Shaffer LG (2005) Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *Eur J Hum Genet*, 13, 139-149
- Gerdes M, Solot C, Wang PP, Moss E, LaRossa D, Randall P, Goldmuntz E, Clark BJ, Driscoll DA, Jawad A, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Batshaw ML, Zackai EH (1999) Cognitive and behavior profile of preschool children with chromosome 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet*, 85, 127-133
- \* Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS (1990) Syndromes of the head and neck. *New York: Oxford University Press*, 46-48
- Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R, Magenis RE, Smith ACM, Richter SF, Kondo I, Dobyns WB, Patel PI, Lupski JR (1991) Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet*, 49, 1207-1218
- Gropman AL, Elsea S, Duncan WC Jr, Smith ACM (2007) New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol*, 20(2), 125-34
- Hamada Y, Takada K, Fukunaga S, Hioki K (2001) Hepatoblastoma associated with Beckwith-Wiedemann syndrome and hemihypertrophy. *Pediatr Surg Int*, 19, 112-114
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003a) Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet*, 64, 310-316
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003b) Physical map of 1p36. placement of breakpoints in monosomy 1p36. and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet*, 72, 1200-1212
- Heilstedt HA, Burgess DL, Anderson AE, Chedrawi A, Tharp B, Lee O, Kashork CD, Starkey DE, Wu YQ, Noebels JL, Shaffer LG, Shapira SK (2001) Loss of the potassium channel beta-subunit gene, KCNAB2, is associated with epilepsy in patients with 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia*, 42, 1103-1111
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*, 86, 115-121
- Chandley AC (1989) Asymmetry in chromosome pairing: a major factor in de novo mutation and the production of genetic disease in man. *J Med Genet*, 26, 546-552
- Chen CP (2007) Syndromes and disorders associated with omphalocoele (I): Beckwith-Wiedemann syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol.46, no.2, 96-102
- Cherniske EM, Carpenter TO, Klaiman C, Young E, Bregman J, Insogna K, Schultz RT, Pober BR (2004) Multisystem study of 20 older adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet*, 131A, 255-264
- Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith AC, Dobyns WB, Ledbetter DH (1997) A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet*, 6, 147-155
- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet*, 57, 40-48
- Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE (2001) Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr*, 139, 715-723
- Jones W, Hesselink J, Courchesne E, Duncan T, Matsuda K, Bellugi U (2002) Cerebral abnormalities in infants and toddlers with Williams syndrome. *Dev Med Child Neurol*, 44, 688-694
- Kepler-Noreuil KM, Carroll AJ, Finley WH, Rutledge SL (1995) Chromosome 1p terminal deletion: Report of new findings and conformation of two characteristic phenotypes. *J Med Genet*, 32, 619-622
- \* Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*, 15, 70-73
- Kitsiou S, Kolialexi A, Mavrou A (2004) Mosaic Cri du chat syndrome in a patient exhibiting three 5p cell lines. *Prenat Diagn*, 24, 578-579
- \* Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 354, 1676-1681
- Kobrynski LJ, Sullivan KE (2007) Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, 370, 1443-1452
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA, Merckx GFM, Knoers NVAM, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CMA, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BBA, Sistermans EA (2004) Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*, 41, 892-899

- Krantz ID, Spinner NB** (2007) Novel microdeletion syndromes. *Am J Med Genet*, 145C, 323-326
- Ledbetter DH** (1992) Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet*, 51, 451-456
- Ledbetter SA, Kuwano A, Dobyns WB, Ledbetter DH** (1992) Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet*, 50, 182-189
- \* **Lejeune J, Gautier M, Turpin MR** (1959) Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad Sci (Paris)*, 248, 1721-1722
- Liburd N, Ghosh M, Riazuddin S, Naz S, Khan S, Ahmed Z, Riazuddin S, Liang Y, Menon PSN, Smith T, Smith ACM, Chen KS, Lupski JR, Wilcox ER, Potocki L, Friedman TB** (2001) Novel mutations of MYO15A associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet*, 109, 535-541
- Lockwood D, Hecht F, Dowman C, Hecht BK, Rizkallah TH, Goodwin TM, Allanson J** (1988) Chromosome subband 17p11.2 deletion: a minute deletion syndrome. *J Med Genet*, 25, 732-737
- Mainardi PC** (2006) Cri du chat syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 1-33
