

Carla Sustek D'Angelo

*Pesquisa dos mecanismos de rearranjos
cromossômicos subteloméricos na monossomia
1p36, expansão do espectro da variabilidade
fenotípica e comportamental, diagnósticos
diferenciais e caracterização de uma região
crítica para obesidade*

Universidade de São Paulo

São Paulo

2009

Carla Sustek D'Angelo

**Pesquisa dos mecanismos de rearranjos
cromossômicos subteloméricos na monossomia
1p36, expansão do espectro da variabilidade
fenotípica e comportamental, diagnósticos
diferenciais e caracterização de uma região
crítica para obesidade**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia (Genética)

Orientadora: Célia Prizskulnik
Koiffmann

São Paulo

2009

D'ANGELO, CARLA SUSTEK

Pesquisa dos mecanismos de rearranjos cromossômicos subteloméricos na monossomia 1p36, expansão do espectro da variabilidade fenotípica e comportamental, diagnósticos diferenciais e caracterização de uma região crítica para obesidade
182 pág.

Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Monossomia 1p36.
2. Obesidade.
3. MLPA.
4. Rearranjos subteloméricos.
5. Mecanismos de reparo do DNA.
6. Ciclos BFB.
7. NHEJ.
8. Deleção 22q11.2 atípica.
9. Agressividade.

Comissão Julgadora:

Orientadora

Este trabalho foi realizado com os auxílios financeiros da CEPID-FAPESP e FAPESP concedidos à orientadora e à aluna.

**Aos meus pais e à minha irmã,
dedico esta Tese.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, pela vida.

Eu gostaria de agradecer as várias pessoas que contribuíram com o seu tempo, energia e sabedoria para a concretização deste trabalho:

À Profa. Dra. Célia Koiffmann, que me orientou ao longo destes anos e a quem devo todo o meu respeito e admiração.

Às amigas de laboratório Cris, Ilana, Cláudia, Mariana “Mini”, Monica, Estela, Luceleni, e Rose, pela amizade e apoio e pelos momentos de aprendizagem e de brincadeira durante tanto tempo de convívio e por terem sempre me ajudado de alguma forma durante esses anos.

Agradeço especialmente à Cris e à Ilana, pelos longos anos de amizade e companheirismo e, claro, por toda a ajuda.

A todos os amigos, alunos, professores e funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

A toda a equipe da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, especialmente, à Dra. Chong Ae Kim e Débora Bertola.

Ao Dr. Charles M. Lourenço da Unidade de Neurogenética do Hospital das Clínicas da FMUSP de Ribeirão Preto.

Aos pais e familiares dos pacientes, pela confiança no nosso trabalho e pelas lições de vida no convívio durante as consultas.

Aos meus familiares e amigos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (bolsa de Doutorado e Reserva Técnica), sem o qual esse trabalho não seria possível.

A todos os que, diretamente ou indiretamente, me ajudaram e estiveram ao meu lado durante o tempo de desenvolvimento desse projeto.

Índice

<i>Resumo</i> _____	1
<i>Abstract</i> _____	2
<i>Capítulo 1 – Introdução geral e Objetivos</i> _____	3
<i>1.1 A Síndrome de monossomia 1p36</i> _____	3
1.1.1 – Histórico _____	5
1.1.2 – Epidemiologia _____	6
1.1.3 – Aspectos clínicos _____	6
1.1.4 – Aspectos genéticos _____	14
1.1.5 – Correlações genótipo-fenótipo _____	17
1.1.6 – Genes candidatos _____	18
1.1.7 – Diagnóstico _____	19
<i>1.2 Mecanismos de origem de rearranjos cromossômicos</i> _____	21
1.2.1 – Rearranjos genômicos _____	21
1.2.2 – Doenças genômicas _____	22
1.2.3 – Mecanismos de origem de rearranjos genômicos _____	23
1.2.4 – Subtelômeros _____	28
1.2.5 – Rearranjos subteloméricos _____	30
1.2.6 – Monossomia 1p36 como modelo no estudo dos mecanismos de formação de rearranjos subteloméricos em humanos _____	33
1.3 Objetivos _____	42
<i>Capítulo 2 – Material e Métodos</i> _____	43
2.1 Pacientes _____	43
2.2 Aspectos Éticos _____	43
2.3 Métodos _____	44
<i>Capítulo 3 – Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements.</i> _____	54
<i>Capítulo 4 – Multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of typical and atypical monosomy 1p36 subjects and mapping</i>	

<i>of a critical region for obesity and hyperphagia.</i> _____	77
Capítulo 5 – An Inherited Atypical 1 Mb 22q11.2 Deletion Within the DGS/VCFS 3 Mb Region in a Child With Obesity and Aggressive Behavior. _____	109
Capítulo 6 – Aggressive behavior: lessons from individuals with Prade-Willi Syndrome-like phenotype. _____	116
Capítulo 7 – Discussão geral _____	126
Capítulo 8 – Conclusões _____	132
Capítulo 8 – Referências Bibliográficas _____	134
Anexo I – Tabelas Material e Métodos _____	151
Anexo II – Figuras Material e Métodos _____	166
Anexo III – Lista de Clones do Microarray _____	175
Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Instituto de Biociências da USP _____	178
Anexo V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP _____	180

Índice de Tabelas

Tabela I: Achados clínicos na síndrome de monossomia 1p36 (Capítulo 1, pg. 12-13)

Tabela II: “SALSA MLPA P147 1p36 probemix” (Anexo I, pg. 151)

Tabela III: “SALSA MLPA KIT P036-E1 HUMAN TELOMERE-3” (Anexo I, pg. 152)

Tabela IV: “SALSA MLPA kit P064 Mental Retardation-1” (Anexo I, pg. 153)

Tabela V: Marcadores de microssatélites mapeados em 1p36 (Anexo I, pg. 154)

Tabela VI: Clones do contíguo distal de 1p36 utilizados como sondas em experimentos de FISH (Anexo I, pg. 154)

Tabela VII: Clones de outras regiões genômicas utilizados como sondas em experimentos de FISH (Anexo I, pg. 155)

Tabela VIII: Marcadores de STS utilizados para refinamento dos pontos de quebra (Anexo I, pg. 155-161)

Tabela IX: Enzimas de restrição utilizadas nas reações de TOPO[®] Walker (Anexo I, pg. 161)

Tabela X: *Gene Specific Primers* (GSPs) utilizados nas reações de TOPO[®] Walker (Anexo I, pg. 162)

Tabela XI: Montagem das reações de TOPO[®] Walker (Anexo I, pg. 163)

Tabela XII: Oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências identificadas após os pontos de quebra das deleções (Anexo I, pg. 164)

Tabela XIII: Combinações de *primers* utilizados em reações de PCR para confirmar as junções dos pontos de quebra clonadas por TOPO[®] Walker (Anexo I, pg. 165)

Índice de Figuras

Figura 1: Rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados com doenças genômicas (Capítulo 1, pg. 23)

Figura 2: Comparação entre os mecanismos de NAHR, NHEJ e FoSTeS na origem de deleções/duplicações genômicas (Capítulo 1, pg. 28)

Figura 3: Estrutura de duplicação da região subtelomérica 7p (Capítulo 1, pg. 29)

Figura 4: Modelos de captura telomérica de cromossomos com deleções terminais (Capítulo 1, pg. 32)

Figura 5: Ciclos BFB na origem de deleções terminais associadas a duplicações invertidas (Capítulo 1, pg. 35)

Figura 6: Modelo de NAHR entre LCRs palindrômicas na região subtelomérica de 1p36 (Capítulo 1, pg. 40)

Figura 7: Mecanismos de estabilização de cromossomos com quebras distais (Capítulo 1, pg. 41)

Figura 8: Análise de MLPA com o software “MegaBACE Fragment Profiler” (Anexo II, pg. 168)

Figura 9: Análise de MLPA com a planilha da NGRL (Anexo II, pg. 169)

Figura 10: Contíguo distal de 1p36 (Anexo II, pg. 170)

Figura 11: Mapas de restrição das regiões contendo os pontos de quebra das deleções (Anexo II, pg. 171-174)

Resumo

Rearranjos subteloméricos submicroscópicos são uma causa importante de malformações congênitas múltiplas e retardo mental. Recentemente, os mecanismos de origem de rearranjos subteloméricos começaram a ser investigados. O seqüenciamento dos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos em 1p36 revelou predomínio por mecanismos de reparo não exclusivos. Rearranjos constitucionais em 1p36 são as alterações subteloméricas mais comuns e incluem deleções terminais simples, cromossomos derivados, deleções intersticiais e rearranjos complexos. Estes rearranjos resultam em um padrão específico de malformações e distúrbios do desenvolvimento neuropsicomotor que caracterizam a síndrome de monossomia 1p36. Os genes causativos ainda não foram identificados e a expressão fenotípica pode ser em função da haploinsuficiência de genes contíguos ou pelo mecanismo de efeito de posição. Obesidade e hiperfagia são características descritas em ~15% dos casos. Investigamos por MLPA (“Multiplex ligation-dependent probe amplification”) a presença de rearranjos no segmento cromossômico 1p36 em um grupo de 154 pacientes com obesidade e hiperfagia e testes genéticos negativos para a síndrome de Prader-Willi (PWS), e outro grupo de 83 pacientes encaminhados para estudos cromossômicos por diversos motivos. A estratégia de MLPA utilizada permitiu identificar em nove pacientes diferentes tipos de rearranjos na região subtelomérica 1p36. Para investigar os mecanismos de quebra, reparo e estabilização cromossômica envolvidos em rearranjos subteloméricos, linhagens celulares de seis pacientes contendo rearranjos constitucionais em 1p36 foram desenvolvidas. A clonagem e seqüenciamento das junções dos pontos de quebra de um rearranjo complexo e três translocações não recíprocas identificaram similaridades nas junções que sugerem o reparo por NHEJ (“Nonhomologous end-joining”) como o mais provável mecanismo de origem destes rearranjos. Duas deleções terminais aparentemente simples também foram investigadas e o refinamento dos pontos de quebra identificou dois intervalos genômicos distintos contendo duplicações segmentares específicas de 1p36 com 90-98% de homologia. Estas duplicações segmentares podem ter estimulado ou sido usadas como substratos no mecanismo de reparo do DNA. Nossos achados reforçam a associação da monossomia 1p36 com obesidade e hiperfagia e sugerem que estas características estejam freqüentemente associadas com fenótipos atípicos/leves e deleções submicroscópicas com 2-3 Mb de extensão. Sugerimos o uso de MLPA como um método alternativo rápido de diagnóstico para detectar e caracterizar rearranjos em 1p36.

Abstract

Subtelomeric abnormalities are an important cause of mental retardation and birth defects. The mechanisms involved in the formation of subtelomeric rearrangements are now beginning to be elucidated. Breakpoint sequencing analysis of 1p36 rearrangements has revealed prevalence of different nonexclusive recombination-repair mechanisms. Rearrangements of 1p36 are the most frequently detected subtelomeric abnormalities and include different-sized simple terminal deletions, derivative chromosomes, interstitial deletions and complex rearrangements. These rearrangements have been reported to result in the specific pattern of malformation and neurodevelopmental disabilities that characterizes monosomy 1p36 syndrome. Thus far, no genes have been conclusively determined to be causative. Besides, it is still not known if a mechanism of haploinsufficiency or position effect that influences phenotype expression in this commonest terminal deletion syndrome. Obesity and hyperphagia have been reported to occur in ~15% of cases. We have used multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to screen for monosomy 1p36 in a group of 154 hyperphagic and obese, PWS negative patients and in a separate group of 83 patients sent to investigate a variety of other conditions. The MLPA strategy used allowed the identification of a diversity of rearrangements in nine subjects. In order to gain further insights into the mechanisms of chromosome breakage, repair, and stabilization mediating subtelomeric rearrangements in humans, we have used cell lines containing constitutional rearrangements of 1p36 of six patients. Cloning of the breakpoint junctions in a complex rearrangement and three non-reciprocal translocations revealed similarities at the junctions that suggest NHEJ as the most likely mechanism of DNA repair that generated these rearrangements. Additionally, two apparently pure terminal deletions were also investigated and the refinement of the breakpoint regions identified two distinct genomic intervals ~25-kb apart, each containing a series of 1p36 specific segmental duplications with 90-98% identity. These segmental duplications might have been stimulated or used as substrate for a recombination-repair mechanism. Our work reinforces the association between monosomy 1p36 and obesity and hyperphagia, and further suggests that these features might be usually associated with an atypical/mild phenotype in addition to a submicroscopic deletion of ~2 to 3 Mb in size. We suggest the use of MLPA as an alternative method for high-throughput detection and delineation of rearrangements at 1p36.

1.1 A Síndrome de monossomia 1p36

Rearranjos constitucionais do segmento cromossômico 1p36 são as alterações cromossômicas com significado clínico mais frequentes em laboratórios de diagnóstico que investigam causas de MCA/MR (“**M**ultiple **C**ongenital **A**nomalies/**M**ental **R**etardation”) (Ravnan *et al.* 2006; Ballif *et al.* 2007; Shaffer *et al.* 2007). Deleções da região subtelomérica 1p resultam na constelação de características clínicas da síndrome de monossomia 1p36 (MIM 607872) (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Atualmente, esta síndrome é reconhecida como a síndrome de deleção terminal mais comum, com incidência calculada em 1/5000-10000 nascimentos (Shapira *et al.* 1997; Heilstedt *et al.* 2003b). O fenótipo da síndrome foi delineado em 1997 (Shapira *et al.* 1997) e desde então muitos estudos clínicos foram descritos na literatura (Shapira *et al.* 1997; Knight-Jones *et al.* 2000; Zenker *et al.* 2002; Heilstedt *et al.* 2003a; Battaglia 2005; Redon *et al.* 2005; Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Os maiores estudos clínicos de pacientes com monossomia 1p36 incluíram 134 (Gajecka *et al.* 2007) e 60 casos (Battaglia *et al.* 2008).

O fenótipo facial e o padrão de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor ou retardo mental (geralmente moderado a grave) são características marcantes nesta síndrome de deleção (Battaglia 2005; Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Demora na aquisição de fala e dificuldades na linguagem são comuns (Gajecka *et al.* 2007). Além disso, a linguagem expressiva normalmente está ausente nestes pacientes (Battaglia *et al.* 2008). Uma proporção deles são aptos a andar independente de apoio após a idade de 2 anos (geralmente com base alargada), mas a maioria é de pacientes não ambulantes (Battaglia *et al.* 2008). O fâcies típico inclui sobrancelhas retas, olhos fundos, hipoplasia da face média, ponte/raiz nasal deprimida, filtro longo e queixo pontudo (Battaglia e Shaffer 2008). Outras características frequentes são fontanela anterior ampla, microbraquicefalia, epicanto e orelhas de implantação baixa ou posteriorizadas (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Distúrbios de comportamento (particularmente comportamento agressivo e auto-agressão), hipotonia, problemas de alimentação, convulsões, deficiência auditiva, problemas oculares/visão (mais comum estrabismo) e defeitos cardíacos estruturais congênitos são problemas frequentes (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Características adicionais incluem fendas labial/palatina, craniossinostose, cardiomiopatia, alterações cerebrais e

esqueléticas, malformações genitourinárias, anomalias renais, hipotireoidismo, pés pequenos, braquidactilia, campodactilia e clinodactilia (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008; Battaglia e Shaffer 2008). Diversos outros achados clínicos são descritos em um número menor de pacientes ou em casos individuais (Slavotinek *et al.* 1999b; Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008; Battaglia e Shaffer 2008).

Diferentes tipos de rearranjos cromossômicos resultam em deleções do segmento cromossômico 1p36 e os pontos de quebra ou o tamanho das deleções são únicos e dispersos por toda a região distal (Heilstedt *et al.* 2003a; Gajecka *et al.* 2007; Ballif *et al.* 2007). As quatro classes de rearranjos subteloméricos descritas em indivíduos com monossomia 1p36 são, em ordem de ocorrência, deleções terminais simples (67%), translocações não equilibradas (cromossomos derivados) (16%), deleções intersticiais (10%) e rearranjos complexos (7%) (Gajecka *et al.* 2007). Recentemente, foi identificado um agrupamento de pontos de quebra entre 4-5 Mb do telômero de 1p, comum à todas estas categorias de rearranjos (Gajecka *et al.* 2007). Os rearranjos são normalmente eventos *de novo* e a maioria apresenta origem materna (65%) (Heilstedt *et al.* 2003a). O efeito da origem parental é na extensão das deleções: a maioria das deleções com origem materna são menores que 5 Mb, enquanto as maiores deleções são aquelas derivadas de cromossomos paternos (Heilstedt *et al.* 2003a; Gajecka *et al.* 2007). Em ~1/3 dos indivíduos com translocações não equilibradas os cromossomos derivados são resultantes de erros na segregação durante a gametogênese de genitores portadores de translocações equilibradas (Battaglia e Shaffer 2008).

Atualmente, a única causa conhecida para o fenótipo da síndrome de monossomia 1p36 é a deleção de genes mapeados na região que são sensíveis ao efeito de dose, sendo que nenhum gene causativo foi definitivamente identificado (Battaglia e Shaffer 2008). Entretanto, alguns genes candidatos são o proto-oncogene *SKI* e o fator 10 de biogênese dos peroxissomos (*PEX10*) (Colmenares *et al.* 2002), a subunidade beta do canal de potássio (*KCNAB2*) (Heilstedt *et al.* 2001), o gene 23 da matrix metaloproteína (*MMP23*) (Gajecka *et al.* 2005) e a subunidade delta do receptor A do ácido gama-aminobutírico (*GABRD*) (Windpassinger *et al.* 2002). Considera-se que a monossomia 1p36 seja uma síndrome de deleção de genes contíguos (Wu *et al.* 1999) e, regiões críticas foram sugeridas para algumas características clínicas (Heilstedt *et al.* 2003a). Contudo, a observação de dois pacientes com deleções de diferentes segmentos de 1p36 e mesma apresentação fenotípica sugeriu a hipótese de um mecanismo de efeito de posição dos rearranjos na expressão do fenótipo (Redon *et al.* 2005). Mais

recentemente, correlações genótipo-fenótipo em um grupo grande de pacientes não revelou diferenças entre o tamanho das deleções e o número de características clínicas manifestadas (Gajecka *et al.* 2007).

O subdiagnóstico de monossomia 1p36 é em parte devido às limitações do estudo cariotípico em detectar rearranjos das bandas cromossômicas distais (Battaglia *et al.* 2008). Recentemente, foi sugerido que a resolução do cariótipo por banda G na detecção de rearranjos subteloméricos seja da ordem de 10-15 Mb (Ballif *et al.* 2007) e ~90% dos rearranjos em 1p são menores que 10 Mb (Ballif *et al.* 2007). Em razão da diversidade nos tipos e tamanhos de rearranjos em 1p, recomenda-se para o diagnóstico uma estratégia de FISH com várias sondas específicas (Heilstedt *et al.* 2003a) ou *array* CGH (“**Array-based Comparative Genomic Hybridization**”) (Shaffer *et al.* 2007; Battaglia e Shaffer 2008). Além disso, pacientes com diagnóstico de monossomia 1p36 são frequentemente descritos com fenótipos atípicos ou menos graves ou apresentando sobreposição clínica com outras síndromes genéticas (D’Angelo *et al.* 2006; Neumann *et al.* 2004; Tan *et al.* 2005; Torisu *et al.* 2004). Alguns dos diagnósticos diferenciais de monossomia 1p36 são as síndromes de Rett (RTT), Angelman (AS) e Prader-Willi (PWS) (Battaglia e Shaffer 2008). Obesidade e hiperfagia são características descritas em pacientes com deleção 1p36 (Wargowski *et al.* 1991; Keppler-Noreuil *et al.* 1995; Eugster *et al.* 1997; Shapira *et al.*, 1997; Neumann *et al.* 2004; D’Angelo *et al.* 2006) e têm frequências estimadas em ~15% (Shapira *et al.* 1997) e 13% (Battaglia *et al.* 2008), respectivamente.

1.1.1 – Histórico

Entre os anos de 1968 e 1990, descrições de 13 pacientes com deleções terminais e intersticiais abrangendo diferentes porções do braço curto do cromossomo 1 foram publicadas (Howard e Porteus 1990). O primeiro caso de monossomia parcial da região cromossômica 1p36 foi descrito por Hain *et al.* (1980) em um paciente com translocação não equilibrada com o cromossomo 15. A descrição completa do fenótipo associado com a deleção isolada do segmento 1p36 foi descrita por Biegel *et al.* (1993) em um paciente com neuroblastoma e anomalias congênitas. A caracterização inicial do fenótipo na monossomia 1p36 em 1995 foi baseada na compilação clínica de 13 pacientes com a deleção 1p36 isolada ou em translocações envolvendo outros cromossomos (Keppler-Noreuil *et al.* 1995). Em 1997, a descrição de 13 pacientes com deleções microscópicas isoladas deste segmento cromossômico permitiu associar a

deleção 1p36 com um fenótipo específico e uma nova síndrome foi descrita e definida clinicamente nos bancos de dados do “Mendelian Inheritance in Man” (MIM 607872 “Monosomy 1p36 syndrome”) (Shapira *et al.* 1997).

Com o início das pesquisas de investigação da integridade subtelomérica em pacientes com MCA/RM (Flint *et al.* 1995) os casos de deleções 1p36 submicroscópicas passaram a ser identificados e os fenótipos descritos eram de síndrome de monossomia 1p36 (Girardeau *et al.* 1997; Knight *et al.* 1999; Riegel *et al.* 1999; Slavotinek *et al.* 1999a; Giraudeau *et al.* 2001). A disponibilidade do clone subtelomérico específico de 1p para hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Knight *et al.* 2000), também permitiu detectar deleções 1p36 em pacientes com esta suspeita e estudos cromossômicos por banda G normais (Knight-Jones *et al.* 2000; Zenker *et al.* 2002). Atualmente, a maioria de deleções 1p36 são detectadas por FISH ou com diferentes plataformas de *array* CGH (Ravnan *et al.* 2006; Ballif *et al.* 2007; Shaffer *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008).

1.1.2 – Epidemiologia

Shapira *et al.* (1997) calcularam a incidência da síndrome de monossomia 1p36 em 1/10.000 nascimentos, baseados em estudos populacionais de pacientes com este diagnóstico entre os nascidos vivos de uma mesma área geográfica. Entretanto, todos os pacientes da época haviam sido diagnosticados por estudos cromossômicos de alta resolução. Heilstedt *et al.* (2003b) demonstraram que entre 60 pacientes com a monossomia 1p36 confirmada, os estudos cromossômicos por banda G foram normais em pelo menos uma ocasião em ~50% dos casos. Atualmente, estima-se que a monossomia 1p36 ocorra em 1 para cada 5.000 recém-nascidos (Heilstedt *et al.* 2003b). Além disso, as primeiras pesquisas de investigação da integridade subtelomérica em pacientes com MCA/RM sugeriram a frequência de deleções 1p36 nesta população em 0.5-0.7% (Giraudeau *et al.* 2001). Hoje, rearranjos em 1p36 representam entre 10-20% do total de rearranjos subteloméricos submicroscópicos em ~2.5% de pacientes com MCA/MR (Ravnan *et al.* 2006; Ballif *et al.* 2007).

1.1.3 – Aspectos clínicos

A síndrome de monossomia 1p36 foi associada com um amplo espectro de anomalias e diferentes níveis de gravidade (Battaglia e Shaffer 2008). Grande parte dos trabalhos publicados são de pacientes com deleções 1p36 identificados em pesquisas sobre a integridade subtelomérica em pacientes com MCA/RM (Girardeau *et al.* 1997;

Riegel *et al.* 1999; Slavotinek *et al.* 1999a; Fan *et al.* 2001; Riegel *et al.* 2001; Baker *et al.* 2002; Rio *et al.* 2002; Rodriguez-Revenga *et al.* 2004; Koolen *et al.* 2004; Roberts *et al.* 2004; Moog *et al.* 2005). Alguns são descrições clínicas completas de casos individuais ou de poucos pacientes (Knight-Jones *et al.* 2000; Zenker *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004; Torisu *et al.* 2004; Neumann *et al.* 2004; Tan *et al.* 2005; Redon *et al.* 2005; D' Angelo *et al.* 2006). Outros são compilações ou descrições originais em uma amostra grande de pacientes (Shapira *et al.* 1997; Slavotinek *et al.* 1999b; Heilstedt *et al.* 2003a; Gajicka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Os trabalhos mais relevantes estão referidos a seguir.

A compilação clínica de 13 pacientes com deleções 1p36 microscópicas por Keppler-Noreuil *et al.* (1995) revelou um fenótipo consistente com RM e hipotonia (100%), orelhas de baixa implantação (83%), fontanela anterior grande (80%), ponte nasal achatada (75%), fissuras palpebrais curtas (73%), retardo de crescimento (70%), convulsões (70%), microcefalia (64%), alterações cardíacas (50%), hidrocefalia (50%), cardiomiopatia (40%), fendas labial/palatina (40%), macrosomia (14%). Foram sugeridos dois fenótipos distintos na monossomia 1p36, diferenciados por retardo de crescimento em um grupo e macrosomia no outro. Anteriormente, Wargowski *et al.* (1991) já haviam sugerido dois subgrupos clínicos na monossomia 1p36, um caracterizado por pacientes com retardo de crescimento associado com características físicas e comportamentais distintas e outro de pacientes com obesidade e um fenótipo “PWS-like”.

A descrição original de 13 pacientes com deleções microscópicas isoladas de 1p36 por Shapira *et al.* (1997) associou a síndrome de monossomia 1p36 com fontanela anterior ampla (100%), atraso motor/hipotonia (92%), retardo de crescimento (85%), queixo pontudo (80%), defeitos visuais/oculares (75%), convulsões (72%), ponte nasal achatada (65%), clinodactilia ou encurtamento de 5º dedo(s) (64%), orelhas assimétricas (57%) ou de implantação baixa (59%), déficit auditivo (56%), comportamento (auto) agressivo (56%), hélices auriculares espessas (53%) e olhos fundos (50%). Outras características foram descritas com frequência inferior a 50%. Obesidade foi estimada em ~15% dos casos. Além disso, estes autores concluíram que os parâmetros de crescimento não permitiam a distinção de subgrupos clínicos na síndrome de monossomia 1p36.

Slavotinek *et al.* (1999b) compilaram os achados clínicos da literatura em 39 pacientes com deleções isoladas ou translocações não equilibradas com cromossomos

acrocêntricos, incluindo um caso de mosaicismo e três casos identificados em pesquisas sobre a integridade subtelomérica em pacientes com MCA/RM. O sexo da amostra era conhecido em 35 casos e incluía 13 pacientes de sexo masculino e 22 de sexo feminino. A idade do diagnóstico se estendeu do período neonatal aos 47 anos. As indicações mais comuns para o estudo cromossômico foram atraso do DNPM, MCA/MR, distúrbios, convulsões, malformação cardíaca e suspeita diagnóstica de PWS.

Os achados clínicos consistiram de RM (geralmente entre moderado e grave) e atraso do DNPM (principalmente atraso de fala). Foram descritos pacientes não ambulatoriais ou com ausência de linguagem e pacientes com aquisição de linguagem complexa e RM leve. Hipotonia foi consistentemente documentada e, geralmente, presente ao nascimento. A maioria dos pacientes exibiu retardo de crescimento ou microcefalia ao nascimento ou com manifestação no pós-natal. Pacientes com obesidade e hiperfagia foram descritos em alguns trabalhos, assim como pacientes com puberdade precoce ou tardia.

Os distúrbios craniofaciais mais comuns consistiram de fontanela anterior grande, frontal proeminente, olhos fundos e fissuras palpebrais pequenas/curtas ou inclinadas. Outros distúrbios descritos incluíram assimetria facial, orelhas malformadas, pequenas, assimétricas ou de implantação baixa, hipoplasia da porção mediana da face, ponte nasal achatada, boca pequena, comissuras labiais voltadas para baixo, filtro longo e queixo pontudo ou prognatismo. Fendas orofaciais foram relatadas em 10-40% dos pacientes descritos e incluíram outros tipos de fendas além das labial e palatina. Alguns pacientes com clinodactilia e/ou encurtamento de 5^o dedo(s), camptodactilia e mãos/pés pequenos foram descritos.

Entre 39 pacientes, 14 apresentaram malformações cardíacas que incluíram cardiomiopatia dilatada na infância ou defeitos estruturais congênitos. Entre eles, ducto arterioso patente, defeitos do septo ventricular e atrial, tetralogia de Fallot, incompetência da tricúspide e anomalia de Ebstein. Estudos de ressonância magnética do crânio (RMC) e tomografia computadorizada (TC) revelaram atrofia cerebral e assimetria ou alargamento dos ventrículos laterais em alguns pacientes. Dois pacientes foram descritos com hidrocefalia e outro com hiperreflexia. Crises epiléticas foram relatadas em um número grande de pacientes e consistiam de crises tônico-clônicas generalizadas, mioclônicas, parciais simples e complexas, e espasmos infantis. Os distúrbios de comportamento descritos incluíram temperamento explosivo, arremesso de objetos, (auto) agressão, gritos e comportamento “autista-like”.

Os achados oftalmológicos descritos incluíram estrabismo, paralisia do sexto nervo, ambliopia, erros de refração, anomalias ou palidez dos discos ópticos, defeitos lacrimais, catarata bilateral, coloboma de íris, atrofia óptica, nistagmo rotatório e diminuição da acuidade visual. Surdez neurossensorial ou condutiva foram relatadas com frequência. Outros achados descritos incluíram anomalias músculo-esqueléticas e genitourinárias e, em casos isolados, ânus imperfurado, fistula retrovaginal, lobulação pulmonar anormal, estenose espinal congênita, polidactilia e síndrome de Sturge-Weber.

Heilstedt *et al.* (2003a) realizaram o primeiro estudo sistemático em uma amostra de 30 pacientes (incluindo 13 originalmente descritos em 1997 por Shapira *et al.*) para determinar as frequências de cada característica na síndrome de monossomia 1p36. Os achados neurológicos incluíram atraso de DNPM e/ou RM (100%), hipotonia (87%), disfagia orofaríngea (72%), dificuldades de alimentação na infância (63%) e epilepsia (48%). Outras características com frequência superior a 50% incluíram encurtamento do 5º dedo (87%), fontanela anterior ampla (85%), deficiência auditiva (82%), olhos fundos (80%), ponte nasal achatada (77%), nariz achatado (67%), hipermetropia (67%), queixo pontudo (67%), braquicefalia (60%), microcefalia (60%), orelhas assimétricas (53%) e espessamento da hélice auricular (53%). Características físicas com frequência inferior a 50% incluíram clinodactilia de 5º dedo(s) (40%), orelhas posteriorizadas (23%) ou de baixa implantação (23%). Os achados oftalmológicos com frequência inferior a 50% consistiram de estrabismo (30%), desatenção visual (30%), miopia (17%) e nistagmo (13%). Os achados cardiovasculares incluíram cardiomiopatia dilatada na infância (23%), ducto arterioso patente (17%), defeitos do septo ventricular (13%), raiz da aorta dilatada (10%), defeitos do septo atrial (7%), dilatação do ventrículo esquerdo (7%), vala aórtica bicomissural (7%) e anomalia de Ebstein (3%). Outras características avaliadas foram hipotireoidismo (20%) e fissuras orofaciais (17%).

Heilstedt *et al.* (2003b) descreveram as indicações clínicas mais comuns para estudos cromossômicos que acarretaram na identificação de deleções 1p36. Entre 47 pacientes, somente cinco tiveram a suspeita diagnóstica de síndrome de monossomia 1p36. Outras indicações foram atraso no DNPM e RM (10), presença de dismorfismos (7), malformações congênicas múltiplas (5) ou malformações cardíacas (2), e para descartar as síndromes de DiGeorge/VeloCardioFacial (DGS/VCFS) (4), Angelman (AS) (2), PWS (2), e Smith-Magenis (1). Quatro casos com diagnóstico no período pré-natal tiveram como indicação níveis elevados de alfafetoproteína sérica materna

(MSAFP, “**M**aternal **S**erum **A**lpha-**f**etoprotein”). Um caso foi indicado por malformações reveladas no ultra-som fetal. A idade do diagnóstico em 49 pacientes se estendeu do período neonatal aos 19 anos, com a maioria (77%) recebendo o diagnóstico da deleção entre o período pré-natal e o segundo ano de vida. A idade dos genitores na ocasião da concepção era conhecida para 47 mães e 42 pais, e se estendeu dos 14 aos 39 anos no primeiro grupo (média de 23.3 anos) e dos 15 aos 38 anos no segundo (média de 26.3 anos).

Redon *et al.* (2005) descreveram os achados clínicos em 6 pacientes (5 de sexo feminino e 1 masculino) com deleções 1p36 identificadas por um *microarray* específico da região eucromática do cromossomo 1. Todos os pacientes apresentaram RM, atraso motor e hipotonia. Somente um paciente com diagnóstico aos 19 anos tinha adquirido fala. Nos demais pacientes, com idades entre 16 meses e 16 anos, a fala estava ausente. Dificuldades de alimentação foram relatadas para 3 pacientes. As características craniofaciais identificadas foram hipoplasia da porção mediana da face (6/6), olhos fundos (6/6), sobrancelhas retas (6/6), fissuras palpebrais curtas (6/6), boca pequena e curvada para baixo (6/6), queixo pontudo ou proeminente (6/6), frontal amplo (5/6), braquicefalia (4/6), supra-orbital proeminente (4/6), epicanto (4/6), ponte nasal achatada na infância (4/6), orelhas pequenas (4/6), hélices espessas (4/6) ou mal-formadas (3/6), de baixa implantação (2/6), fontanela anterior grande (1/1), plagiocefalia (1/6). Outras características físicas incluíram mãos pequenas (5/6), clinodactilia (4/6) e encurtamento de 5º dedo(s) (3/6). Também foram descritas alterações oftalmológicas, como nistagmo (4/6) e estrabismo (3/6), alterações cardíacas, como defeito no septo atrial/ventricular (1/6) e anomalia de Ebstein (2/6), epilepsia (4/6) e surdez (1/6). Distúrbios de comportamento foram relatados para 4 pacientes e incluíram hiperfagia (1/6), comportamento auto-agressivo (3/6), distúrbios de sono (1/6) e comportamento “autista-like” (1/6). Estes autores referiram distribuição truncal da gordura corporal em três pacientes.

As maiores compilações de dados clínicos na monossomia 1p36 são para 134 (Gajecka *et al.* 2007) e 60 casos (Battaglia *et al.* 2008). Os achados destes dois trabalhos estão agrupados na Tabela I (pg. 12), que apresenta as frequências originais das características descritas em cada trabalho e as frequências totais dos dois estudos agrupados por nós.

As características craniofaciais que distinguem a monossomia 1p36 são sobrancelhas retas (100%), olhos fundos (73-100%), hipoplasia da porção mediana da

face (51-100%), ponte nasal ou raiz do nariz achatada/alargada (74-100%), filtro longo (100%) e queixo pontudo (63-100%). Outras características incluem fontanela anterior grande ou com fechamento tardio (74-77%), microcefalia (61%), braquicefalia (54-65%), hélices auriculares espessas (58%), epicanto (50%), orelhas malformadas, posteriorizadas ou de implantação baixa (40-49%), orelhas pequenas (48%) ou assimétricas (40%), baixa implantação de cabelos na nuca (48%), hipertelorismo (38%), fissuras palpebrais curtas (27%), com inclinação superior (27%) ou inferior (26%) e sinofre (21%). Fendas orofaciais ocorrem com frequência de 5-17%. Braquidactilia ou camptodactilia e pés pequenos são descritos em 80% e clinodactilia em 60% dos pacientes. Craniossinostose é descrita em apenas 2% (Battaglia *et al.* 2008).

Atraso global do DNPM ocorre em 100% e RM entre 95-100%. Em ~90% dos pacientes o RM é classificado entre grave e profundo, e em 10% entre leve e moderado (Battaglia *et al.* 2008). Atraso de fala é descrito para 98% dos pacientes. Em ~75% dos pacientes a linguagem expressiva está ausente ou é limitada a poucas palavras isoladas (17%) ou composições com dois vocábulos (8%) (Battaglia *et al.* 2008). Cerca de 25% dos indivíduos adquirem marcha independente entre 2 e 7 anos de idade (geralmente com base alargada). Contudo, são descritos pacientes não ambulantes com idades entre 14 meses e 9 anos (Battaglia *et al.* 2008).

Entre 92-95% dos pacientes apresentam hipotonia infantil. Dificuldades de alimentação na infância são relatadas em 77% e disfagia orofaríngea em 49%. Crises convulsivas com idades de manifestação variadas são referidas em 44-79% e incluem crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas, clônicas, tônicas, mioclônicas e parciais complexas, e espasmos infantis, espasmos tônicos e crises de ausência atípicas (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Battaglia *et al.* (2008) relataram alterações do eletroencefalograma (EEG) em 34/34 (100%) pacientes e alterações em ressonância magnética de crânio (RMC), tomografia computadorizada (TC) ou ultra-som (US) em 88%. Gajecka *et al.* (2007) relataram encefalopatia epilética em 31%. As malformações cerebrais mais comuns citadas por Battaglia *et al.* (2008) foram dilatação dos ventrículos laterais e dos espaços subaracnóides, atrofia cortical e atrofia cerebral difusa, e hipoplasia, afinamento ou espessamento total ou parcial do corpo caloso. Por outro lado, Gajecka *et al.* (2007) descreveram polimicrogiria (20%), leucoencefalopatia (28%), atrofia generalizada (18%) e ventrículos proeminentes (26%).

Defeitos cardíacos estruturais congênitos são descritos entre 71-75% e cardiomiopatia entre 27-31% dos pacientes. As alterações congênitas incluem defeitos

do septo ventricular (28-29%) e atrial (8-23%), ducto arterioso patente (12.8-27%), forame oval patente (24%), anomalias como valva aórtica bicomissural, estenose/displasia/atresia da valva pulmonar e insuficiência da valva mitral (20.5%), tetralogia de Fallot (7.7%), coarctação da aorta (5.1%), estenose infundibular do ventrículo direito (2%) e anomalia de Ebstein (3%) (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008).

Malformações oculares ou problemas visuais funcionais são relatadas em 52% e incluem estrabismo (35-67%), erros refratários como hipermetropia, miopia ou astigmatismo (23-41%), nistagmo (26.5%), catarata unilateral (5.9%), albinismo de retina (5.9%) e coloboma unilateral de nervo óptico (2.9%). Desatenção visual é relatada em 44-64% dos pacientes (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008). Deficiência auditiva é relatada com frequência entre 47-77%, e incluem surdez neurossensorial (28-58%), condutiva (9-46%), ou ambas as formas (9%) (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008).

Distúrbios de comportamento são descritos em ~50% dos indivíduos e incluem comportamentos de auto-agressão como morder as mãos e os pulsos (30%), temperamento explosivo (22%), interação social reduzida (52%), estereotípias (44%), e hiperfagia (13%) (Battaglia *et al.* 2008). Gajecka *et al.* (2007) relataram comportamento auto-agressivo em 55%.

Outros achados descritos incluem anomalias esqueléticas (41%) e gastrointestinais (28%) como constipação (65%), refluxo gastro-esofágico (7-56%), desconforto intestinal (17%) e hérnia de hiato (8%), anormalidades na genitália externa (25%), anomalias renais (22%) e anais como anus anteriorizado (3%) ou imperfurado (2%), e hipotireoidismo (15-20%) (Gajecka *et al.* 2007; Battaglia *et al.* 2008).

Tabela I: Achados clínicos na síndrome de monossomia 1p36

Características clínicas	Gajecka <i>et al.</i> ¹ (%)	Battaglia <i>et al.</i> ² (%)	Total (%)
<i>Dismorfismos craniofaciais</i>			
Fontanela anterior grande/ Fechamento tardio	34/46 (74)	30/39 (77)	64/85 (75)
Microcefalia	28/46 (61)	--	28/46 (61)
Braquicefalia	25/46 (54)	39/60 (65)	64/106 (60)
Implantação baixa cabelo nuca	20/42 (48)	--	20/42 (48)
Hipoplasia da face média	21/41 (51)	60/60 (100)	81/101 (80)
Sobrancelhas retas	--	60/60 (100)	60/60 (100)
Sinofre	6/28 (21)	--	6/28 (21)
Fissuras palpebrais pequenas	10/37 (27)	--	10/37 (27)

Fissuras palpebrais para cima	12/44 (27)	--	12/44 (27)
Fissuras palpebrais para baixo	11/43 (26)	--	11/43 (26)
Olhos fundos	36/49 (73)	60/60 (100)	96/109 (88)
Epicanto	--	30/60 (50)	30/60 (50)
Hipertelorismo	15/40 (38)	--	15/40 (38)
Ponte/Raiz nasal achatada ou alargada	40/54 (74)	60/60 (100)	100/114 (88)
Orelhas de baixa implantação	23/47 (49)	20/50 (40)	43/97 (44)
Orelhas assimétricas	18/45 (40)	--	18/45 (40)
Orelhas pequenas	21/44 (48)	--	21/44 (48)
Hélices espessas	26/45 (58)	--	26/45 (58)
Filtro longo	--	60/60 (100)	60/60 (100)
Queixo pontudo	29/46 (63)	60/60 (100)	89/106 (84)
<i>Defeitos esqueléticos/membros</i>			
Clinodactilia 5º dedo(s)	27/45 (60)	--	27/45 (60)
Braquidactilia/camptodactilia	--	48/60 (80)	48/60 (80)
Pés pequenos	--	48/60 (80)	48/60 (80)
Anomalias esqueléticas	--	13/32 (41)	13/32 (41)
<i>Achados Neurológicos</i>			
RM	39/41 (95)	52/52 (100)	91/93 (98)
Atraso do DNPM	67/67 (100)	60/60 (100)	127/127(100)
Atraso de fala	56/57 (98)	--	56/57 (98)
Fala expressiva pobre/ausente	--	60/60 (100)	60/60 (100)
Hipotonia	59/64 (92)	57/60 (95)	116/124 (94)
Convulsões	44/56 (79)	26/60 (44)	70/116 (60)
Encefalopatia epiléptica	10/32 (31)	--	10/32 (31)
EEG anormal	--	34/34 (100)	34/34 (100)
RMC/TC/US anormais	--	43/49 (88)	43/49 (88)
Dificuldades de alimentação	36/47 (77)	--	36/47 (77)
Disfagia orofaríngea	17/35 (49)	--	17/35 (49)
Distúrbios de comportamento	--	28/60 (47)	28/60 (47)
Auto-agressividade	21/38 (55)	--	21/38 (55)
Problemas oculares/visuais	--	23/44 (52)	23/44 (52)
Desatenção visual	12/27 (44)	28/44 (64)	40/71 (56)
Deficiência auditiva	40/52 (77)	15/32 (47)	55/84 (65)
<i>Achados cardiovasculares</i>			
Cardiomiopatia	18/59 (31)	13/48 (27)	31/107 (29)
Defeitos estruturais congênitos	44/59 (75)	34/48 (71)	78/107 (73)
<i>Outros achados</i>			
Hipotireoidismo	6/30 (20)*	3/20 (15)	9/50 (18)
Fendas orofaciais	5/30 (17)*	3/60 (5)	8/90 (9)
Anomalias gastrointestinais	--	5/18 (28)	5/18 (28)
Anomalias na genitália externa	--	15/60 (25)	15/60 (25)
Anomalias renais	--	4/18 (22)	4/18 (22)
Anomalias anais	--	2/60 (3)	2/60 (3)

¹Gajecka *et al.* (2007); ²Battaglia *et al.* (2008)*Heilstedt *et al.* (2003a).