- \* **Mainardi PC, Pastore G, Castronovo C, Godi M, Guala A, Tamiasso S, Provera S, Pierluigi M, Dagna Bricarelli F** (2006) The natural history of Cri du chat syndrome. A report from the Italian Register. *Eur J Med Genet*, 49 (5), 363-383
- Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD** (2001) Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*, 38, 151-158
- Marinescu RC, Johnson EI, Dykens EM, Hodapp RM, Overhauser J** (1999) No relationship between the size of the deletion and the level of developmental delay in Cri-du-chat syndrome. *Am J Med Genet*, 86, 66-70
- Matthews AL** (1999) Chromosomal abnormalities: trisomy 18, trisomy 13, deletions, and microdeletions. *J Perinat Neonatal Nurs*, 13(2), 59-75
- \* **McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll DA, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH** (1999) The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns*, 10, 11-24
- Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS** (2000) Hemizyosity of  $\delta$ -catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in Cri du chat syndrome. *Genomics*, 63, 157-164
- Mefford HC, Trask BJ** (2002) The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*, 3, 91-102
- \* **Mizuno K, Okano I, Ohashi K, Nunoue K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T** (1994) Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene*, 9, 1605-1612
- Moncla A, Livet MO, Auger M, Mattei JF, Mattei MG, Giraud F** (1991) Smith-Magenis syndrome: a new contiguous gene syndrome. Report of three new cases. *J Med Genet*, 28, 627-632
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR** (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) $_n$ , present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(18), 6622-6626
- Muguerza R, Rodriguez A, Formigo E, Montero M, Vázquez JL, Páramo C, Campos C** (2005) Pancreatoblastoma associated with incomplete Beckwith-Wiedemann syndrome: case report and review of the literature. *J Pediatr Surg*, 40, 1341-1344
- Narahara K, Baker E, Ito S, Yokoyama Y, Yu S, Hewitt D, Sutherland GR, Eccles MR, Richards RI** (1997) Localization of a 10q breakpoint within the PAX2 gene in a patient with a de novo t(10;13) translocation and optic nerve coloboma-renal disease. *J Med Genet*, 34, 213-216
- \* **Niebuhr E** (1978) The Cri du chat syndrome. Epidemiology, cytogenetics and clinical features. *Hum Genet*, 44, 227-275
- \* **Nowell PC, Hungerford DA** (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497-1501
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD** (1999) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet*, 64, 397-413
- Overhauser J, Golbus MS, Schonberg SA, Wasmuth JJ** (1986) Molecular analysis of an unbalanced deletion of the short arm of chromosome 5 that produces no phenotype. *Am J Hum Genet*, 39, 1-10
- Papavramidis ST, Kotidis EV, Gamvros O** (2006) Prader-Willi syndrome-associated obesity treated by biliopancreatic diversion with duodenal switch. Case report and literature review. *J Pediatr Surg*, 41, 1153-1158
- Parisis D, Milonas I** (2005) Chromosome 22q11.2 deletion syndrome: an underestimated cause of neuropsychiatric impairment in adolescence. *J Neurol*, 252, 989-990
- Petersen B, Strassburg HM, Feichtinger W, Kress W, Schmid M** (1998) Terminal deletion of the long arm of chromosome 10: a new case with breakpoint in q25.3. *Am J Med Genet*, 77, 60-62
- \* **Pettenati MJ, Haines JL, Higgins RR, Wappner RS, Palmer CG, Weaver DD** (1986) Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of clinical and cytogenetic data on 22 new cases and review of the literature. *Hum Genet*, 74, 143-154
- Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP** (1989) Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am J Hum Genet*, 44, 720-723
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung B, Gray JW, Albertson DG** (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20, 207-211
- Pinkel D, Straume T, Gray JW** (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 2934-2938
- Portnoï MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalán A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, God F, Taillemitte JL, Marlin S** (2005) Two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/Velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet*, 137A, 47-51
- Potocki L, Glaze D, Tan DX, Park SS, Kashork CD, Shaffer LG, Reiter RJ, Lupski JR** (2000) Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet*, 37, 428-433
- Potocki L, Shaw CJ, Stankiewicz P, Lupski JR** (2003) Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith-Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genet Med*, 5, 430-434