1.1.4 – Aspectos genéticos

Os primeiros estudos de caracterização de deleções terminais 1p36 foram limitados pela resolução das técnicas de bandamento cromossômico e pelo mapeamento do *locus* mais distal (DVL1) a uma distância de ~1.5 Mb do telômero (Shapira *et al.* 1997; Wu *et al.* 1999). O poder de resolução do estudo de deleções terminais aumentou consideravelmente após o desenvolvimento de clones subteloméricos cromossomo específicos mapeados em ~400 kb dos telômeros (Knight *et al.* 2000). Um grande avanço nessa época foi o kit “Chromoprobe Multiprobe[®]-T System” (Cytocell Ltd, Oxford, UK), que permitiu a investigação por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de 41 regiões subteloméricas em uma única lâmina (Ballif *et al.* 2000) e, depois, o desenvolvimento de plataformas de *array* CGH de investigação direta (Yu *et al.* 2003; Redon *et al.* 2005; Ballif *et al.* 2007; Shaffer *et al.* 2007). A seguir, uma revisão histórica dos trabalhos com maior contribuição no estudo dos aspectos genéticos na síndrome de monossomia 1p36.

Shapira *et al.* (1997) publicaram os aspectos clínicos na síndrome de monossomia 1p36 graças a identificação de 13 pacientes com deleções puras de 1p36 por banda G de alta resolução, que identificou também uma translocação não equilibrada entre os cromossomos 1 e 22 em um outro paciente. Os aspectos genéticos começaram a ser delineados quando o estudo destas deleções por FISH e marcadores de polimorfismos no DNA revelou diferenças grandes no tamanho das deleções e um intervalo comum de deleção. Estes autores relataram também uma diferença significativa na origem parental das deleções puras (eventos *de novo*): 83% dos cromossomos deletados eram de origem materna e apenas 17% paterna.

Wu *et al.* (1999) estenderam estes estudos para 30 pacientes (16 casos novos) e utilizaram um número maior de marcadores moleculares e sondas de FISH. Estas análises identificaram diferenças grandes no tamanho das deleções e diferentes tipos de rearranjos cromossômicos em 1p36, incluindo deleções terminais (24/30), deleções intersticiais (3/30) e cromossomos derivados (3/30). Além disso, a divisão do segmento distal de 1p36 em seis intervalos mostrou dois discretos agrupamentos de pontos de quebra entre os marcadores D1S243-D1S468 (1p36.33-1p36.32) e D1S468-D1S2145 (1p36.32-1p36.31). Foi definido um intervalo de deleção comum entre as deleções terminais, que incluía as sondas DVL1 e p58 e o marcador D1S243. A maioria das deleções era de origem materna (78%).

Ballif *et al.* (2000) investigaram as regiões subteloméricas destas 30 deleções e de três casos novos com o kit “Chromoprobe Multiprobe[®]-T System” e conforme a estrutura da região terminal dos cromossomos deletados, identificaram: (i) 21 casos de deleções terminais simples (definidas pela deleção da sonda subtelomérica 1p36 específica); (ii) 5 casos de deleções intersticiais (definidas pela retenção da sonda subtelomérica 1p36 específica); (iii) e 6 casos de cromossomos derivados (definidos pela presença de seqüência subtelomérica específica de outro cromossomo na extremidade do cromossomo 1 deletado para a sonda subtelomérica de 1p).

Heilstedt *et al.* (2003a) estenderam estes estudos para 61 deleções e aumentaram o nível de resolução das análises com uma sonda mais distal que a subtelomérica específica de 1p36 (clone 1p TAR, GS-63M14). Além disso, criaram um contíguo com 97 cromossomos artificiais de bactéria (BAC) do segmento distal de 10.5 Mb de 1p36. Todas as deleções foram submetidas a análises com 25 marcadores de microssatélites e estudadas com o kit “Chromoprobe Multiprobe[®]-T System. Este estudo revelou: (i) 43 (72%) deleções terminais simples, 4 (7%) deleções intersticiais, 10 (17%) cromossomos derivados e 3 (5%) rearranjos complexos (aqueles com deleções de diferentes segmentos da região 1p36); (ii) diferenças grandes no tamanho das deleções ao longo de todo o segmento cromossômico distal contido entre 1.5 Mb e >10.5 Mb do telômero; (iii) ocorrência dos pontos de quebra em 22 intervalos cromossômicos, estabelecidos a cada 0.5 Mb a partir do telômero; (iv) agrupamento de pontos de quebra (12.5%) entre 4-4.5 Mb de 1ptel; (v) 65% de deleções com origem materna e 35% paterna; (vi) diferenças significativas entre o tamanho das deleções e a origem parental: 75% das deleções maternas foram menores que 5 Mb e maiores que 5 Mb em 62.5% das deleções paternas.

A frequência da origem parental em cada categoria de rearranjo também foi dada: (i) entre as deleções terminais simples, 60% foram maternas e 40% paternas; (ii) entre as translocações não equilibradas com origem *de novo*, 83% foram maternas e 17% paternas; (iii) entre as deleções intersticiais, 75% foram maternas e 25% paternas; (iv) e pelo menos 2/3 rearranjos complexos foram originados no cromossomo materno. Entre os 10 cromossomos derivados, 7 tiveram origem *de novo* e 3 foram herdados de um genitor portador da translocação na forma equilibrada. Portanto, o risco de recorrência da síndrome foi estabelecido em ~5% (Heilstedt *et al.* 2003b).

Em dois estudos paralelos, sobre os mecanismos de origem e/ou estabilização de deleções terminais, Ballif *et al.* (2003a; 2004) demonstraram que pelo menos 2/6

deleções terminais simples caracterizadas por Heilstedt *et al.* (2003a) correspondiam a rearranjos complexos apresentando uma duplicação invertida de um segmento proximal de 1p36 após a quebra. Essas complexidades só foram reveladas após o seqüenciamento das junções dos pontos de quebra (Ballif *et al.* 2003). Posteriormente, estes rearranjos foram estudados com um *microarray* específico de 1p36 (Yu *et al.* 2003), que identificou em um caso, ganho de cópia de um segmento proximal ao ponto de quebra da deleção com ~750 kb de seqüência. No outro caso, o *microarray* não detectou nenhum ganho de cópia que, portanto, foi estimado abaixo do nível de resolução do teste (<100 kb). Em outro trabalho, Gajecka *et al.* (2005) descreveu mais 4 casos de rearranjos complexos envolvendo deleções terminais associadas com segmentos proximais em 1p36 duplicados ou triplicados e caracterizados por *array* CGH.

Recentemente, Ballif *et al.* (2007) identificaram 32 rearranjos em 1p36 em uma amostra com ~7000 casos clínicos investigada com um *microarray* com cobertura expandida nos subtelômeros. Os rearranjos identificados consistiram em deleções terminais simples (20/32), deleções intersticiais (8/32), cromossomos derivados (2/32) e rearranjos complexos (2/32). Como a cobertura do *array* em 1p era >15 Mb, os pontos de quebra dos rearranjos foram estratificados em intervalos com 1 Mb de seqüência e mostraram ocorrência em cada intervalo estabelecido (exceto 0-1 Mb e 8-9 Mb/1pter) com um agrupamento entre 2-3 Mb (28%). Em mais de 50% dos casos, as deleções eram menores que 5 Mb em extensão e em somente 10%, maiores que 10 Mb.

Os dados de uma amostra com 134 rearranjos em 1p36 caracterizados e compilados por Gajecka *et al.* (2007) mostram: (i) 90 (67.2%) deleções terminais simples; 22 (16.4%) translocações não equilibradas ou cromossomos derivados; 13 (9.7%) deleções intersticiais; e 9 (6.7%) rearranjos complexos incluindo cromossomos com deleções de diferentes segmentos em 1p36 ou com deleções associadas com duplicações ou triplicações; (ii) agrupamento de pontos de quebra comum entre as diferentes categorias de rearranjos entre 4-5 Mb do telômero de 1p; (iii) 46.3% de deleções terminais com origem materna, 41.5% com origem paterna e 12.2% com origem parental desconhecida; (iv) 83% de deleções intersticiais com origem materna; (v) maioria de cromossomos com deleções maternas <5 Mb e maioria de cromossomos com deleções paternas >5 Mb.

1.1.5 – Correlações genótipo-fenótipo

Os primeiros trabalhos de caracterização clínica e molecular da síndrome de monossomia 1p36 descreveram grande variabilidade fenotípica entre os indivíduos (Shapira *et al.* 1997; Wu *et al.* 1999). Em 13 pacientes com deleções isoladas de 1p36, Shapira *et al.* (1997) relataram que as características craniofaciais estavam presentes em pacientes com deleções de tamanhos diferentes, enquanto alguns pacientes com mesmo tamanho de deleção apresentavam grande variabilidade do quadro clínico. As maiores deleções estavam, geralmente, associadas com fenótipos mais graves e a pacientes que exibiam maior número de características clínicas. Essas diferenças não exibiam correlação aparente com a origem parental do cromossomo deletado, e como as deleções exibiam diferenças grandes nos tamanhos, foi sugerido que a variabilidade fenotípica estava, para algumas características, relacionada com a posição de genes sensíveis ao efeito de dose.

Com a amostra aumentada para 30 pacientes, Wu *et al.* (1999) indicaram regiões críticas no segmento cromossômico 1p36 para surdez neurossensorial (distal ao marcador D1S2845), RM leve e habilidade de fala complexa (distal a sonda D1Z2), e RM moderado a grave e ausência ou deficiência importante na fala (entre os marcadores D1S243 e D1S468).

A partir de estudos de correlação genótipo-fenótipo em 61 pacientes, Heilstedt *et al.* (2003a) estabeleceram regiões críticas no segmento distal de 1p36 para seis características: a região responsável pela manifestação de fontanela anterior ampla e hipotonia foi definida no segmento distal de ~ 2.0 Mb; a região responsável por déficit auditivo e cardiomiopatia, no segmento distal de 2.5 Mb e 3 Mb, respectivamente; e a região responsável por fendas orofaciais e hipotireoidismo foi definida no segmento distal de 4.0 Mb. Neste estudo, que confirmou a maioria das deleções com origem no cromossomo materno (65% *vs* 35%), não foram observadas diferenças fenotípicas com relação a este parâmetro. Outros fatores sugeridos para a variabilidade da expressão fenotípica foram não penetrância, epigenética e fatores estocásticos.

Kurosawa *et al.* (2005) identificaram correlação entre a gravidade da deficiência neurológica e o tamanho das deleções em 3/11 pacientes com RM profundo e deleções com pelo menos 8 Mb de seqüência, e relataram uniformidade no fenótipo facial e nas alterações neurológicas para 5/11 pacientes com deleções terminais com 3-4 Mb de extensão. D'Angelo *et al.* (2006) sugeriram regiões críticas para o fácies típico (entre o

gene *PEX10* e o marcador D1S468) e para obesidade e hiperfagia (entre 2.4-2.48 Mb do telômero de 1p).

Redon *et al.* (2005) descreveram dois pacientes com deleções distintas e não sobrepostas em 1p36 que apresentaram RM e características faciais de síndrome de monossomia 1p36. O paciente com deleção terminal simples restrita ao segmento distal de 2.5 Mb apresentou RM leve e fala complexa, mas tinha convulsões sem apresentar deleção do gene candidato *KCNAB2*. O paciente com deleção intersticial e retenção do segmento distal de 2.9 Mb apresentou surdez, sem que a região crítica estabelecida por Heilstedt *et al.* (2003a) estivesse deletada. Portanto, estes autores sugerem que pelo menos algumas características fenotípicas da síndrome de monossomia 1p36 sejam decorrentes de um mecanismo de efeito de posição e não da haploinsuficiência de genes na região de deleção.

Mais recentemente, Gajecka *et al.* (2007) estabeleceram correlações para uma amostra com 134 pacientes, entre o tamanho das deleções e a manifestação de fontanela anterior ampla, defeitos cardíacos estruturais congênitos, convulsões, hipotonia, dificuldades de alimentação, atraso de fala e estrabismo. Concluíram que a extensão física das deleções não está relacionada com a manifestação de um número maior destas características e que pacientes com deleções pequenas (<3 Mb) também manifestam o fenótipo completo. Portanto, sugeriram que a maioria dos genes causativos estejam mapeados no segmento mais distal de 1p36. Por outro lado, a associação de deleções maiores com apresentação fenotípica mais grave sugere que outros genes em regiões proximais possam ser causativos ou exercer um efeito modificador na expressividade de algumas características.

1.1.6 – Genes candidatos

Atualmente, os genes candidatos para algumas características da síndrome de monossomia 1p36 são o proto-oncogene *SKI* e o fator 10 de biogênese dos peroxissomos (*PEX10*) (Colmenares *et al.* 2002), a subunidade beta do canal de potássio (*KCNAB2*) (Heilstedt *et al.* 2001), o gene 23 da matrix metaloproteína (*MMP23*) (Gajecka *et al.* 2005) e a subunidade delta do receptor A do ácido gama-aminobutírico (*GABRD*) (Windpassinger *et al.* 2002).

O proto-oncogene *SKI* (MIM 164780) está mapeado ~2.1-2.2 Mb do telômero de 1p e é candidato para fendas labial/palatina. Colmenares *et al.* (2002) mostraram que camundongos *Ski*^{-/-} manifestam defeitos de tubo neural na região do crânio e redução

significativa da massa muscular esquelética e, dependendo da composição genética das linhagens de camundongos, podem manifestar fissuras de face média e ponte nasal achatada, anomalias visuais, defeitos musculares e esqueléticos e anomalias digitais, semelhantes às descritas em pacientes com a monossomia 1p36.

A perda de função de membros da família gênica *PEX*, incluindo o gene *PEX10*, está associada com um espectro de sintomas que se sobrepõem ao fenótipo da monossomia 1p36. O gene *PEX10* (MIM 602859), mapeado ~2.3 Mb do telômero de 1p é candidato para RM, hipotonia, convulsões e frontal amplo e proeminente (Colmenares *et al.* 2002).

O gene *KCNAB2* (MIM 601142) está mapeado ~6 Mb do telômero de 1p e é candidato para epilepsia em pacientes com monossomia 1p36. Heilstedt *et al.* (2001) examinaram a relação entre a hemizigose do gene *KCNAB2*, que está associado com excitabilidade neuronal, e a epilepsia em pacientes com monossomia 1p36: 89% (8/9) dos pacientes com deleção do *KCNAB2*, tinham epilepsia ou atividade epileptiforme revelado no EEG, enquanto apenas 27% (4/15) dos pacientes com o gene íntegro manifestaram o fenótipo.

O gene *GABRD* (MIM 137163), mapeado ~1.9 Mb do telômero de 1p é candidato para epilepsia e anomalias do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricas em pacientes com monossomia 1p36. Windpassinger *et al.* (2002) mapearam o gene *GABRD* (MIM 137163) na região crítica para fala e cognição sugerida por Wu *et al.* (1999) e mostraram expressão preferencial do gene no cérebro.

Os genes *MMP23A* (MIM 603320) e *MMP23B* (MIM 603321), mapeados ~1.5 Mb do telômero de 1p36 são candidatos para as características fontanela anterior ampla ou para o fechamento tardio de fontanelas. Gajecka *et al.* (2005) identificaram uma região de sobreposição mínima à seis rearranjos complexos de 1p36 em pacientes com craniossinostose ou fontanela anterior ampla ou com fechamento tardio, que continha os genes *MMP23A* e *MMP23B*. Ao demonstrarem expressão destes genes nas suturas, com função na reabsorção da matriz óssea e remodelamento, correlacionaram o aparecimento de fontanelas amplas e com fechamento tardio com a hemizigose do gene *MMP23*, enquanto a superexpressão resultaria em craniossinostose.

1.1.7 – Diagnóstico

O diagnóstico clínico de síndrome de monossomia 1p36 é sugerido, principalmente, pela aparência facial característica (sobrancelhas retas, olhos fundos,

hipoplasia da face media, ponte/raiz nasal deprimida, filtro longo e queixo pontudo) acompanhada por hipotonia, RM (geralmente entre moderado e grave) ou atraso do DNPM e ausência ou déficit importante de fala. O teste genético é imprescindível para confirmar o diagnóstico (Battaglia e Shaffer 2008).

Heilstedt *et al.* (2003b) demonstraram após análises cromossômicas confirmatórias de 61 pacientes com diagnóstico de monossomia 1p36, que 98% das deleções puderam ser visualizadas por banda G. Entretanto, pelo menos 50% dos pacientes tiveram pelo menos um estudo cromossômico anterior considerado normal. Além disso, 4/10 cromossomos derivados, 4/4 deleções intersticiais e 3/3 rearranjos complexos caracterizados por FISH subtelo mérico ou técnicas moleculares foram considerados deleções terminais isoladas de 1p36 pela citogenética.

Devido às diferenças no tamanho das deleções e tipos de rearranjos em 1p36, Heilstedt *et al.* (2003a) sugeriram o emprego de diferentes sondas de FISH ou marcadores moleculares para o diagnóstico ou caracterização de deleções 1p36. Por exemplo, deleções intersticiais não foram detectadas por FISH com a sonda subtelo mérica específica de 1p36 e a investigação subtelo mérica por FISH foi necessária na distinção entre deleções terminais simples de cromossomos derivados. Portanto, foi sugerido que a sonda subtelo mérica específica de 1p36 não fosse utilizada sozinha no diagnóstico de monossomia 1p36. A sonda do *locus* gênico *CDC2L1* (p58) identificou a maioria (>98%) das deleções (Heilstedt *et al.* 2003b).

Estes autores delinearão a seguinte estratégia diagnóstica para a monossomia 1p36: (i) detecção de deleções por cariótipo e FISH com a sonda p58; (ii) investigação subtelo mérica por FISH para identificar cromossomos derivados; (iii) FISH subtelo mérico específico nos genitores de pacientes com cromossomos derivados para identificar portadores de translocações equilibradas com risco de recorrência aumentado (Heilstedt *et al.* 2003b).

Uma das primeiras aplicações da tecnologia de *array* CGH na detecção de rearranjos cromossômicos constitucionais foi a utilização de um *microarray* específico para o diagnóstico de síndrome de monossomia de 1p36 (Yu *et al.* 2003; Ballif *et al.* 2003a). Redon *et al.* (2005) testaram seis pacientes com um *microarray* composto por 2221 clones sobrepostos representativos de 99.5% da eucromatina do cromossomo 1, que permitiu o mapeamento fino dos pontos de quebra de deleções com tamanhos entre 2-10 Mb. Shaffer *et al.* (2007) identificaram 45 rearranjos em 1p36 ao testarem ~8000 casos clínicos com um “targeted BAC *microarray*” com cobertura genômica particular

em regiões subteloméricas, pericentroméricas e regiões flanqueadas por repetições de poucas cópias (LCRs, “**Low-Copy Repeats**”).

Recentemente, Ballif *et al.* (2007) demonstraram a utilidade de um *microarray* com cobertura subtelomérica expandida no diagnóstico de MCA/MR e de monossomia 1p36. No geral, o *microarray* com ~5.7 Mb de cobertura subtelomérica identificou 169 rearranjos subteloméricos clinicamente significativos entre ~7000 casos clínicos e estabeleceu os pontos de quebra em 56% dos rearranjos, além de ter identificado deleções terminais simples (68 casos), translocações não equilibradas (53 casos), deleções intersticiais (42 casos) e rearranjos complexos (6 casos). Uma maior cobertura subtelomérica em 1p36 (>15 Mb) permitiu caracterizar e estabelecer os pontos de quebra em 32 rearranjos.

Atualmente, a estratégia de *array* CGH é a preferida sobre a técnica FISH no diagnóstico de síndrome de monossomia 1p36 por permitir definir o tipo e a extensão do rearranjo em uma única etapa (Battaglia e Shaffer 2008).

1.2 Mecanismos de origem de rearranjos cromossômicos

1.2.1 – Rearranjos genômicos

Rearranjos cromossômicos que ocorrem em regiões associadas com instabilidade genômica são chamados de rearranjos genômicos. Rearranjos genômicos são uma fonte importante de doenças genômicas e variabilidade genética na forma de variações no número de cópias (CNVs, “**Copy-Number Variants**”) e inversões (Lupski 1998; Shaw e Lupski 2004; Iafrate *et al.* 2004; Lupski 2007). Enquanto a manutenção da integridade genômica requer fidelidade no reparo de quebras na dupla fita do DNA (DSBs, “**Double-Strand-Break**”), rearranjos genômicos resultam de falhas nestes processos (Griffin e Thacker 2004; Iliakis *et al.* 2003).

Quebras na dupla fita do DNA são a principal fonte de instabilidade genômica (Aguilera e Gómez-González 2008). DSBs ocorrem naturalmente por processos endógenos, que incluem metabolismo oxidativo, erros durante a replicação do DNA, processos recombinacionais sítio-específicos programados durante a recombinação meiótica e a recombinação V(D)J [V (**V**ariável), D (**D**iversidade), J (**J**unção)], ou mediadas por topoisomerasas. DSBs também ocorrem por agentes exógenos, como por radiações ionizantes e agentes químicos (Sankaranarayanan e Wassom 2005).

As células dispõem de dois principais mecanismos de reparo de DSBs: a recombinação homóloga (HR, “**H**omologous **R**ecombination”) e a ligação de pontas não homólogas (NHEJ, “**N**onhomologous **E**nd-**J**oining”). A HR remove DSBs utilizando regiões de homologia entre as sequências de DNA. A conversão gênica (GC, “**G**ene **C**onversion”) restabelece a integridade genômica de maneira conservativa, enquanto o reparo por *annealing* de fita simples (SSA, “**S**ingle-**S**trand **A**nnealing”) o faz de forma não conservativa. A NHEJ ou recombinação ilegítima remove DSBs do genoma por permitir ligação entre fitas de DNA que compartilham pouca ou nenhuma homologia e, neste último caso, pode introduzir pequenas alterações como inserções, duplicações e deleções de poucas bases (Iliakis *et al.* 2004). Entretanto, a HR pode ocorrer entre sequências não alélicas que compartilham homologia e a NHEJ pode ocorrer entre fitas de DNA não legítimas (Griffin e Thacker 2004; Iliakis *et al.* 2003).

Três principais mecanismos de rearranjos genômicos são propostos: a recombinação homóloga não alélica (NAHR, “**N**onallelic **H**omologous **R**ecombination”), a NHEJ e FoSTeS (“**F**ork **S**talling and **T**emplate **S**witching”) (Gu *et al.* 2008).

1.2.2 – Doenças genômicas

O termo doenças genômicas foi introduzido por Lupski em 1998 para se referir às doenças genéticas causadas por rearranjos cromossômicos que envolviam a NAHR entre repetições de poucas cópias (LCRs, “**L**ow-**C**opy **R**epeats”). Atualmente, doenças genômicas abrangem as condições patológicas decorrentes de rearranjos genômicos que envolvem outras estruturas genômicas além de LCRs, como elementos repetitivos, palíndromes ou cruciformes, repetições diretas curtas e outras sequências com maior propensão à sofrer DSBs ou que interferem com a replicação (Shaw e Lupski 2004).

Rearranjos genômicos originam doenças genômicas quando levam a alterações na dosagem ou interferem com a regulação de gene(s) haploinsuficientes, por fusão gênica, efeito de posição, exposição de genes recessivos ou polimorfismos funcionais, e outros mecanismos (Lupski e Stanckiewicz 2005).

Rearranjos genômicos patogênicos podem ser recorrentes, com tamanhos comuns e pontos de quebra fixados, ou não recorrentes, com tamanhos variados e pontos de quebra dispersos, ou agrupados em um dos lados, mas com uma região de sobreposição comum (SRO, “**S**mallest **R**egion of **O**verlap”). Estas características

refletem a arquitetura genômica local e o fenótipo é em função da posição de genes (Figura 1, abaixo) (Gu *et al.* 2008).

A NAHR tem um papel principal bem estabelecido na origem de rearranjos genômicos recorrentes, enquanto os mecanismos de NHEJ e FoSTeS podem ter um papel proeminente na origem de rearranjos genômicos não recorrentes (Lee *et al.* 2007).

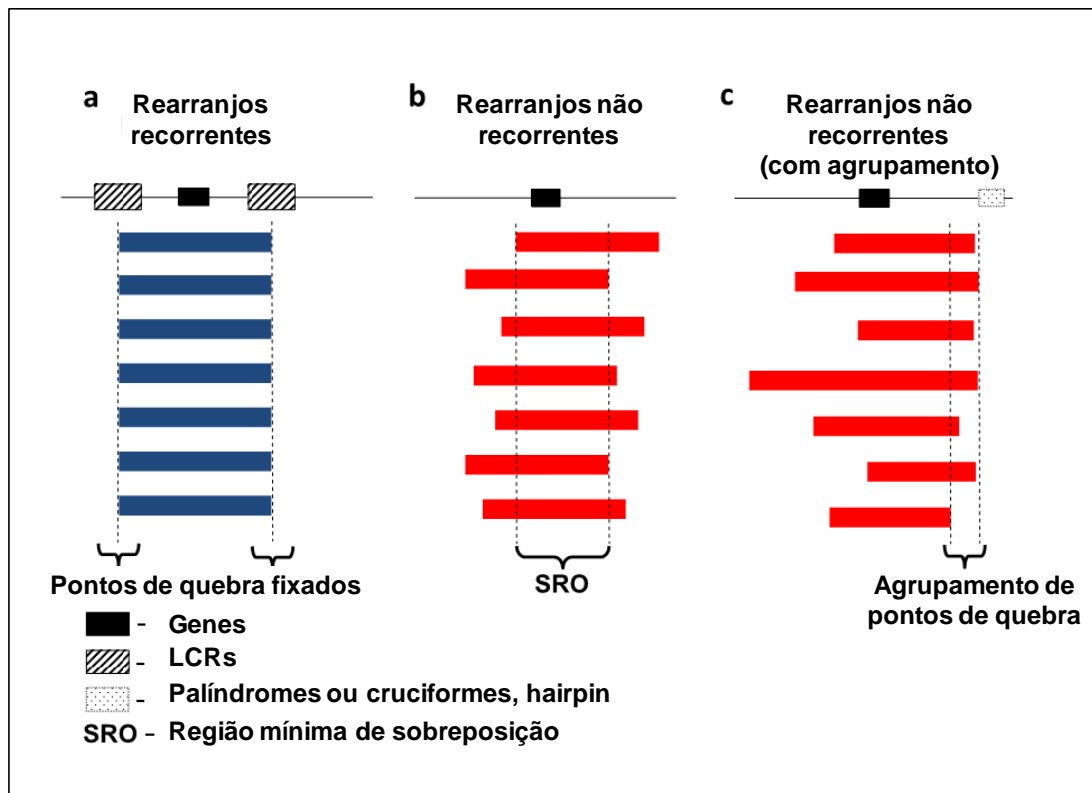


Figura 1: Rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados com doenças genômicas (figura modificada de Gu *et al.* 2008). A linha preta fina representa regiões no genoma que sofreram rearranjos genômicos. As caixas pretas representam genes contidos nestas regiões que foram afetados pelos rearranjos. Os retângulos coloridos representam os rearranjos (deleções, duplicações e inversões) e pontos de quebra. **(a)** Rearranjos recorrentes com tamanhos fixados e pontos de quebra agrupados em LCRs (caixas hachuradas). A maioria dos rearranjos genômicos recorrentes são originados pela NAHR que têm como substratos as LCRs; **(b)** Rearranjos não recorrentes com tamanhos diferentes e pontos de quebra dispersos. Rearranjos não recorrentes evidenciam uma região mínima comum de sobreposição que contém o gene causativo da doença e que permite que estes rearranjos sejam detectados; **(c)** Rearranjos não recorrentes com concentração de pontos de quebra em um lado. Alguns rearranjos não recorrentes apresentam um dos pontos de quebra concentrados em uma pequena região genômica, provavelmente, pela presença de seqüências importantes para o mecanismo de origem (caixa pontilhada).

1.2.3 – Mecanismos de origem de rearranjos genômicos

Os três principais mecanismos de rearranjos genômicos (NAHR, NHEJ e FoSTeS) estão representados na Figura 2 (pg. 28).

NAHR - Pelo menos 50% do genoma humano correspondem às seqüências repetitivas, e entre 5-10% às repetições de poucas cópias (LCRs, “**L**ow-**C**opy **R**epeats”), duplicações segmentares (SD, “**S**egmental **D**uplications”) ou duplicons. Estas estruturas provêm o genoma com vastas regiões parálogas (≥ 1 kb) que exibem alto grau de homologia ($\geq 90\%$). A recombinação homóloga não alélica (NAHR, “**N**onallelic **H**omologous **R**ecombination”) que ocorre entre LCRs durante a meiose origina rearranjos genômicos recorrentes. A NAHR também pode ocorrer entre membros relacionados de elementos repetitivos de duas famílias de transposons, SINEs (“**S**hort **I**nterspersed **N**uclear **E**lements”) e LINEs (“**L**ong **I**nterspersed **N**uclear **E**lements”), e originar rearranjos genômicos não recorrentes. Estima-se que cerca de 10% da seqüência genômica corresponda aos elementos *Alu* e 17% aos elementos *LI* (Sankaranarayanan e Wassom 2005).

A NAHR/LCRs é o principal mecanismo de origem de doenças genômicas, predominantemente, de síndromes recíprocas de deleções e duplicações cromossômicas intersticiais (Shaw e Lupski 2004; Lupski e Stankewicz 2005). O tipo de rearranjo genômico resultante deste mecanismo é em função da distância e orientação relativa entre as LCRs. Basicamente, a NAHR entre LCRs cromossomo-específicas com orientação direta resultam em deleções e duplicações do segmento genômico interveniente, enquanto que a NAHR entre LCRs com orientação invertida causam inversões. A NAHR entre LCRs transcromossômicas pode originar translocações.

A influência da arquitetura genômica em decorrência de LCRs na origem de rearranjos genômicos é ainda (i) específica para cada região cromossômica: a susceptibilidade da região ao evento de NAHR está relacionada com o arranjo da estrutura de duplicação, como o tamanho dos duplicons, grau de homologia, distância e orientação relativa, e com as taxas de recombinação meiótica, pois quanto menores as taxas maior a probabilidade de pareamento não alélico; e individual: a susceptibilidade da região ao evento de NAHR é diferente em indivíduos que apresentam uma configuração alternativa da estrutura de duplicação, como nos portadores de polimorfismos de inversão que coloca duas LCRs em orientação direta (Inoue e Lupski 2002; Stankewicz e Lupski 2002; Shaw e Lupski 2004).

Mecanicamente, a NAHR compartilha características em comum com a recombinação homóloga alélica (AHR, “**A**llelic **H**omologous **R**ecombination”). Um segmento mínimo com identidade de seqüência perfeita (MEPS, “**M**inimal **E**fficient

Processing Segments”) parece necessário para a recombinação, e os *crossovers* exibem *hotspots* de preferência de posição (Gu *et al.* 2008).

NHEJ - A NHEJ é o mecanismo predominante em mamíferos no reparo de DSBs (Mansour *et al.*, 2008) e atua na recombinação V(D)J que se inicia com a introdução de DSBs programadas às seqüências sinais específicas (Weterings e Chen 2008). A NHEJ não depende de homologia entre os substratos e promove a ligação de pontas de DNA em quatro passos: (i) ligação do heterodímero Ku70/80 às extremidades de DNA expostas por DSBs; (ii) aproximação física das pontas pela formação de um complexo sináptico que envolve o heterodímeros Ku e DNA-PKcs; (iii) processamento de extremidades não compatíveis por nucleases e polimerases; (iv) reação de ligação catalisada pelo complexo ligase IV/XRCC4 (Weterings e Chen 2008).

Rearranjos genômicos não recorrentes marcados por regiões ou não de micro-homologias ou alterações de poucas bases nos pontos de quebra caracterizam a NHEJ. A NHEJ não parece ser conduzida diretamente, nem depender estritamente de elementos genômicos específicos (Gu *et al.* 2008). Entretanto, LCRs e elementos repetitivos LTR, LINE, *Alu*, MIR, e MER2 foram descritos em pontos de quebra de rearranjos genômicos não recorrentes implicados com NHEJ, incluindo deleções do gene da distrofina (Nobile *et al.* 2002; Toffolatti *et al.* 2002), deleções do gene *PLP1* em pacientes com a doença Pelizaeus-Merzbacher (PMD; OMIM 312080) (Inoue *et al.* 2002) e deleções e translocações em 17p11.2 (Stankiewicz *et al.* 2003; Shaw e Lupski 2005). Nestes casos, estes elementos foram identificados em apenas um dos pontos de quebra e recombinaram com seqüências de cópia única no outro ponto de quebra, ou a recombinação ocorreu entre elementos não homólogos. Portanto estas seqüências podem estimular a NHEJ sem estarem fisicamente envolvidas. Além disso, motivos de seqüência TTTAAA, que causa curvatura na molécula do DNA, e repetições invertidas, que podem assumir estruturas secundárias, foram identificadas em locais próximos ou nos pontos de quebra de algumas deleções do gene da distrofina (Nobile *et al.* 2002; Toffolatti *et al.* 2002).

Seqüências com potencial de assumir conformações diferentes da forma B do DNA ou estruturas secundárias têm um papel importante reconhecido na etiologia de rearranjos genômicos (Bacolla *et al.* 2004) e estão super-representadas nas regiões dos pontos de quebra de deleções e translocações (Abeyasinghe *et al.* 2003; 2006). Por exemplo, trechos alternados de purina-pirimidina podem adotar a forma Z do DNA (“left-handed”), trechos de oligopurina ou pirimidina, a forma H (“triple-helix”),

palíndromes ou repetições invertidas assumem estruturas cruciformes e repetições diretas curtas podem assumir estruturas de DNA do tipo *hairpin*. Estas estruturas estão mais susceptíveis ao ataque por nucleases por prolongarem o estado de DNA unifilamentoso, ou interferirem com a progressão da forquilha de replicação (Inagaki *et al.* 2009).

A NHEJ pode estar envolvida no reparo entre fitas de DNA não legítimas que origina a t(11;22) (11q23;22q11), que constitui a translocação não robertsoniana mais comum em humanos. Os pontos de quebra são agrupados em regiões de repetições palindrômicas ricas em AT (PATRRs, “**P**alindromic **A**T-rich **R**epeat **R**egions”) e a proximidade física entre estes *loci* cromossômicos durante a meiose propicia a recombinação ilegítima (Ashley *et al.* 2006). Além disso, a NHEJ parece ter um papel importante na origem de rearranjos subtelo méricos (Ballif e Shaffer 2006).

FoSTeS - Diferente da NAHR e NHEJ, FoSTeS é induzido por erros no processo de replicação do DNA e origina rearranjos genômicos não recorrentes com complexidades e micro-homologias nas junções dos pontos de quebra (Lee *et al.* 2007; Gu *et al.* 2008). O modelo foi baseado na observação de duplicações do gene “proteolipid protein 1” (*PLP1*) interrompidas por segmentos triplicados, deletados ou intactos e com micro-homologias nas junções, consistentes com um mecanismo de deslizamentos seriais da cadeia crescente da forquilha de replicação (Lee *et al.* 2007).

Este modelo propõe que a parada ou pausa da forquilha de replicação, em virtude da presença de estruturas secundárias ou lesões de fita única no DNA em regiões de instabilidade genômica, pode levar a fita *lagging* a se desprender da original e alternar serialmente para outras forquilhas de replicação ativas que estejam próximas fisicamente ou que tenham sido aproximadas, até completar a replicação no sítio original (Lee *et al.* 2007). A invasão da fita original requer regiões de micro-homologia com os sítios invadidos para o *priming* da extremidade 3' e re-início da replicação nestes pontos.

O rearranjo genômico resultante deste mecanismo é em função da posição relativa entre as forquilhas, da polaridade das fitas e do sentido das forquilhas invadidas, e da processividade da polimerase utilizada que influencia no número de eventos de FoSTeS necessários para completar a replicação (Gu *et al.* 2008).

Análises *in silico* do *locus* do gene *PLP1* revelaram uma arquitetura genômica complexa composta por múltiplas LCRs (Lee *et al.* 2006) e rearranjos genômicos não recorrentes complexos em outros *loci* também apresentam uma arquitetura genômica

complexa composta por LCRs, como a região 17p11.2 envolvida nas síndromes de Smith-Magenis/Potocki-Lupski (SMS/PTLS) e o *locus* do gene *MECP2*. Portanto, LCRs podem estimular FoSTeS e aproximar forquilhas de replicação distantes (Lee *et al.* 2007; Hastings *et al.* 2009). Atualmente, FoSTeS pode explicar rearranjos complexos nestes *loci* e no *locus* da distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Gu *et al.* 2008).

Mais recentemente, Hastings *et al.* (2009) sugeriram outro mecanismo induzido por erros no processo de replicação do DNA (MMBIR, “**M**icrohomology-**M**ediated **B**reak-**I**nduced **R**eplication”) na origem de rearranjos genômicos não recorrentes complexos que envolvem grandes trechos de DNA. MMBIR é mecanisticamente semelhante ao FoSTeS e foi derivado do modelo de replicação induzida por quebra (BIR) que foi proposto para a re-iniciação da replicação em leveduras durante a colisão de forquilhas de replicação e na manutenção telomérica de linhagens celulares humanas que perderam a atividade da telomerase. Nestes sistemas, BIR é um processo acurado que depende da proteína RecA/Rad51 e requer longos trechos de homologia, enquanto o modelo MMBIR propõe independência destas proteínas para a retomada da replicação.

Ambos os modelos BIR e MMBIR são iniciados por uma DSB gerada do encontro de uma forquilha de replicação com uma quebra no DNA de fita simples. Como a DSB não pode ser reparada por HR ou NHEJ por não haver outra ponta livre à frente, ocorre ressecção da extremidade 5' e exposição de uma ponta 3' *overhang*, que segundo o modelo MMBIR propõe, pode invadir sucessivas vezes outras regiões de fita única no genoma que compartilham homologia e servir de *priming* para re-iniciar a replicação nestes pontos.

O cenário favorável para o reparo por MMBIR requer a regulação negativa de RecA/Rad51, que previne o processo acurado por BIR, e a presença de seqüências que podem assumir estruturas secundárias na molécula do DNA. Além de expor sítios genômicos de fita-única, estas estruturas aumentam a chance de parada ou pausa da forquilha de replicação, podendo iniciar o processo.

O modelo de BIR baseado em micro-homologias foi implicado na origem de um rearranjo complexo em Xq28 (Sheen *et al.* 2007) e duplicações complexas do gene *MECP2* (Bauters *et al.* 2008). BIR dependente de micro-homologia é também o mecanismo de origem sugerido para alguns rearranjos subteloméricos (Ballif *et al.* 2004a; Rooms *et al.* 2006).

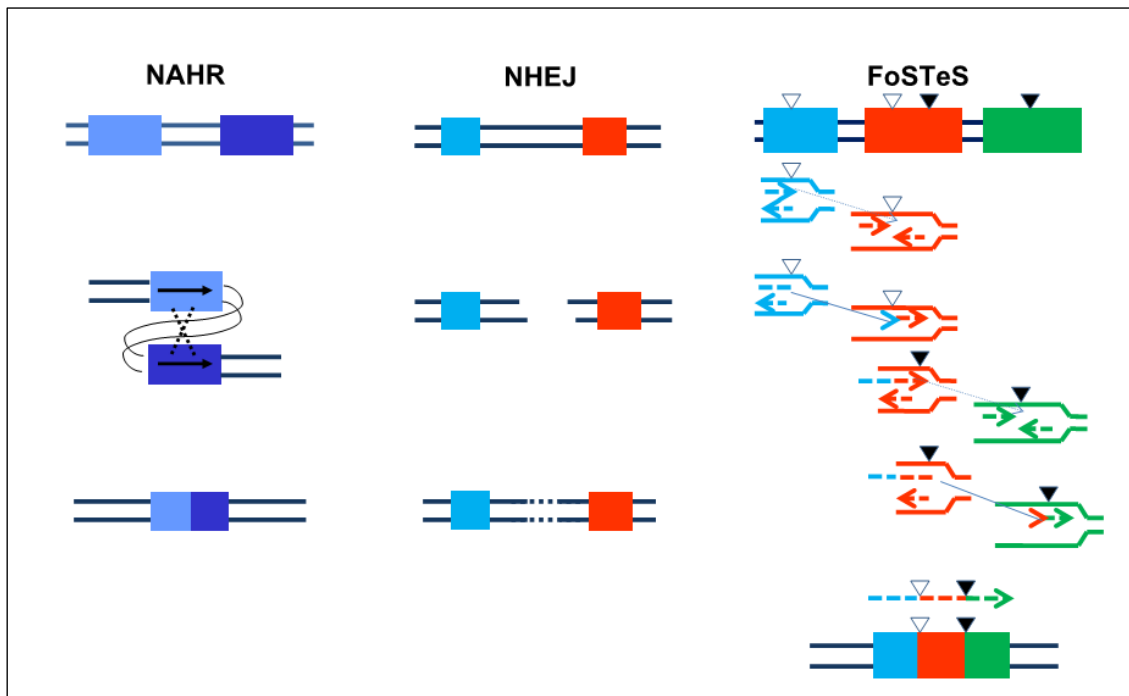


Figura 2: Comparação entre os mecanismos de NAHR, NHEJ e FoSTeS na origem de deleções/duplicações genômicas (figura modificada de Gu *et al.* 2008). **(NAHR)** Representação de um evento de NAHR entre duas LCRs (caixas azuis, as diferenças na tonalidade do azul indicam grau de homologia entre 97-98%) com orientação direta em uma mesma cromátide. No esquema, o alinhamento entre LCRs não alélicas acompanhado de um evento de recombinação origina deleção das seqüências intervenientes e de parte das LCRs. **(NHEJ)** DSBs são criadas entre as duas seqüências representadas pelas caixas azul e laranja (as cores diferentes indicam inexistência de homologia entre as seqüências). Na existência de micro-homologias, a maquinaria da NHEJ pode ligar diretamente as pontas de DNA expostas e, na ausência, a ligação é antecedida do processamento das pontas. Em ambos os casos, ocorre deleção das seqüências entre as duas DSBs. **(FoSTeS)** Representação de dois eventos de FoSTeS na origem de uma deleção complexa que envolve dois fragmentos. As caixas azuis, laranja e verde representam as seqüências envolvidas no mecanismo e as cabeças de seta apontadas para baixo indicam sítios de micro-homologia (2-5 nt) entre os substrato azul e laranja (cabeça de seta vazia) e laranja e verde (cabeça de seta preta). As forquilha de replicação das duas seqüências adjacentes estão representadas na mesma cor que as caixas coloridas. A fita *leading* crescente (azul) invade a forquilha de replicação vizinha (laranja) em um sítio com micro-homologia e inicia sua replicação a partir deste ponto. Ao encontrar outro sítio de micro-homologia com a forquilha seguinte, a fita crescente (laranja) novamente invade esta outra forquilha. O produto final é a justaposição de seqüências genômicas de várias regiões diferentes dependendo de quantos forem os eventos de FoSTeS necessários para completar a replicação.