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U** (2006) Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet*, 140A, 2063-2074
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacós M,**

- Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-454
- Reiter LT, Hastings PJ, Nelis E, De Jonghe P, Van Broeckhoven CV, Lupski JR (1998) Human meiotic recombination products revealed by sequencing a hotspot for homologous strand exchange in multiple HNPP deletion patients. *Am J Hum Genet*, 62, 1023-1033
- Riegel M, Castellan C, Balmer D, Brecevic L, Schinzel A (1999) Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes. *Am J Med Genet*, 82, 249-253
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF (2005) Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*, 25, 513-524
- Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, van den Ende J, Biervliet M, Eyskens F, van Goethem G, Laridon A, Ceulemans B, Courtens W, Kooy RF (2006) Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet*, 69, 58-64
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brøndum-Nielsen K, Stewart F, Van Essen T, Patton M, Paterson J, Scambler PJ (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*, 34, 798-804
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G (1992) The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 4913-4917
- Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, Yersak JM, Hacker AM, Zackai EH, Ashley T, Emanuel BS (2004) Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet*, 13, 417-428
- Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H (2004) Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet*, 66, 265-275
- Saracoglu K, Brown J, Kearney L, Uhrig S, Azofeifa J, Fauth C, Speicher MR, Eils R (2001) New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 44, 7-15
- Scigliano S, Grégoire MJ, Schmitt M, Jonveaux PH, LeHeup B (2004) Terminal deletion of the long arm of chromosome 10. *Clin Genet*, 65, 294-298
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305, 525-528
- Sellner LN, Taylor GR (2004) MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*, 23, 413-419
- Seranski P, Hoff C, Radelof U, Hennig S, Reinhardt R, Schwartz CE, Heiss NS, Poustka A (2000) RAI1 is a novel polyglutamine encoding gene that is deleted in Smith-Magenis syndrome patients. *Gene*, 270, 69-76
- Shaffer LG, Bejjani BA (2006) Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*, 115, 303-309
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC (2007) The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet*, 145C, 335-345
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA (2006) Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr*, 149, 98-102
- Shaffer LG, Lupski JR (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34, 297-329
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hara AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS (2000) Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet*, 9, 489-501
- Shannon NL, Maltby EL, Rigby AS, Quarrell OWJ (2001) An epidemiological study of Wolf-Hirschhorn syndrome: life expectancy and cause of mortality. *J Med Genet*, 38, 674-679
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG (1997) Chromosome 1p36 deletions: The clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*, 61, 642-650
- Shaw CJ, Bi W, Lupski JR (2002) Genetic proof of unequal meiotic crossovers in reciprocal deletion and duplication of 17p11.2. *Am J Hum Genet*, 71, 1072-1081
- \* Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 373, 81-83
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30(12), e57
- \* Simmons AD, Goodard SA, Gallardo TD, Overhauser J, Lovett M (1995) Five novel genes from the Cri-du-chat critical region isolated by direct selection. *Hum Mol Genet*, 4, 295-302
- Simmons AD, Overhauser J, Lovett M (1997) Isolation of cDNA from the Cri du chat critical region by direct screening of a chromosome 5-specific cDNA library. *Genome Res*, 7, 118-127
- Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M (1998) Molecular cloning and mapping of human Semaphorin F from the Cri du chat candidate interval. *Biochem Biophys Res Com*, 242, 685-691
- Slavotinek A, Gaunt L, Donnai D (1997) Paternally inherited duplications of 11p15.5 and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet*, 34, 819-826
- Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK (1999) Monosomy 1p36. *J Med Genet*, 36, 657-663
- Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH (1998) Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes (DiGeorge syndrome/Velocardiofacial syndrome). *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 86, 141-146