1.2.4 – Subtelômeros

Subtelômeros são regiões excepcionais do genoma que formam a zona de transição entre as seqüências cromossômicas de cópia única e as repetições teloméricas (TTAGGG)_n de cada cromossomo (Mefford e Trask 2002). Subtelômeros são constituídos por um mosaico de seqüências parálogas, referidas por repetições associadas aos telômeros (TAR “Telomere-Associated Repeats”), repetições subteloméricas (Srpt, “Subtelomeric repeats”), duplicações segmentares ou duplicons subteloméricos, que tiveram origem recente por translocações originadas predominantemente por NHEJ (Linardopoulou *et al.* 2005). Duplicons subteloméricos

constituem 25% do segmento distal de 500 kb e 80% da seqüência de 100 kb adjacente aos telômeros (Ambrosini *et al.* 2007).

As regiões subteloéricas apresentam uma estrutura comum de dois domínios que estão separados por repetições teloméricas degeneradas. Os duplicons no domínio distal são menores (<2 kb), mais divergentes e estão duplicados em muitos subtelomeros. Os duplicons do domínio proximal são maiores (10-40 kb), mais conservados e duplicados em poucos subtelomeros (Knight e Flint 2000; Mefford e Trask 2002; Ambrosini *et al.* 2007). Uma figura mais detalhada da estrutura de duplicação subteloérica mostrou famílias de duplicons subteloéricos exclusivas de subtelomeros e famílias com representantes também em sítios intersticiais, que variam enormemente no tamanho e apresentam considerável grau de divergência nucleotídica entre seus membros, e que estão diferentemente organizados entre os subtelomeros em um mosaico de blocos repetitivos (Figura 3, abaixo).

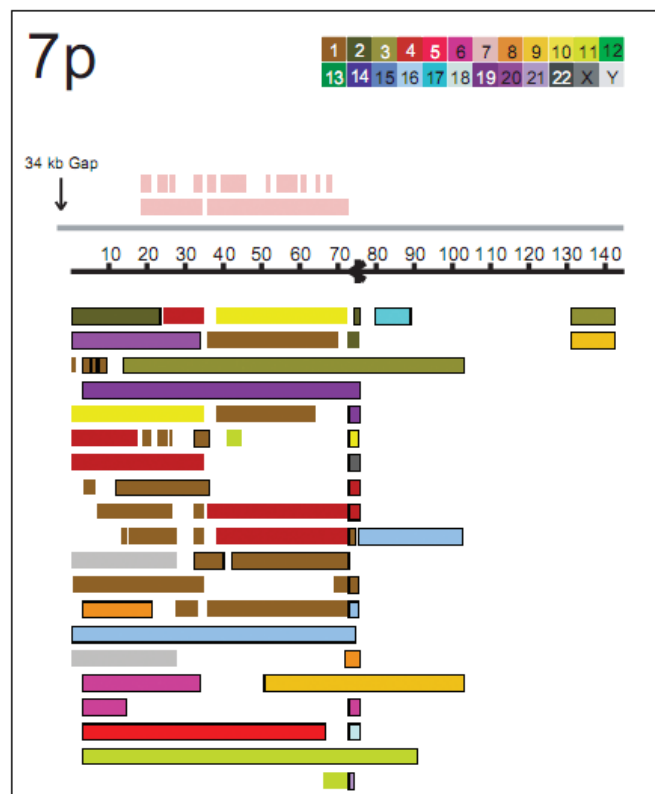


Figura 3: Estrutura de duplicação da região subteloérica 7p. A figura mostra a seqüência referênciada do segmento distal de 140 kb de 7p, com o telômero à esquerda (segmento distal de 34 kb não seqüenciado). Nenhum duplicon foi identificado na região com 350 kb de seqüência proximal. As duplicações segmentares estão representadas por cromossomo (cores). A linha cinza acima das coordenadas indica a distância do fim ao início das repetições subteloéricas seqüenciadas (seta vertical). As caixas contornadas representam duplicons exclusivos de subtelomeros, as caixas abertas indicam duplicons em sítios intersticiais e duplicons intracromossômicos estão representados acima das coordenadas. Figura original Ambrosini *et al.* (2007).

A arquitetura de cada subtelômero é determinada pelo seu conteúdo e arranjo de duplicações segmentares (Ambrosini *et al.* 2007). Subtelômeros alélicos podem variar enormemente no conteúdo e organização de duplicons, enquanto subtelômeros não alélicos podem compartilhar até mais que 100 kb de contínua identidade de seqüência (Linardopoulou *et al.* 2005). Além disso, o grau de divergência nucleotídica entre os membros de uma mesma família de duplicons subteloméricos sugere uma alta frequência de interação intercromossômica entre estas regiões (Linardopoulou *et al.* 2005). Portanto, subtelômeros representam sítios de instabilidade genômica.

1.2.5 – Rearranjos subteloméricos

Ledbetter (1992) especulou sobre a importância de rearranjos subteloméricos submicroscópicos na etiologia de malformações congênitas múltiplas e retardamento mental (MCA/MR, “**M**ultiple **C**ongenital **A**nomalies/**M**ental **R**etardation”). Esta especulação foi baseada no reconhecimento de uma arquitetura genômica complexa nestas regiões, que associada às altas taxas de recombinação meiótica destes *loci* e às elevadas taxas de concentração gênica nas bandas cromossômicas distais poderiam intermediar rearranjos patogênicos (Ledbetter 2007).

Atualmente, após a primeira demonstração por Flint *et al.* (1995) da contribuição de rearranjos subteloméricos crípticos na etiologia destas condições, a frequência de rearranjos subteloméricos patogênicos em pacientes com RM inespecífico esta confirmada em ~2.5% (Ledbetter e Martin 2007)

Apenas recentemente os mecanismos de origem de rearranjos subteloméricos começaram a ser investigados, graças à clonagem e seqüenciamento dos pontos de quebra em poucas deleções terminais, especialmente, as deleções envolvendo a região cromossômica 1p36 (Ballif *et al.* 2003; Ballif *et al.* 2004a e b; Gajecka *et al.* 2005; Gajecka *et al.* 2006a e b; Rooms *et al.* 2006; Gajecka *et al.* 2008).

Diante da necessidade de telômeros nas extremidades cromossômicas, duas questões recorrentes no estudo dos mecanismos de formação de deleções terminais são: (1) como são originados cromossomos com deleções terminais? (2) como cromossomos com deleções terminais são estabilizados?

Na ausência de telômero, os cromossomos se tornam propensos a fusões de ponta e à degradação exonucleolítica. A instabilidade cromossômica decorrente da perda de telômeros está normalmente associada com o processo de carcinogênese (Murnane 2006). Além disso, os telômeros são importantes para a replicação das pontas

cromossômicas e participam do pareamento dos cromossomos homólogos na meiose e do processo de recombinação (Mefford e Trask 2002).

Considerando a necessidade de telômero nas extremidades cromossômicas, pelo menos dois mecanismos podem explicar a estabilização de cromossomos com deleções terminais: (i) síntese *de novo* de repetições teloméricas pela enzima telomerase ou cicatrização telomérica (*telomere healing*) e (ii) obtenção de seqüências teloméricas através de um rearranjo cromossômico ou captura telomérica (*telomere capture*). Enquanto a cicatrização telomérica implica em dois eventos independentes na origem e estabilização de cromossomos com deleções terminais, a captura telomérica geralmente implica em um único processo (Ballif *et al.* 2000).

A captura telomérica envolve eventos de HR entre extremidades cromossômicas alélicas ou pontas não alélicas que compartilham identidade de seqüência. A captura telomérica entre cromossomos não homólogos origina cromossomos derivados com deleções terminais, enquanto a captura de seqüências teloméricas a partir de uma cromátide irmã ou cromossomo homólogo origina cromossomos com deleções intersticiais, indistinguíveis em estrutura daqueles que retiveram o telômero original intacto. Além disso, a captura telomérica pode ser confundida com a cicatrização telomérica quando o rearranjo ocorre muito próximo do telômero resultando em deleções terminais aparentemente puras. Basicamente, repetições teloméricas puras adicionadas às seqüências únicas intactas indicam cicatrização e variações de repetições teloméricas indicam captura telomérica (Ballif *et al.* 2000; Ballif *et al.* 2003).

Pelo menos 3 modelos de captura telomérica são propostos na literatura para cromossomos com deleções terminais (revisão em Stankiewicz e Lupski 2002; Mefford e Trask 2002; Ballif *et al.* 2004):

NAHR – o fato de LCRs estarem enriquecidas em regiões subteloméricas e pericentroméricas sugere que a NAHR entre LCRs posicionadas em regiões terminais não alélicas seja um mecanismo envolvido na origem e estabilização de alguns cromossomos com deleções terminais.

SPPR (“Subtelomeric Pairing with Proximal Recombination”) – devido ao alto grau de homologia entre TARs não alélicas, é provável o pareamento desigual de subtelômeros não homólogos durante a meiose, que pode favorecer a ocorrência de um *crossover* na região de cópia única adjacente proximal entre elementos repetitivos dispersos pelo genoma, como seqüências *Alu*. A captura telomérica por HR entre dois elementos *Alu* relacionados foi descrita por Flint *et al.* (1996) em 16p.

BIR (“**B**reak **I**nduced **R**eplication”) – este mecanismo de reparo de DSB foi extensivamente estudado em leveduras e envolve a invasão de uma ponta da molécula de DNA em sítios cromossômicos intactos, na presença de uma região grande de homologia ou, ocasionalmente, de micro-homologias entre as seqüências “invasoras” e “invadidas”, para iniciar sua própria replicação utilizando como molde as seqüências do cromossomo intacto e podendo se estender até o telômero.

Estes modelos estão representados abaixo na Figura 4.

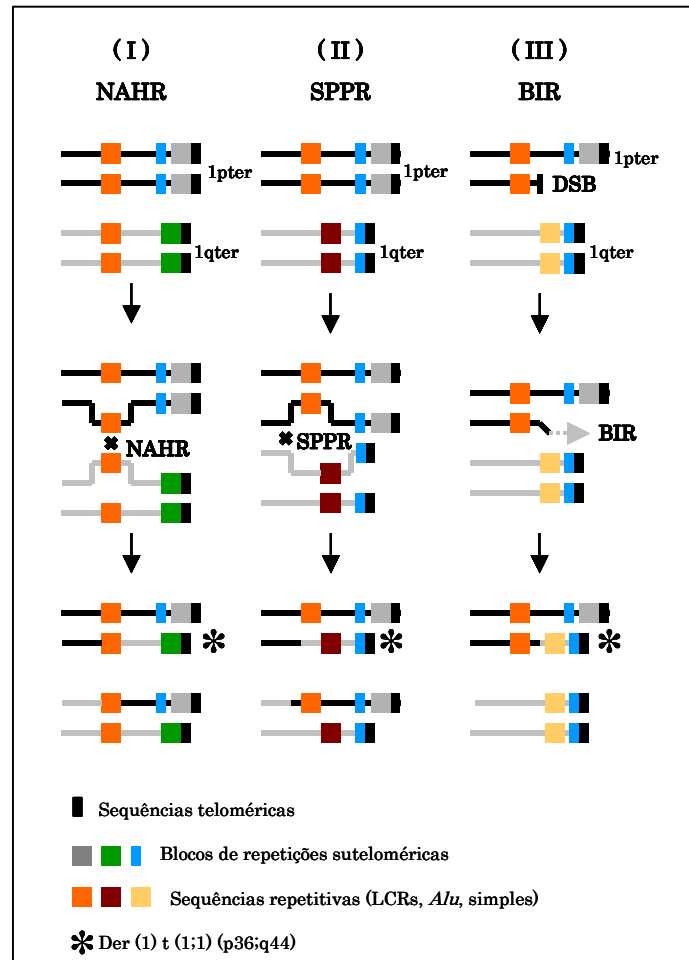


Figura 4: Modelos de captura telomérica entre os subteloômeros de 1p e 1q na origem de translocação não equilibrada (figura modificada de Ballif *et al.* 2004a). (I) A NAHR entre LCRs (caixas laranja) intercromossômicas em 1p e 1q pode originar um cromossomo derivado com deleção terminal de 1p e duplicação das seqüências de 1q (asterisco). Neste caso, os pontos de quebra ocorrem dentro das LCRs; (II) O modelo SPPR é propiciado pela homologia das regiões TAR (caixas azuis), que aumenta a chance de um *crossing* desigual proximal entre seqüências repetitivas em 1p e 1q, que compartilham homologia (as caixas laranja e vermelha representam dois elementos *Alu* relacionados). Um evento de SPPR intercromossômico também pode originar um cromossomo derivado com deleção terminal de 1p e duplicação das seqüências de 1q (asterisco). Entretanto, os pontos de quebra não ocorrem em LCRs, mas em elementos de seqüência repetitiva relacionados; (III) No modelo BIR, uma única DSB em 1p que leva a perda de todo o segmento distal, incluindo o telômero, pode expor seqüências (caixa laranja) que ao encontrar (micro) homologia com seqüências em 1q (caixa bege) pode invadir este sítio intacto e re-iniciar sua replicação a partir deste ponto, utilizando como molde as seqüências do cromossomo intacto e podendo se estender até o telômero. BIR resulta em uma translocação não recíproca (asterisco) e não requer regiões significativas de homologia nos pontos de quebra.

1.2.6 – Monossomia 1p36 como modelo no estudo dos mecanismos de formação de rearranjos subteloméricos em humanos

Os mecanismos responsáveis por rearranjos subteloméricos em humanos foram pouco investigados (Ledbetter e Martin 2007). Em raras ocasiões os pontos de quebra de rearranjos subteloméricos foram examinados ao nível de seqüência nucleotídica, com exceção de uma dúzia de casos de deleções terminais em 1p36.

Ballif *et al.* (2000) sugeriram a investigação subtelomérica por FISH como um primeiro passo na caracterização dos mecanismos que resultam na estabilização de cromossomos com deleções terminais. Segundo estes autores, a cicatrização telomérica estaria implicada com deleções terminais simples e a captura telomérica com cromossomos derivados.

A partir de linhagens somáticas híbridas contendo o cromossomo 1 deletado segregado do homólogo normal, Ballif *et al.* (2003) refinaram os pontos de quebra de três deleções terminais simples de 1p36 em intervalos com 1 kb de seqüência. Para demonstrar a presença de repetições teloméricas puras imediatamente adjacentes às seqüências únicas intactas de 1p36, utilizaram uma estratégia de PCR (*Telomere-anchored PCR*) que consistia de um *primer* complementar às seqüências únicas intactas de 1p36 (<1 kb distantes dos potenciais pontos de quebra) e outro *primer* complementar à seqüência telomérica.

Esta estratégia confirmou a cicatrização telomérica na estabilização de 1/3 deleções terminais, com pelo menos 11 repetições teloméricas puras (TTAGGG)_n seqüenciadas após a quebra. Em dois outros casos, a não amplificação de produtos de PCR específicos sugeriu a presença de outras seqüências, e não as teloméricas, após os pontos de quebra. Em cada caso, fragmentos de junção específicos dos cromossomos rearranjados foram identificados após digestão de restrição e *Southern blot* com sondas das seqüências únicas justaproximais aos potenciais pontos de quebra. O seqüenciamento destes fragmentos revelou uma duplicação invertida interrompida após os pontos de quebra das deleções, com micro-homologia de 2 nucleotídeos na junção do ponto de quebra em um caso e ausência de homologia em outro.

A estrutura destas duplicações invertidas foi considerada idêntica à observada em linhagens de células tumorais humanas que sofreram ciclos mitóticos de quebra-fusão-ponte (BFB, “**B**reak-**F**usion-**B**ridge”) (Ballif *et al.* 2003). Ciclos BFB se originam em cromossomos dicêntricos formados por fusões de ponta entre cromátides irmãs que perderam o telômero. Cromossomos dicêntricos estão sujeitos a quebras durante a

passagem pela anáfase devido à tensão ocasionada pela ligação de dois centrômeros a pólos opostos da célula e, perpetuam a instabilidade cromossômica até que um novo telômero seja adquirido (Riha *et al.* 2006).

Ballif *et al.* (2003) sugeriram um modelo na origem de cromossomos com deleções terminais associadas com duplicações invertidas interrompidas, iniciado por uma DSB distal anterior à duplicação do DNA durante a mitose de células germinativas precursoras. O reparo por NHEJ forma um cromossomo dicêntrico que ao passar por pelo menos um ciclo BFB antes da obtenção de um novo telômero origina uma linhagem celular com um cromossomo com deleção terminal associado com uma duplicação invertida de um segmento proximal, e outra linhagem com um cromossomo com deleção terminal simples (Figura 5, pg. 35).

Para verificar os mecanismos de captura telomérica envolvidos na origem e/ou estabilização de deleções terminais 1p36, Ballif *et al.* (2004a) mapearam por FISH os pontos de quebra de três cromossomos derivados envolvendo translocações não equilibradas *de novo* entre 1p e 1q e alinharam as seqüências genômicas das regiões contendo os pontos de quebra para identificar homologias. Entretanto, identificaram nos três casos, heterogeneidade quanto à localização das quebras em 1p e 1q e ausência de regiões significativas de homologia entre os clones nos pontos de quebra.

Estes achados excluíram a origem destas translocações por NAHR entre LCRs. O modelo SPPR na origem de translocações não equilibradas implicaria em um evento de HR entre cromátides irmãs, porém a caracterização destes cromossomos derivados por marcadores de microssatélites revelou rearranjos com origem intracromossômica. Por outro lado, a captura telomérica por BIR não requer a presença de LCRs nos pontos de quebra e admite que as seqüências de 1qter tenham sido copiadas do cromossomo com a deleção. Portanto, Ballif *et al.* (2004a) sugeriram o modelo BIR na estabilização dos três cromossomos derivados com deleções terminais.

Ballif *et al.* (2004b) refinaram as junções dos pontos de quebra de outras 4 deleções terminais simples de 1p36 para verificar a presença de repetições teloméricas puras após as quebras. Entretanto, a estratégia utilizada antes por Ballif *et al.* (2003) de *telomere anchored* PCR não identificou produtos específicos, indicando a presença de outras seqüências após cada ponto de quebra. Além disso, diversas tentativas de clonagem das junções dos pontos de quebra não foram bem sucedidas e sugeriram se tratar de rearranjos mais complexos.

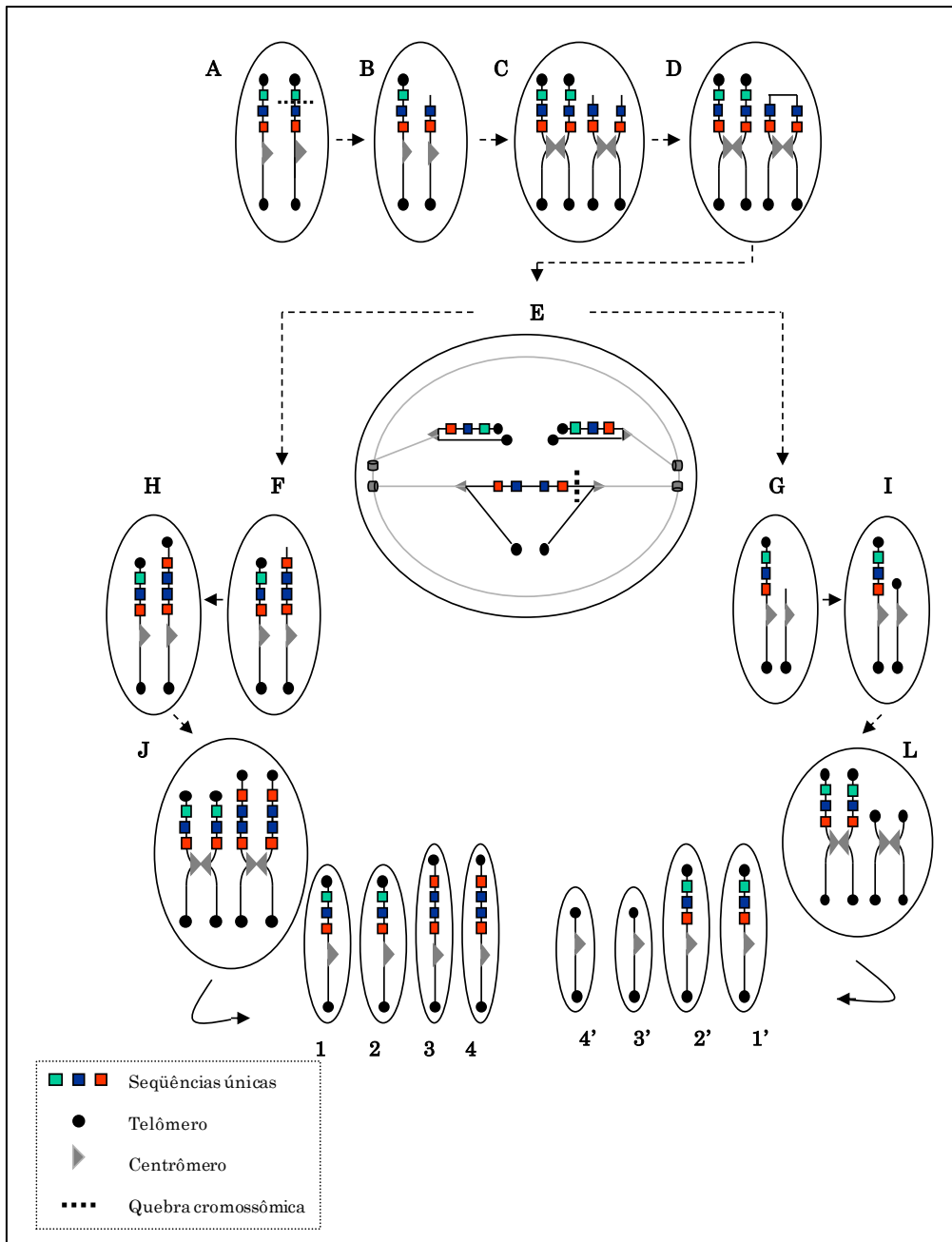


Figura 5: Modelo hipotético da origem pré-meiótica das deleções terminais associadas a duplicações invertidas (modificada de Ballif *et al.* 2003). **(A)** DSB próxima ao telômero em um dos homólogos do cromossomo 1; **(B)** formação da deleção terminal; **(C)** replicação do DNA resultando em duas cromátides irmãs com a mesma deleção terminal; **(D)** a não aquisição da capa telomérica acarreta na degradação exonucleolítica (não representada) e na fusão das pontas expostas; **(E)** durante a anáfase mitótica o novo cromossomo dicêntrico forma uma ponte e é quebrado em um local qualquer. **(F)** ao final da mitose é originada uma célula contendo um cromossomo 1 com a duplicação invertida associada a deleção terminal e **(G)** uma célula com o cromossomo 1 com a deleção terminal pura; **(H e I)** antes da próxima divisão estes cromossomos são estabilizados por regeneração ou captura telomérica; **(J e L)** estes cromossomos são então replicados com a alteração. O ciclo é interrompido até que estas linhagens germinativas precursoras estejam suficientemente maduras para sofrer a meiose e originar gametas normais (**1, 2, 1', 2'**), gametas portando a duplicação invertida interrompida associada a deleção terminal (**3, 4**) e gametas com a deleção terminal pura (**3', 4'**).

Os pontos de quebra em 1p36 foram refinados em intervalos genômicos contendo vários elementos de repetição dispostos em *tandem*. Entre eles, elementos repetitivos tipo MER2, LTR (MaLR, ERVL), SINEs (*Alu*, MIR), repetições simples (microssatélites, minissatélites) e LINEs (L1, L2). Estas seqüências poderiam conferir instabilidade genômica nas regiões onde ocorreram as quebras por: (i) favorecerem a ocorrência de eventos de HR desigual, uma vez que seqüências *Alu* e/ou L1 foram identificadas em 3/4 intervalos de pontos de quebra; (ii) facilitarem erros de replicação, já que repetições simples com propensão a adotar estruturas secundárias na molécula do DNA, como microssatélites e minissatélites, foram observadas em 2/4 regiões de ponto de quebra; (iii) ou estas seqüências poderiam representar sítios favoráveis para o mecanismo a ser adotado no reparo de DSBs.

Gajicka *et al.* (2005) implicaram a NHEJ seguida de ciclos BFB na formação de quatro rearranjos complexos correspondendo a deleções terminais de 1p36 associadas com segmentos proximais duplicados e/ou triplicados que foram caracterizados com um *microarray* específico de 1p36. Em cada caso, a reconstrução por FISH com sondas do contíguo de 1p36 e pela investigação subtelomérica do cromossomo 1 rearranjado, indicou: (i) caso 1 - três ciclos BFB e três inversões na origem de um cromossomo com deleção do segmento mais distal, seguido de outro triplicado (~1.25 Mb) e mais um duplicado (~4 Mb); (ii) caso 2 - dois ciclos BFB e duas inversões na origem de uma deleção terminal (~1 Mb) com um segmento adjacente triplicado (~2.8 Mb) e duplicação de uma região mais proximal (~400 kb); (iii) caso 3 - um ciclo BFB na origem de uma deleção terminal (~2 Mb) com um segmento adjacente duplicado (~0.4 Mb); (iv) caso 4 - dois ciclos BFB e duas inversões na formação de uma deleção terminal (~3 Mb) seguida de um segmento mais proximal duplicado (~350 kb). Exceto o caso 2, que envolveu uma translocação entre 1p e 19q, os demais casos eram de deleções terminais puras de 1p36.

Tonk *et al.* (2005) hipotetizaram pelo menos um ciclo BFB na formação de um rearranjo caracterizado por FISH com uma deleção terminal de 1p <560 kb em extensão, seguida de um segmento com pelo menos 10 Mb de seqüência duplicada e invertida.

Rooms *et al.* (2006) clonaram e seqüenciaram a junção do ponto de quebra de uma deleção terminal de 1p36 detectada por MLPA e refinada por *southern blotting*. A clonagem por *vectorette* PCR, que permite a amplificação de fragmentos de DNA específicos em situações onde a seqüência de um único *primer* é conhecida, revelou um

segmento duplicado 2.5 vezes após a quebra, com origem na seqüência de 13 pb justaproximal ao ponto de quebra, seguido distalmente por um fragmento com 33 pb com origem desconhecida e por um trecho rico em repetições GA. O ponto de quebra foi localizado em uma região de DNA de cópia única, ~1 kb distante de uma repetição LINE L1 de um lado e ~200 pb de um elemento LTR e MLT1K de outro. Além disso, a região ao redor do ponto de quebra estava enriquecida por trechos contínuos de seqüência rica em guanina.

Para os autores: (i) a identificação do ponto de quebra em uma região de cópia-única exclui a NAHR/LCRs como mecanismo de origem; (ii) a detecção de uma duplicação com orientação direta de uma seqüência justaproximal ao ponto de quebra sugere origem por deslizamento da polimerase durante o reparo; (iii) a observação de seqüências que podem formar estruturas tetraplex na molécula de DNA ao redor do ponto de quebra pode sugerir envolvimento destas na formação de DSBs nesta região ou no mecanismo de reparo; (iii) a observação após a quebra de seqüências ricas em dinucleotídeos GA, que pode assumir estruturas tríplices na molécula do DNA, pode estar relacionada com o mecanismo de reparo.

Em uma translocação não equilibrada entre os cromossomos 11q e 20q, Rooms *et al.* (2006) identificaram uma seqüência com 8 pb de origem desconhecida entre o ponto de quebra em 11q e as seqüências translocadas de 20q. O ponto de quebra em 11q ocorreu em um elemento LINE L2 e foi observado um *hotspot* de recombinação (cerne *Alu*) ~780 pb *upstream* deste ponto de quebra. Em 20q, o ponto de quebra ocorreu em uma região de cópia única, ~35 kb *upstream* de um retrotransposon LTR. Portanto, excluíram a origem deste rearranjo por NAHR ou SPPR. Além disso, localizaram próximo do ponto de quebra em 11q um *hotspot* de erro da DNA polimerase alfa (GGGGGA), envolvido com escorregamento da polimerase e normalmente super-representado em pontos de quebra de translocação, e verificaram uma propensão da região a formar estruturas *hairpin*.

Portanto, a caracterização dos pontos de quebra destes dois rearranjos subteloméricos sugeriu que a ocorrência de DSBs em sítios distais pode envolver estruturas diferentes da forma B-DNA (Rooms *et al.* 2006).

Recentemente, os pontos de quebra de deleções 1p36 complexas e de translocações recíprocas nos genitores de pacientes com a monossomia 1p36 foram estudados (Gajecka *et al.* 2006a; 2006b; 2006c; 2008).

Gajicka *et al.* (2006a) estudaram um rearranjo complexo *de novo* de 1p36 envolvendo três deleções intersticiais e uma inversão. Análises por FISH haviam identificado duas deleções intersticiais com os pontos de quebra estabelecidos: deleção I (B1-B2) e deleção II (B3-B4). Durante o refinamento dos pontos de quebra com linhagens híbridas contendo o cromossomo rearranjado isolado, uma terceira deleção foi identificada na região mais distal, com o ponto de quebra definido deleção III (B5-B6). Por PCR, identificaram um fragmento de junção específico do ponto de quebra B3-B4, mas não entre B1-B2 ou B5-B6. A estratégia de “TOPO[®] Walker”, que permite clonar seqüências desconhecidas de DNA utilizando as seqüências adjacentes, revelou um fragmento de junção entre B6-B2, mas nenhum para B1 ou B5. Estes achados sugeriram uma inversão do segmento contido entre B6 e B2. O seqüenciamento dos fragmentos clonados B3-B4 e B2-B6 revelaram junções simples nos pontos de quebra, ausentes de qualquer homologia e sem inserções de nucleotídeos. Além disso, 3/4 pontos de quebra ocorreram em seqüências de DNA de cópia única, e somente um ponto de quebra ocorreu em um elemento *Alu*. Portanto, os autores sugeriram o envolvimento da NHEJ no reparo de múltiplas DSBs em 1p36, e relataram a presença de sítios consensos da proteína *translin* nas regiões próximas dos pontos de quebra. A proteína *translin* se liga especificamente a seqüências consenso nas junções dos pontos de quebra de translocações.

Para investigar os mecanismos de formação de translocações recíprocas, Gajicka *et al.* (2006b) clonaram os pontos de quebra de três translocações recíprocas entre 1p e 9q em genitores de pacientes com cromossomos derivados. O seqüenciamento de fragmentos de junção específicos do cromossomo 1 derivado, identificados por “TOPO[®] walker” após o refinamento dos pontos de quebra com células híbridas, revelou em dois casos uma inserção de 5 pb entre as seqüências de 1p e 9q e uma junção simples em outro caso. Nos dois primeiros casos, o seqüenciamento dos fragmentos de junção específicos do cromossomo 9 derivado revelou ainda duplicações de poucos nucleotídeos das seqüências que antecederam os pontos de quebra. A identificação de inserções e duplicações nas junções dos pontos de quebra de 2/3 translocações sugeriu o mecanismo de NHEJ na formação destes rearranjos.

Para investigar quanto à presença de seqüências que podem interferir com a NHEJ, Gajicka *et al.* (2006c) analisaram as seqüências próximas de cada ponto de quebra das translocações recíprocas entre 1p e 9q. Todos os pontos de quebra ocorreram em regiões ricas em GC, que estão correlacionadas com um aumento na ocorrência da

transição B-Z da estrutura do DNA, e 5/6 caíram em seqüências de DNA de cópia-única; um ponto de quebra incidiu em um elemento de repetição L1MB5. O alinhamento das junções dos pontos de quebra das translocações também não revelou homologia significativa. Diversos motivos de seqüência associados com uma configuração diferente da forma B do DNA foram observados nos locais ou próximos dos pontos de quebra, além de alguns motivos de seqüência de enzimas endonucleolíticas e de proteínas implicadas com recombinação, especialmente, o sinal consenso da proteína *translin* (GCCCWSSW).

A identificação de sinais consenso da proteína *translin* em 4/6 pontos de quebra sugeriu um envolvimento desta proteína com o evento de NHEJ. Estes achados implicaram em um mecanismo de NHEJ, análogo ao modelo bacteriano de transposição, na origem de translocações recíprocas associadas com alterações crípticas nos pontos de quebra que engloba as seguintes etapas: (i) DSBs na molécula de DNA que resultam em cortes desiguais (*staggered nicks*); (ii) reconhecimento e justaposição das pontas envolvendo a proteína *translin*; (iii) preenchimento dos *gaps* de seqüência não pareada com polimerases que resultam em duplicações e inserções nas junções dos pontos de quebra; e (iv) ligação das pontas por NHEJ (Gajecka *et al.* 2006c).

Gajecka *et al.* (2008) identificaram complexidades adicionais de poucos nucleotídeos como deleções, duplicações, inserções e triplicações, e micro-homologias nos pontos de quebra de 4 translocações recíprocas entre 1p e 22q em genitores de pacientes com monossomia 1p36. Apenas 2/8 pontos de quebra caíram em elementos repetitivos e 6/8 em seqüências de DNA de cópia única. Além disso, descreveram nos locais ou próximos dos pontos de quebra motivos de seqüência associados com estruturas não canônicas do DNA e vários motivos de seqüência de enzimas endonucleolíticas e de proteínas implicadas com recombinação, como o sinal consenso da proteína *translin*. Entretanto, demonstraram que a densidade destes motivos de seqüência não era maior nestas regiões que em locais aleatórios no genoma. Os autores postularam a ocorrência de DSBs nestas regiões por fatores aleatórios e não por características estruturais locais, e atribuíram parte das complexidades observadas nas junções dos pontos de quebra à introdução de variações pelo reparo por NHEJ na origem destas translocações recíprocas.

Foi sugerida, recentemente, a presença de LCRs palindrômicas, com orientação invertida, na região subtelmérica de 1p36 (Ballif e Shaffer 2006). Este cenário supôs um mecanismo de origem comum de deleções terminais 1p36 que envolve a NAHR na

formação de um cromossomo dicêntrico intermediário (Figura 6, abaixo). Deleções terminais simples e deleções terminais associadas com duplicações invertidas poderiam ter origem neste modelo, o que explicaria as diferenças no tamanho das deleções em 1p36 e os pontos de quebra dispersos.

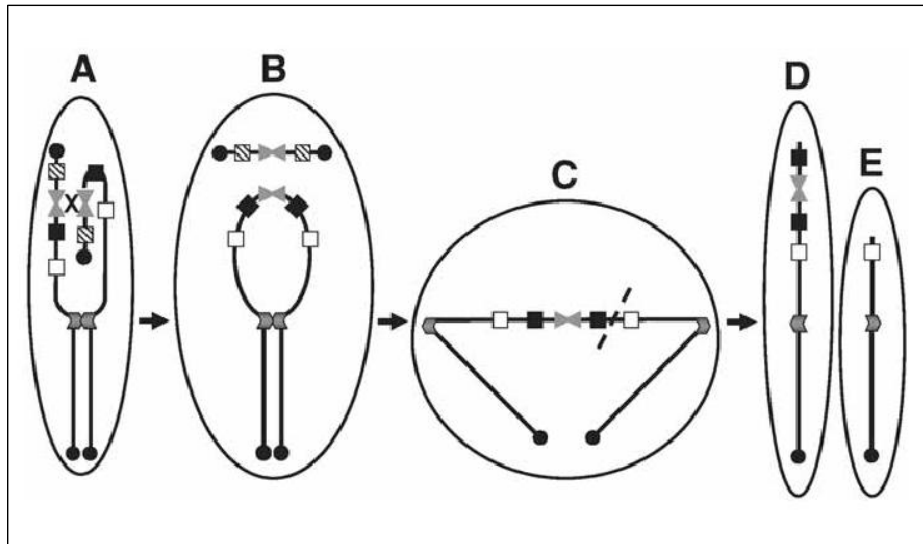


Figura 6: Modelo hipotético de NAHR entre LCRs palindrômicas na região subtelomérica de 1p36 (original Ballif e Shaffer 2007). As LCRs palindrômicas estão representadas por cabeças de seta invertidas. Os círculos cheios nas extremidades indicam os telômeros e as caixas sólidas, hachuradas e vazias indicam as seqüências cromossômicas de cópia única. (A) LCRs palindrômicas podem promover o pareamento desigual entre cromossomos homólogos; (B) um evento de NAHR entre estas LCRs resulta na formação de um cromossomo dicêntrico; (C) na anáfase, ocorre quebra em um sítio cromossômico aleatório, causada pela tensão originada pela ligação de dois centrômeros a pólos opostos; (D) origem de um cromossomo com deleção terminal e duplicação invertida de um segmento proximal; (E) e de um cromossomo com deleção terminal. Estes cromossomos necessitam ainda adquirir estabilidade pela aquisição de um novo telômero.

O esquema da Figura 7 (pg. 41) resume as diversas vias que podem ser adotadas na estabilização de cromossomos com deleções terminais, sugeridas a partir dos estudos da monossomia 1p36 como modelo dos mecanismos de formação de rearranjos subteloméricos em humanos e, que têm similaridades com as vias de reparo do DNA que ocorrem em leveduras contra a instabilidade genômica (Ballif e Shaffer 2006).

Cromossomo Normal Intacto

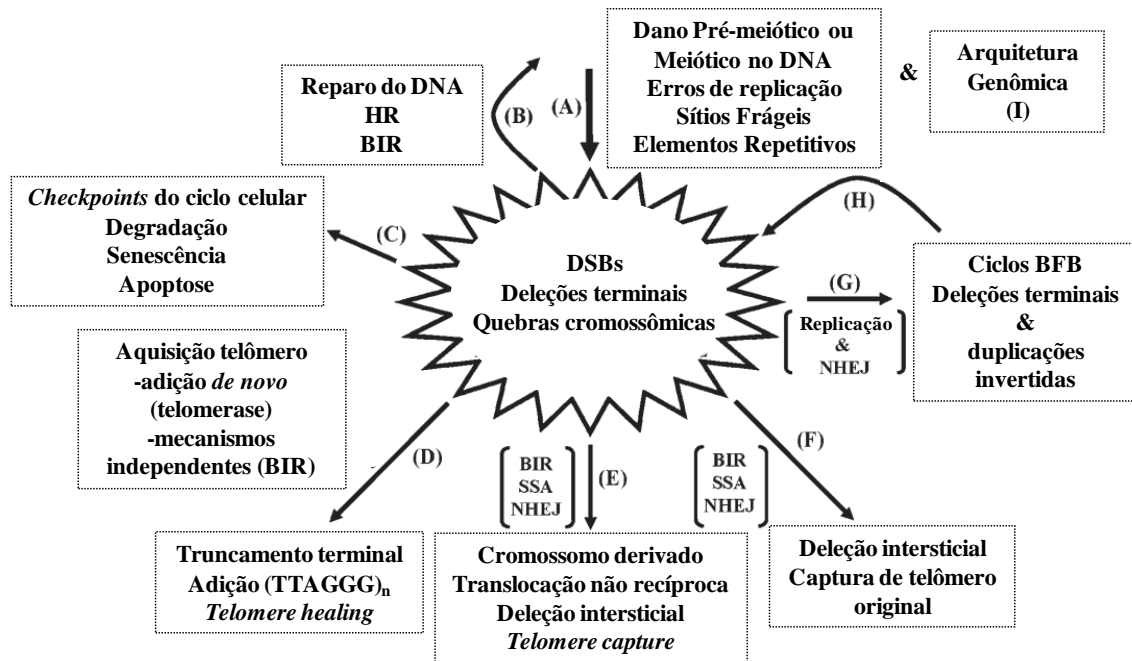


Figura 7: Mecanismos de estabilização de cromossomos com quebras distais (modificada de Ballif e Shaffer 2006). (A) Dano pré-meiótico ou meiótico na molécula do DNA gera uma DSB que converte um cromossomo normal intacto em um cromossomo com deleção terminal. Estas DSBs podem ocorrer em regiões genômicas mais susceptíveis pela presença de seqüências específicas (B) Os mecanismos de reparo do DNA podem restituir a integridade cromossômica de forma acurada, ou (C) os checkpoints do ciclo celular podem reconhecer o dano e marcar a célula para uma via apoptótica. Entretanto, uma variedade de vias de reparo do DNA está em competição na célula e podem estabilizar cromossomos com deleções terminais e originar rearranjos subtelo méricos implicados com doenças. (D) Deleções terminais simples podem ser formadas por aquisição das seqüências teloméricas dependente da enzima telomerase ou por mecanismos independentes como BIR, quando a captura é restrita às seqüências teloméricas. (E) Deleções terminais também podem ser estabilizadas pela formação de cromossomos derivados por BIR, quando ocorre captura das seqüências terminais e telômero de outras extremidades cromossômicas. Translocações não recíprocas também podem ser formadas por NHEJ ou SSA, no caso de uma célula com dois cromossomos com deleções terminais. Se a captura telomérica envolver cromossomos homólogos ou cromátides irmãs, o produto resultante são deleções intersticiais, indistinguíveis em estrutura daqueles que retiveram o telômero original intacto. (F) Se a captura for do telômero original, deleções verdadeiramente intersticiais são formadas. (G) Após a replicação do DNA, as cromátides irmãs podem ser ligadas por NHEJ, formando cromossomos dicêntricos que ao passar por um ciclo BFB origina deleções terminais e duplicações invertidas. Estes cromossomos ainda necessitam ser estabilizados. (I) Características genômicas estruturais, como LCRs palindrômicas podem servir de substrato para a NAHR, formando cromossomos dicêntricos que quebram em sítios aleatórios durante a anáfase antes da estabilização cromossômica.