- Takagi M, Zee DS, Tamargo RJ (1998) Effects of lesions of the oculomotor vermis on eye movements in primate: saccades. *Neurophysiol*, 80, 1911-1931
- \* Tjio HZ, Levan A (1956) The chromosome numbers of man. *Hereditas*, 42, 1-6
- \* Trask BJ, Mefford H, van den Engh G, Massa HF, Juyal RC, Potocki L, Finucane B, Abuelo DN, Witt DR,



- Magenis E, Baldini A, Greenberg F, Lupski JR, Patel PI** (1996) Quantification by flow cytometry of chromosome 17 deletions in Smith-Magenis syndrome patients. *Hum Genet*, 98, 710-718
- van der Geest JN, Lagers-van Haselen GC, Frens MA** (2006) Saccade adaptation in Williams-Beuren syndrome. *IOVS*, 47, 1464-1468
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA** (2003) Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*, 73, 1261-1270
- Vlangos CN, Yim DKC, Elsea SH** (2003) Refinement of the Smith-Magenis syndrome critical region to approximately 950 kb and assessment of 17p11.2 deletions. Are all deletions created equally? *Mol Genet Metab*, 79, 134-141
- Waggoner DJ, Chow CK, Dowton SB, Watson MS** (1999) Partial monosomy of distal 10q: three new cases and a review. *Am J Med Genet*, 86, 1-5
- Wei Y, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG** (2003) Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet*, 12 (17), 2145-2152
- Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, Steele L, Cameron J, Smith A, Ambus L, Li M, Ray PN, Sadowski P, Squire J** (2001) Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet*, 10, 2989-3000
- Weksberg R, Shuman C, Smith AC** (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet*, 137C, 12-23
- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P** (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet*, 12 (Suppl 1), R61-68
- \* **Wilkie AOM, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, Affara NA, Fitchett M, Huson SM** (1993) Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases. *Am J Med Genet*, 46, 597-600
- Windpassinger C, Kroisel PM, Wagner K, Petek E** (2002) The human gamma-aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: Molecular characterisation and tissue-specific expression. *Gene*, 292, 25-31
- Wright TJ, Rieke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinänen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng T, Zackai E, Altherr MR** (1997) A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet*, 6, 317-324
- Wu Q, Niebuhr E, Yang H, Hansen L** (2005) Determination of the „critical region“ for cat-like cry of Cri du chat syndrome and analysis of candidate genes by quantitative PCR. *Eur J Hum Genet*, 13, 475-485
- Wu YQ, Heilstedt HA, Bedell JA, May KM, Starkey DE, McPherson JD, Shapira SK, Shaffer LG** (1999) Molecular refinement of the 1p36 deletion syndrome reveals size diversity and a preponderance of maternally derived deletions. *Hum Mol Genet*, 8, 313-321
- \* **Wulfsberg EA, Weaver RP, Cunniff CM, Jones MC, Jones KL** (1989) Chromosome 10qter deletion syndrome: a review and report of three new cases. *Am J Med Genet*, 32, 364-367
- Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R** (2003) Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*, 362, 1366-1373
- Yingling J, Toyo-oka K, Wynshaw-Boris A** (2003) Miller-Dieker Syndrome: analysis of a human contiguous gene syndrome in the mouse. *Am J Hum Genet*, 73, 475-488
- Yu S, Cox K, Friend K, Smith S, Buchheim R, Bain S, Liebelt J, Thompson E, Bratkovic D** (2008) Familial 22q11.2 duplication: a three-generation family with a 3-Mb duplication and a familial 1.5-Mb duplication. *Clin Genet*, 73, 160-164
- Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG** (2003) Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet*, 12, 2145-2152
- \* **Yunis JJ** (1981) Mid-prophase human chromosomes. the attainment of 2000 bands. *Hum Genet*, 56, 293-298
- Zenker M, Rittinger O, Grosse KP, Speicher MR, Kraus J, Rauch A, Trautmann U** (2002) Monosomy 1p36 – a recently delineated, clinically recognizable syndrome. *Clin Dysmorphol*, 11, 43-48
- Zhang X, Snijders A, Segraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D** (2005) High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in Cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet*, 76, 312-326
- Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Buttè C, Memo L, Capovilla G, Neri G** (2003) Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet*, 72, 590-597
- Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, DeSilva R, Tolmie J, Wood NW, McWilliam RC, Stephenson JP, Kullmann DM, Hanna MG** (1999) A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain*, 122, 817-82