1.3 Objetivos

Nossos principais objetivos foram:

1. Investigar rearranjos no segmento cromossômico 1p36;
2. Determinar a origem parental dos rearranjos e extensão física dos segmentos cromossômicos rearranjados;
3. Localizar os pontos de quebra no mapa físico da região distal de 1p36;
4. Estabelecer correlações genótipo-fenótipo para delinear regiões críticas e sugerir genes candidatos;
5. Verificar os mecanismos moleculares envolvidos na formação de rearranjos subteloméricos em 1p36;
6. Fornecer o Aconselhamento Genético às famílias.

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1 Pacientes

Para este estudo, selecionamos de maneira retro e prospectiva um total de 237 pacientes. Dividimos a nossa amostra em dois grupos, sendo que 83 pacientes foram investigados quanto à presença de rearranjos no segmento cromossômico distal de 1p36 no primeiro grupo, e 154 pacientes no segundo. O primeiro incluiu pacientes com estudos genéticos normais para AS (teste de metilação e/ou sequenciamento do gene *UBE3A*) (38 casos), pacientes com MCA/MR (14 casos), pacientes com suspeita clínica de síndrome de monossomia 1p36 (12 casos), e pacientes encaminhados para estudos cromossômicos com outras suspeitas clínicas (19 casos). O último e maior grupo compreendeu pacientes com estudos genéticos normais para PWS (teste de metilação do exon 1 do gene *SNURF-SNRPN*) com obesidade e/ou hiperfagia, atraso do DNPM ou dificuldade de aprendizado, hipotonia e distúrbios de comportamento. Foram excluídos da análise pacientes referidos para investigar PWS, mas que eram muito jovens para a manifestação de obesidade e hiperfagia.

Os pacientes avaliados em nosso ambulatório foram encaminhados à Unidade de Aconselhamento Genético do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por médicos de outras Instituições [Dra. Chong Ae Kim (Unidade de Genética do ICr-HC/FMUSP); Dr. Fernando Kok (Unidade de Neurologia do ICr-HC/FMUSP); Dra Ana Beatriz Alvarez Perez (Centro de Genética Médica da UNIFESP); Dr. Charles Marques Lourenço (Unidade de Genética Médica do HC/FMRPUSP)]. Para cada paciente avaliado em nosso ambulatório, foi preenchida uma ficha de anamnese genético-clínica contendo os dados clínicos e comportamentais, enquanto para os demais pacientes estas informações foram fornecidas pelos médicos responsáveis.

2.2 Aspectos Éticos

Todos os responsáveis de pacientes atendidos no Centro de Estudos de Genoma Humano assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo IV) para a coleta de material (amostra de sangue periférico dos pacientes e familiares) para a realização dos testes genéticos. O projeto de Pesquisa ao qual se insere este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade

de São Paulo, sob o Protocolo de número 021/2004. Outro Termo de Consentimento foi assinado para a coleta de material (amostra de sangue periférico) enviado para o exterior (Anexo V). A divulgação científica e publicação dos dados, incluindo fotos dos pacientes, foi realizada somente mediante autorização dos responsáveis.

2.3 Métodos

As etapas dos itens 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4 foram cumpridas em nosso laboratório, enquanto as demais etapas foram realizadas durante estágio de pesquisa de seis meses na Instituição “Washington State University”, Spokane, WA, USA, sob supervisão da Dra. Lisa Shaffer.

2.3.1 – *Análise citogenética*

Para identificar alterações cromossômicas numéricas e estruturais $> \sim 5$ Mb, o cariótipo dos pacientes foi estudado por coloração Giemsa e bandamento GTG. As preparações metafásicas foram obtidas a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico segundo método descrito por Moorhead *et al.* (1960) modificado, e empregado rotineiramente no laboratório.

2.3.2 – *MLPA (“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”)*

Utilizamos uma estratégia de MLPA para investigar a presença de rearranjos cromossômicos submicroscópicos em 1p36. A técnica de MLPA foi desenvolvida recentemente (Schouten *et al.* 2002) e permite uma análise rápida e simples de baixo custo (~ 10 €/reação) de alterações do número de cópias de até 45 seqüências específicas de DNA em regiões genômicas de interesse. Na MLPA, o DNA genômico é hibridado a um conjunto de sondas em solução. Cada sonda é constituída de um par, um oligonucleotídeo sintético curto e outro longo, derivado de fago M13. O primeiro contém uma seqüência genômica (21-30 nt) complementar à de interesse na extremidade 3' e, na outra extremidade, uma seqüência complementar à de um *primer* universal, enquanto o derivado de fago M13 contém a seqüência genômica (25-43 nt) complementar à de interesse na extremidade 5', um fragmento intermediário com tamanho variável (19-370 nt), e a seqüência complementar do par de *primer* universal na extremidade oposta. As duas partes das sondas reconhecem seqüências alvo em sítios adjacentes no DNA genômico e podem ser ligadas com uma ligase, e depois amplificadas em uma reação de PCR *multiplex* com um único par de *primers*

fluorescente. Como cada sonda contém um fragmento com tamanho único que não hibrida no DNA genômico, mas que é amplificado junto, cada uma origina um produto de amplificação com tamanho previamente conhecido e único (130-480 nt). Portanto, a separação destes fragmentos por eletroforese de capilaridade permite identificar os produtos específicos de um conjunto de sondas. Dado que somente os oligonucleotídeos hibridados e ligados podem ser amplificados e desde que o tempo de reação de hibridação seja suficiente para que todas as sondas estejam hibridadas às seqüências-alvo correspondentes, a MLPA permite a análise semi-quantitativa de diversos *lóci* em uma única reação por diferenças nas áreas relativas dos picos fluorescentes de cada produto de PCR em relação a uma amostra controle.

O DNA genômico dos pacientes foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico pelo sistema Autopure LS[®] (Gentra Systems). Para esta pesquisa utilizamos 3 kits de MLPA: “SALSA MLPA KIT P147 1p36 DELETIONS”, “SALSA P036 HUMAN TELOMERE MLPA KIT” e “SALSA MLPA KIT P064 MR1” (Anexo I, Tabelas II, III e IV). O kit específico da monossomia 1p36 (kit P147), contém 36 sondas mapeadas ao longo de todo o segmento cromossômico 1p36, enquanto o kit P064 (última versão) contém 7 sondas mapeadas no segmento distal de 4 Mb de 1p36, além de outras sondas em regiões cromossômicas envolvidas com as síndromes de Sotos, Saethre-Chotzen, Williams, Miller-Dieker, PWS/AS, Canavan disease, Smith-Magenis, Alagille e DiGeorge. O kit subtelomérico P036, contém uma única sonda mapeada em cada uma das regiões cromossômicas subteloméricas.

Rearranjos em 1p36 foram identificados diretamente com o kit específico da síndrome ou com o kit P064 ou P036. Para caracterizar os rearranjos, determinar a extensão física dos segmentos rearranjados e detectar translocações não equilibradas, todos os rearranjos foram analisados com os kits P147 e P036. As reações de MLPA foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research) como descrito por Schouten *et al.* (2002): (i) 250 ng de DNA genômico foi desnaturado e fragmentado por 5 minutos a 98°C; as sondas de MLPA foram adicionadas e hibridadas à 60°C por 16 horas; as reações de ligação ocorreram a 54°C por 15 minutos com uma ligase; os *primers*, dNTPs e a polimerase foram adicionados à solução para a reação de PCR. Os produtos foram separados no MegaBACE[™] 1000 (GE Healthcare) e analisados com o software MegaBACE Fragment Profiler (Figura 8, Anexo II). Utilizamos também as planilhas da NGRL (National Genetics Reference Laboratory, Manchester,

www.ngrl.org.uk/Manchester), desenvolvidas especificamente para a análise dos dados da MLPA (Figura 9, Anexo II).

2.3.3 – FISH (“*Fluorescent in situ Hybridization*”)

Para confirmar deleções, realizamos estudos de FISH com sonda específica da região subtelomérica de 1p em preparações cromossômicas metafásicas de linfócitos cultivados do sangue periférico. Estes estudos incluíram as sondas comerciais TEL 1p DNA probe, Green (Oncor[®]) ou TelVysion[™] 1p SpectrumGreen (Vysis[®]), que contém o *locus* CEB108/T7, ambas mapeadas ~300 kb do telômero de 1p. A sonda subtelomérica GS-232-B23, cultivada de cromossomo artificial de bactéria e marcada com digoxigenina, também foi usada de acordo com o protocolo descrito por Shaffer *et al.* (1994). Para confirmar translocações não equilibradas reveladas na MLPA, utilizamos o sistema “Chromoprobe Multiprobe[®]-T” (Cytocell), que contém sondas de 41 regiões subteloméricas de todos os braços cromossômicos (exceto os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos). Para determinar se os rearranjos foram herdados ou mutações *de novo* estendemos estes estudos aos genitores.

2.3.4 – Análise com marcadores de microssatélites

Para estabelecer a origem parental dos rearranjos realizamos a análise com cinco marcadores de microssatélites mapeados em 1p36 (Tabela V, Anexo I) em amostras de DNA genômico dos pacientes e seus genitores. Os oligonucleotídeos fluorescentes marcados com FAM foram sintetizados pela Invitrogen[™] (www.invitrogen.com.br). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 µl, utilizando-se as seguintes condições: ~100 ng de DNA genômico, 10 µmol de cada *primer*, 10X buffer, 2.5 mM de cada dNTP e 0.6 U de Taq Polimerase (Invitrogen). As condições da PCR foram desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, *annealing* por 45 segundos, extensão a 72°C por 70 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Estas reações foram realizadas no termociclador Mastercycler[®] personal (Eppendorf) e os fragmentos separados no MegaBACE[™] 1000 (GE Healthcare) e analisados com o software MegaBACE Genetic Profiler.

2.3.5 – Transformação Linfoblásticoide

Entre 5-10 ml de sangue periférico de seis pacientes com monossomia 1p36 foram utilizados para o estabelecimento de linhagens celulares linfoblásticas a partir

da transformação com vírus Epstein-Barr (EBV). Esta etapa foi realizada pelo grupo de pesquisa da Washington State University, Spokane, WA, USA. Basicamente, os linfócitos isolados com Ficoll-Paque foram cultivados em meio RPMI com 20% de soro fetal bovino e 0.5 ml de EBV em linhagem B95-8 e do imunossupressor ciclosporina A. As células foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ e checadas, após a formação dos primeiros aglomerados celulares, a cada 2-3 dias para substituição do meio de cultura até a obtenção do volume de cultura desejado. Depois de estabelecidas as linhagens, as células foram utilizadas para a obtenção de preparações cromossômicas por protocolos padrões e extração de DNA genômico utilizando o “PureGene DNA purification kit” (Gentra). As linhagens celulares estão sendo mantidas no freezer Cryostar® à -140°C em meio crioprotetor com dimetil sulfoxido (DMSO) na concentração de 10%.

2.3.6 – Array CGH (“Array Comparative Genomic Hybridization”)

Para caracterizar os rearranjos, estabelecer o tamanho das deleções e investigar rearranjos adicionais com um nível de resolução maior, as amostras de DNA genômico obtidas de linhagens celulares linfoblastóides previamente estabelecidas de cada paciente foram estudadas por hibridação genômica comparativa em microarranjos de DNA (*array* CGH). Estes experimentos foram conduzidos no “Signature Genomic Laboratories, LLC” (www.signaturegenomics.com, Spokane, WA, USA) com a versão 4 do SignatureChip® (Anexo III), que consta de um “target BAC microarray” com cobertura subtelomérica expandida (Ballif *et al.* 2007).

Amostras de DNA genômico teste e referência de sexos opostos foram sonicadas (Sonicator 3000, Misonix) em fragmentos com 400-1000 pb e marcadas diferencialmente em dois experimentos reversos por “Random Priming” (BioPrime® Plus Array CGH Labeling System, Invitrogen) com os fluorocromos Alexa Flúor® 555 (rosa) ou Alexa Flúor® 647 (azul), respectivamente. As sondas marcadas foram purificadas (BioPrime® Purification Module with PureLink™, Invitrogen) e co-hibridadas a uma plataforma de *microarray* pré-hibridada com DNA de esperma de salmão (Invitrogen). As reações de hibridação utilizaram ~500 ng de DNA teste e referência, precipitados com 50 µg de Cot1-DNA humana (Invitrogen) e ressuspensos em 15.5 µl de tampão de hibridação (ULTRAhyb®, Ambion). As amostras de DNA foram desnaturadas a 72°C por 5 minutos, incubadas a 37°C por 1 hora e adicionadas a lâmina do *microarray*, que foi coberta com uma lamínula 22x22 mm. A hibridação

ocorreu na incubadora a 37°C por 14-16 horas dentro de uma câmara de hibridação (Corning® Hybridization Chamber, Corning).

Os *microarrays* foram lavados com o “Little Dipper®” (SciGene) em solução 50% formamida a 43°C, 1X PBS, 0.2XSSC e em água estéril. As lâminas foram escaneadas com o GenePix® 4000B (Axon Instruments) e as imagens adquiridas com o auxílio dos softwares GenePix® Pro 6.0 e Acuity® 4.0 (Axon Instruments). As imagens de aCGH do SignatureChip®v4 foram plotadas em gráficos criadas com o software Genoglyphix™ (Signature Genomic Laboratories, LLC). As análises estatísticas aplicadas ao SignatureChip® foram previamente descritas (Bejjani *et al.* 2005; Ballif *et al.* 2007).

2.3.7 – Refinamento dos pontos de quebra por FISH

Preparações cromossômicas metafásicas obtidas a partir de linhagens celulares linfoblásticas previamente estabelecidas de cada paciente foram estudadas por FISH para refinar os pontos de quebra das deleções 1p36 em um ou dois clones sobrepostos. Diversos clones do contíguo distal de 1p36 (Figura 10, Anexo II) foram escolhidos e utilizados como sondas (Tabela VI, Anexo I). Para confirmar segmentos duplicados/triplicados, estudos adicionais de FISH interfásico foram empregados em preparações cromossômicas do paciente 1p139-C. Clones de outras regiões genômicas também foram utilizados para confirmar alterações cromossômicas adicionais reveladas no *array* CGH (Tabela VII, Anexo I). Embora não representado no SignatureChip®, o status dos clones GS-160-H23 (Knight *et al.* 2000) e WI2-2118C23 (www.ncbi.nlm.org) foi determinado em metáfases do paciente 1p142.

O DNA utilizado como sonda foi extraído de clones do tipo BAC utilizando o protocolo padrão de lise alcalina. Entre 0.4-0.8 µg de DNA foi diretamente marcado por “Nick-Translation” com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP (Roche). As sondas foram precipitadas na presença de cot1-DNA humana e DNA de esperma de salmão (Invitrogen) e ressuspendidas com solução de hibridação 50% formamida. Depois de desnaturadas a 70°C por 10 minutos, as sondas foram adicionadas às lâminas contendo as preparações cromossômicas desnaturadas em 70% formamida/2XSSC a 37°C por 2-3 minutos. As reações de hibridação ocorreram dentro de uma câmara

umedecida deixada *overnight* na estufa a 37°C. As lâminas foram lavadas em 50% formamida/2XSSC à 43°C e em 2XSSC à 37°C.

Os sinais foram amplificados com FITC-avidina (Vector) e anti-avidina (Sigma) para detectar a biotina, e com anticorpo monoclonal anti-digoxigenina (Sigma), anti-mouse IgG-digoxigenina (Roche) e fragmentos FAB anti-digoxigenina-rodamina (Roche) para detectar a digoxigenina. Os cromossomos foram corados com DAPI e visualizados com microscópio fluorescente Axiophot Zeiss equipado com filtros simples e triplo. As imagens digitais foram capturadas no computador Power Macintosh sistema G3 utilizando o sistema MacProbe versão 4.3 (Applied Imaging System).

Os experimentos de FISH metafásico foram realizados com duas cores. Sonda teste e controle (localizada fora da região crítica e utilizada como um marcador cromossômico e controle positivo da reação) foram co-hibridadas e marcadas em vermelho e verde, respectivamente. Utilizamos um clone mapeado em 1q pericentromérico como sonda controle do cromossomo 1 e os BACs RP11-1081C15 (AQ739825) e RP11-64P11 em 4p16.3 e 9q21.12 como sondas controle dos cromossomos 4 e 9, respectivamente. Para cada experimento de FISH metafásico, 5-10 células foram avaliadas quanto à presença ou ausência do sinal de hibridação para ambas as sondas. Para cada teste de FISH interfásico cerca de 100 células foram analisadas.

2.3.8 – Desenvolvimento de linhagens somáticas híbridas

Linhagens somáticas híbridas obtidas da fusão entre as células linfoblastóides transformadas e células de hamster RJK88 deficientes em HPRT foram construídas como previamente descrito (Page e Shaffer, 1997) para identificar os pontos de quebra das deleções em 1p36. As melhores colônias foram isoladas, processadas e investigadas por FISH metafásico com clones do contíguo de 1p36 distal das regiões deletada e intacta de cada paciente, escolhidos conforme os resultados de MLPA. As colônias positivas foram confirmadas por PCR utilizando marcadores de STS de cada região. O DNA dos híbridos foi extraído utilizando o “PureGene DNA purification kit” (Gentra). Esta etapa foi realizada pelo grupo de pesquisa da Washington State University, Spokane, WA, USA.

2.3.9 – Refinamento dos pontos de quebra por “STS marker walking”

Marcadores de STS dos clones contendo os pontos de quebra das deleções 1p36 foram desenhados e amplificados por PCR para refinar estas regiões em ~200 pb. As seqüências dos clones foram obtidas no browser genômico UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) e oligonucleotídeos com ~200-400 pb foram desenhados da seqüência única com o programa *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e sintetizados pela Invitrogen (Tabela VIII, Anexo I).

As reações de PCR foram realizadas com ~100 ng de DNA, 10 µmol de cada *primer*, 10X buffer (TaKaRa), 2.5 mM de cada dNTP (TaKaRa) e 0.6 U de TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) em um volume final de 10 µl. As condições da PCR foram desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 45°C por 45 segundos, *annealing* a 58-59°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 70 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.8% e as imagens capturadas com o auxílio do software “Chemilmager™ System 5500” (Alpha Innotech).

Os pontos de quebra das deleções 1p36 foram refinados progressivamente utilizando marcadores espaçados ~20 kb, ~5 kb e ~1 kb ao longo do comprimento do clone. Quando possível, utilizamos as informações disponíveis para sondas de MLPA inseridas nos clones contendo os pontos de quebra para desenhar os marcadores de STS iniciais. As regiões com ~1 kb onde os pontos de quebra foram refinados foram investigadas por PCR utilizando marcadores que exibem sobreposição, que possibilitou identificar junções com ~200-300 pb contendo os pontos de quebra das deleções 1p36.

2.3.10 – Protocolo de TOPO Walker

O kit TOPO® Walker (Invitrogen, Versão E) foi utilizado para amplificar e sequenciar as junções dos pontos de quebra das deleções 1p36 de cada paciente. Originalmente desenvolvido para facilitar o preenchimento de *gaps* gerados durante o sequenciamento *shotgun* de DNA clonado em BACs, o TOPO® Walker permite a amplificar e sequenciar fragmentos de DNA com origem desconhecida a partir do DNA adjacente. Basicamente, o kit utiliza um oligonucleotídeo de DNA dupla-fita (TOPO® Linker) com dois sítios de ligação para *primers* específicos e que apresenta uma extremidade 3' T-overhang covalentemente ligada a uma topoisomerase I. A atividade

de ligação da enzima permite que o TOPO[®] Linker se ligue especificamente à extremidade de DNA cuja seqüência desejamos saber e, como o DNA adjacente tem seqüência conhecida, fragmentos de DNA podem ser amplificados por PCR.

Estes experimentos foram realizados segundo o protocolo padrão do kit TOPO[®] Walker com as seguintes modificações: as reações de *nested* PCR foram realizadas utilizando 0.5 µl do produto da PCR inicial diluído 1/1000, 50 ng do LinkAmp *Primer* 2, 50 pmol dos *primers* GSP3, 10X buffer (TaKaRa), 2.5 mM de cada dNTP (TaKaRa) e 1 U de TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) em um volume final de 20 µl. As reações foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 4 minutos, seguidos por 27 ciclos de desnaturação a 94°C e *annealing* a 61°C por 35 segundos cada e extensão a 72°C por 1 minuto, e finalizada com extensão final a 72°C por 4 minutos.

Os mapas de restrição foram desenhados com o auxílio do software “Sequencher[™]” v4.1.4 (Gene Codes) utilizando ~2 kb de seqüência ao redor das junções dos pontos de quebra de cada paciente (Figura 11, Anexo II). Enzimas com sítios específicos localizados próximos das junções dos pontos de quebra na porção 1p36 intacta e, ausentes ou distantes das junções na porção deletada foram selecionadas (Tabela IX, Anexo I). Os *primers* GSPs utilizados nas reações de *primer extension*, PCR e *nested* PCR foram desenhados com o programa *Primer* 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e sintetizados pela Invitrogen[™] (Tabela X, Anexo I). Abaixo, a seqüência dos *primers* LinkAmp *Primer* 1 e LinkAmp *Primer* 2 (TOPO[®] Walker kit, Invitrogen).

LinkAmp <i>Primer</i> 1	5'-AGGCACAGTCGAGGACTTATCCTA-3'
LinkAmp <i>Primer</i> 2	5'-GCCTCTGAATACTTTCAACAAGTTAC-3'

Basicamente, (i) ~500 ng de DNA genômico foi digerido com enzimas de restrição que deixam uma extremidade 3' overhang; (ii) os fragmentos gerados foram desfosforilados com “Calf Alkaline Phosphatase” (CIP) em 37°C por 1 hora; (iii) os fragmentos foram estendidos com TaKaRa Ex Taq (TaKaRa), utilizando *primers* da seqüência intacta de 1p36 (“gene specific primers” GSP1), mapeados na região proximal das junções dos pontos de quebra. As condições da reação de *primer extension* foram desnaturação a 94°C por 4 minutos, *annealing* a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 20 minutos. Os fragmentos estendidos contendo uma extremidade 3' A-

overhang foram ligados com o TOPO[®] Linker em 37°C por 6 minutos. As reações de PCR inicial utilizaram TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) e o LinkAmp *Primer 1* para amplificar fragmentos de DNA com *primers* da seqüência proximal intacta de 1p36 (GSP2), mapeados entre as junções dos pontos de quebra e os *primers* GSP1. As condições de PCR foram desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C e *annealing* a 60°C por 30 segundos cada e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos de PCR gerados foram diluídos e utilizados na reação de *nested* PCR conforme as condições já descritas acima utilizando o LinkAmp *Primer 2* e *primers* GSP3. Estas reações estão delineadas na Tabela XI (Anexo I).

2.3.11 – Seqüenciamento do DNA dos pontos de quebra

Os produtos obtidos do TOPO[®] Walker foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.8% e visualizados com o auxílio do software “Chemilmager[™] System 5500” (Alpha Innotech). Os fragmentos de interesse foram selecionados pelo padrão e tamanhos esperados conforme a estratégia de TOPO[®] Walker desenhada: (i) como as enzimas de restrição utilizadas não apresentam sítios específicos próximos da junção do ponto de quebra no lado deletado, não são esperados produtos de PCR < ~1 kb para o cromossomo 1 normal. Portanto, excluindo a possibilidade de SNPs no lado deletado da junção para o cromossomo 1 normal, a observação de fragmentos contendo entre ~800-200 pb indica que a junção do ponto de quebra da deleção foi clonada e pode ser sequenciada; (ii) como as reações de *nested* PCR foram realizadas com um único *primer* reverso (LinkAmp *Primer 2*) e *primers* GSP3 mapeadas à distâncias gradativamente menores de cada junção do ponto de quebra, espera-se que os fragmentos amplificados por TOPO[®] apresentem tamanhos decrescente. Depois, os fragmentos foram recortados do gel com uma lâmina estéril para tubos de 1,5 ml. O DNA foi extraído do gel com o kit “QIAEX II” (QIAGEN) e purificado em filtros com colunas para purificação (Montage[®] PCR Centrifugal Filter Devices).

As reações de seqüenciamento foram realizadas com os reagentes do “BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” (Applied Biosystems) sob desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, *annealing* a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Os produtos foram separados por eletroforese no “ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer” (Applied

Biosystems). Os dados gerados foram analisados no software “Sequencher™” v4.1.4 (Gene Codes). As seqüências foram alinhadas e localizadas na versão hg18 do genoma humano por BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>) ou em seqüências genômicas alternativas por BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para confirmar as junções dos pontos de quebra, as seqüências identificadas após os pontos de quebra e localizadas no genoma referência (versão hg18) foram analisadas para o desenho de *primers* a serem utilizados com os *primers* GSPs de 1p36 utilizados nas reações de TOPO® Walker. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e sintetizados pela Invitrogen (Tabelas XII e XIII). Foram utilizadas as mesmas condições de PCR empregadas no “STS marker walking” e de sequenciamento descritas acima.

2.3.12 – Análises de bioinformática

As seqüências contidas dentro de um intervalo de ~2 kb englobando cada ponto de quebra foram analisadas quanto à presença de elementos de DNA repetitivo com o programa RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>). Os programas EMBOSS “palindrome” e “fuzznuc” foram usados para identificar repetições invertidas e detectar motivos de seqüência possivelmente associados com os rearranjos (<http://embooss.sourceforge.net/index.html>). Investigamos ambas as fitas utilizando a função “complementary” do “fuzznuc”. Para motivos de seqüência consenso da topoisomerase e o motivo longo da proteína translin aceitamos um “mismatch”; para motivos da DNA polimerase e *hotspots* de deleção, rejeitamos a possibilidade de “mismatches”. Para prever estruturas do tipo Z-DNA, usamos o programa ZHUNT (<http://www.zhunt.als.orst.edu/holab/index.html>). Repetições diretas foram identificadas com o programa “Tandem Repeats Finder” (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) utilizando os parâmetros padrões. Trechos de oligopurina (R) e oligopirimidina (Y) foram identificados manualmente substituindo nucleotídeos A/G e C/T pelas letras R ou Y. Para investigar estruturas secundárias do tipo *hairpin* na molécula do DNA, realizamos análises com o “Unafold” (<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/quikfold.php>) utilizando a seqüência genômica referência (hg18) ou a alternativa (HuRef) da região com 145 pb englobando cada ponto de quebra.

Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements.

Carla S. D'Angelo^{1,*}; Marzena Gajicka^{2,3}; Chong A. Kim⁴; Andrew J. Gentles⁵; Caron D. Glotzbach⁶; Lisa G. Shaffer⁶; Célia P. Koiffmann¹.

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, SP-05508-900 São Paulo, Brazil;

²School of Molecular Biosciences, WWAMI Medical Educational Program, Washington State University, Spokane, Washington 99202, USA;

³Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan 61-713, Poland;

⁴Genetics Unit, Department of Pediatrics, Children Institute, University of São Paulo, SP-05403-000 São Paulo, Brazil;

⁵School of Medicine, Stanford University, Stanford, California 94305, USA;

⁶Signature Genomic Laboratories, Spokane, Washington 99202, USA

email: Carla S. D'Angelo (cdangelo@ib.usp.br)

*Correspondence to Carla Sustek D'Angelo, Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, sala 204/209 CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Key words: Subtelomeric rearrangements, Constitutional rearrangements of 1p36, Breakpoint sequencing analysis, Mechanisms of DNA repair, BFB cycles, NHEJ.

Original Investigation

Published in Human Genetics

Accepted: 25 February 2009

(DOI 10.1007/s00439-009-0650-9)

Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements

Carla S. D'Angelo · Marzena Gajecka · Chong A. Kim ·
Andrew J. Gentles · Caron D. Glotzbach ·
Lisa G. Shaffer · Célia P. Koiffmann

Received: 8 January 2009 / Accepted: 25 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The mechanisms involved in the formation of subtelomeric rearrangements are now beginning to be elucidated. Breakpoint sequencing analysis of 1p36 rearrangements has made important contributions to this line of inquiry. Despite the unique architecture of segmental duplications inherent to human subtelomeres, no common mechanism has been identified thus far and different non-

exclusive recombination–repair mechanisms seem to predominate. In order to gain further insights into the mechanisms of chromosome breakage, repair, and stabilization mediating subtelomeric rearrangements in humans, we investigated the constitutional rearrangements of 1p36. Cloning of the breakpoint junctions in a complex rearrangement and three non-reciprocal translocations revealed similarities at the junctions, such as microhomology of up to three nucleotides, along with no significant sequence identity in close proximity to the breakpoint regions. All the breakpoints appeared to be unique and their occurrence was limited to non-repetitive, unique DNA sequences. Several recombination- or cleavage-associated motifs that may promote non-homologous recombination were observed in close proximity to the junctions. We conclude that NHEJ is likely the mechanism of DNA repair that generates these rearrangements. Additionally, two apparently pure terminal deletions were also investigated, and the refinement of the breakpoint regions identified two distinct genomic intervals ~25-kb apart, each containing a series of 1p36 specific segmental duplications with 90–98% identity. Segmental duplications can serve as substrates for ectopic homologous recombination or stimulate genomic rearrangements.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00439-009-0650-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. S. D'Angelo (✉) · C. P. Koiffmann
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva,
Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277,
sala 204/209, São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil
e-mail: cdangelo@ib.usp.br

M. Gajecka
WWAMI Medical Educational Program,
School of Molecular Biosciences,
Washington State University, Spokane, WA 99202, USA

M. Gajecka
Institute of Human Genetics,
Polish Academy of Sciences, 61-713 Poznan, Poland

C. A. Kim
Genetics Unit, Department of Pediatrics,
Children Institute, University of São Paulo,
São Paulo, SP 05403-000, Brazil

A. J. Gentles
School of Medicine, Stanford University,
Stanford, CA 94305, USA

C. D. Glotzbach · L. G. Shaffer
Signature Genomic Laboratories, Spokane, WA 99202, USA

Introduction

Over the past decade, an increasing number of subtelomeric abnormalities have been reported to cause mental retardation and birth defects (Ledbetter and Martin 2007). Combined data from two of the largest studies of telomere integrity assessments in a diagnostic laboratory established a 2.5% yield of clinically significant cryptic subtelomeric abnormalities (Ballif et al. 2007; Ravnan et al. 2006).

Telomere imbalance of 1p was the most frequently observed rearrangement, accounting for approximately 10–20% of all imbalances detected. In spite of the evolving knowledge of telomeric chromosome abnormalities, few conclusions about the possible mechanisms responsible for subtelomeric rearrangements have been made thus far. This is because the breakpoints of subtelomeric rearrangements have been rarely examined at the DNA sequence level, with the exception of a dozen cases of 1p36 terminal deletions (Ballif et al. 2003; Gajecka et al. 2006a, b, 2008) and a few other studies (Bonaglia et al. 2006; Flint et al. 1994; Lamb et al. 1993; Rooms et al. 2006; Varley et al. 2000; Wilkie et al. 1990).

Occurring in approximately 1 in 5,000 to 1 in 10,000 live births (Heilstedt et al. 2003b; Shapira et al. 1997), monosomy 1p36 is the most common terminal deletion syndrome in humans, which is characterized by neurodevelopmental disability and a recognizable pattern of malformation (Battaglia et al. 2008; Gajecka et al. 2007). A diversity in mechanisms has been anticipated to be involved in the generation and/or stabilization of 1p rearrangements, based on molecular characterization of chromosomes with 1p36 deletion, which revealed, as for other terminal deletions, non-recurrent breakpoint locations over several megabases and different classes of rearrangements (Heilstedt et al. 2003a). To date, 18 rearrangements of 1p36 have been characterized at the DNA sequence level (Ballif et al. 2003, 2004a, b; Gajecka et al. 2006a, b, 2008; Rooms et al. 2006), but breakpoint junction fragments have been precisely analyzed in only four apparently pure terminal deletions (Ballif et al. 2003; Rooms et al. 2006) and seven reciprocal translocations with other chromosomes (Gajecka et al. 2006a, b, 2008).

Terminal deletions are the most common class of subtelomeric abnormalities (Ballif et al. 2007). The observation of pure telomeric repeats immediately after the break of a terminally deleted chromosome constitutes a direct evidence of stabilization by telomere healing (Ballif et al. 2003). Pure terminal truncations have been reported to the subtelomeres of 7q, 16p and 22q13 (Bonaglia et al. 2006; Flint et al. 1994; Lamb et al. 1993; Varley et al. 2000; Wilkie et al. 1990). Telomere healing has been confirmed in only one terminal deletion of 1p36 (Ballif et al. 2003). Unexpected complexity was observed after the break of a further terminal deletion of 1p (Rooms et al. 2006) and no evidence of telomere healing was reported in another four (Ballif et al. 2004b). Complex rearrangements are detected in 3.5% of subtelomeric abnormalities (Ballif et al. 2007) and in 12% of 1p36 rearrangements (Gajecka et al. 2007). In these cases, non-homologous end joining (NHEJ) and breakage-fusion-bridge (BFB) cycles have been identified as the most likely mechanism given the

presence of cryptic, interrupted, inverted duplications at the end of terminally deleted chromosomes 1 and lack of significant stretches of homology (Ballif et al. 2003; Gajecka et al. 2005).

The second most commonly occurring class of subtelomeric rearrangements are unbalanced translocations, i.e., derivative chromosomes (Ballif et al. 2007). The acquisition of a telomere from another chromosome end (telomere capture) can occur through a variety of mechanisms (Ledbetter and Martin 2007). At least two anticipated mechanisms are directly linked to genomic architectural features in the subtelomeric regions: non-allelic homologous recombination (NAHR) and subtelomeric pairing with proximal recombination (SPPR) (Ballif et al. 2004a). Telomere capture by homologous recombination between two closely related subtelomeric *Alu* elements was described for chromosome 16p (Flint et al. 1996). No evidence for either homology-based mechanisms was found for unbalanced translocations of 1p, and break-induced replication (BIR) has been suggested as the most probable mechanism for acquisition of a new telomere (Ballif et al. 2004a; Gajecka et al. 2007; Rooms et al. 2006). In a single case of a non-reciprocal translocation between chromosomes 11q and 20q, analysis at the breakpoint junction revealed a few nucleotides insertion of unknown origin between the breakpoint regions of the partner chromosomes (Rooms et al. 2006). Yet, cryptic imbalances were reported at the translocation junctions of several reciprocal translocations in carrier parents of patients with monosomy 1p36 (Gajecka et al. 2006a, b, 2008). In these cases, no substantial stretches of homology was found near the breakpoints, but instead a number of sequence motifs, especially the translin recognition site, which was implicated in multiple mechanisms of NHEJ repair in balanced translocations formation (Gajecka et al. 2006b, 2008).

In this report, we have used cell lines containing constitutional rearrangements of 1p36 in six cases to gain further insights into the mechanisms of chromosome breakage, repair and stabilization, mediating subtelomeric rearrangements in humans at 1p36. In a complex rearrangement of 1p36 and three de novo non-reciprocal translocations, cloning and sequencing of the breakpoint junctions allowed us to precisely determine the sequence that follows immediately after the breaks and conclude that NHEJ is likely the mechanism of DNA repair that generated all the rearrangements. In two apparently pure terminal deletions, the breakpoint regions were refined to a genomic interval containing a series of 1p36 specific segmental duplications. Further studies are needed to suggest an exclusive homology-based recombination mechanism of origin for these deletions.

Materials and methods

Subjects

Six subjects detected with de novo rearrangements of the most distal portion of 1p36 were chosen for further analyses. These include one subject already described with a derivative chromosome 1 [der(1)t(1;1)(p36;q44)] generated by a maternal intra-chromosomal rearrangement (subject 5) (19). Previous characterization by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) on five original cases (D. Angelo, unpublished data) revealed three subjects to have apparently pure terminal deletions (subjects 140, 141, and 143) and one subject harboring a complex rearrangement with deletion, duplication and triplication of 1p36 segments (subject 139), and also identified a derivative chromosome 1 [der(1)t(1;1)(p36;q44)] in another subject (subject 142). Informative microsatellite marker analyses indicated that three were maternally derived rearrangements (subjects 140, 141 and 142).

Array CGH analysis

To determine the sizes of the 1p36 deletions and to characterize the rearrangements further, microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH) was performed on these five original cases as previously described (Bejjani et al. 2005) using genomic DNA isolated from lymphoblastoid cell lines established from each subject. Microarray analyses were conducted at Signature Genomic Laboratories, LLC (Spokane, WA, USA) using a targeted BAC microarray with expanded subtelomeric coverage (SignatureChip[®] Microarray Ver. 4.0; <http://www.signaturegenomics.com>) (Ballif et al. 2007).

FISH analyses

To confirm the results of the array CGH analysis and to localize the 1p36 deletion breakpoints, FISH was performed as already described (Shaffer et al. 1994) on metaphase chromosome preparations of lymphoblastoid cells from each subject. Various large-insert clones from a minimal tiling path contig of the most distal 10.5 Mb of 1p36 (Heilstedt et al. 2003a) were selected as FISH probes to narrow the breakpoint regions to within a large-insert clone or between two overlapping clones. Bacterial artificial chromosome (BAC) probes employed to confirm the partial trisomies were selected using the UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu/>) and NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genome browsers on the basis of the array CGH results. Additional FISH analyses were performed on inter-

phase chromosomes to confirm the array CGH results for copy number gain of 1p36 sequences and characterize the duplications and triplications. All the BAC clones used in the FISH analyses are listed in supplementary Table S1.

Generation of somatic cell hybrids

To simplify the experiments to refine the 1p36 breakpoints, somatic cell hybrids were generated from transformed lymphoblast cells of each subject, fused to HPRT-deficient RJK88 hamster cells as previously described (Page and Shaffer 1997). Somatic cell hybrids containing either the rearranged chromosome 1 or the normal chromosome 1 segregated were identified for each subject after screening with microsatellite markers and FISH, as depicted elsewhere (Heilstedt et al. 2003a).

STS marker walking

Polymerase chain reaction (PCR) and STS marker walking analyses were used to progressively narrow each 1p36 deletion breakpoint. DNA sequence from the breakpoint containing clones of each subject was retrieved from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Repetitive elements were masked from the sequence using RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>), and 200–400 bp STS markers spanning the length of the clones were designed from the unmasked unique sequence using Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). All primers were ordered from Invitrogen[™] (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>). Marker walking by PCR was performed using hybrid DNA containing the rearranged chromosome 1 by initially amplifying markers spaced ~20 kb apart. As breakpoints were narrowed, markers were then selected ~5 kb apart, and finally ~1 kb distant. To prepare for subsequent TOPO Walker protocol, the breakpoint for each subject was narrowed further to ~200–300 bp. PCR reactions and conditions were the same as described previously (Gajecka et al. 2006a).

TOPO Walker protocol

The TOPO Walker Kit (Invitrogen, Version E, for isolating and sequencing unknown BAC DNA) was employed to amplify and sequence junction fragments in each subject. To accomplish this, we followed the standard TOPO Walker protocol with previously established modifications (Gajecka et al. 2006a). We used restriction enzymes that are predicted to leave a 3' overhang based on the sequence surrounding each 1p36 deletion breakpoint: *NsiI*, *ApaI* (subject 5), *SacI* (subject 139), *NspI*, *NsiI*, *AlwNI*, *BglI* (subject 142), and *SacI*, *BstXI* (subject 143).

Junction DNA sequencing

Gel-purified PCR products from the TOPO Walker reactions were sequenced using an ABI PRISM 3100-Avant genetic analyzer and Big Dye reagents (<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/abhome.jsp>) using previously described methods (Ballif et al. 2004a). Sequencher 4.1.4 (<http://www.genecodes.com/>) was used to analyze the sequence on either side of the breakpoint junctions. Original chromosome sequences were localized in the human genome version hg18 using BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). For subject 142, the sequence found after the break could not be assigned to the chromosome 1 consensus assembly. In this case, we searched alternate human genome assemblies using BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>). The matching unassigned contigs were downloaded for further analysis. Next, the breakpoint junction of each subject was separately confirmed by PCR using 1p36 unique sequence primers located only a few hundred base pairs from the putative breakpoint combined with complementary primers to the sequences found after the breaks. The primers were designed in the same way as the STS markers, as well as the PCR reactions and conditions employed.

Bioinformatics analysis

Sequences within a ~2 kb interval encompassing each breakpoint were checked for repetitive DNA elements with RepeatMasker (Smith and Green unpublished; <http://www.repeatmasker.org/>). The EMBOSS programs “palindrome” and “fuzznuc” were used to identify inverted repeats and detect potentially relevant sequence motifs associated with genome rearrangements, respectively (Rice et al. 2000; <http://emboss.sourceforge.net/index.html>). In order to predict Z-DNA structures, we used ZHUNT (Ho et al. 1986; <http://www.zhunt.als.orst.edu/holab/index.html>). We searched both strands using the “complementary” option of fuzznuc. For topoisomerase consensus and the longer translin motif, one mismatch was permitted; for DNA polymerase and deletion hotspots, no mismatches were allowed. Direct repeats were identified with Tandem Repeats Finder (Benson 1999; <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) using default parameters. Oligopurine (R) and oligopyrimidine (Y) tracts were identified by replacing A/G and C/T nucleotides into R or Y letters and locating the longest tracts occurring in the breakpoint regions. In a search to look for hairpin secondary structures that might predispose to rearrangement, we performed Unafold analysis (Markham and Zuker 2008; <http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/quikfold.php>) on the reference genome sequence (hg18) or an alternate genome assembly (HuRef) from the 145 bp region encompassing

each breakpoint shown in Fig. 3. The lowest energy foldings are displayed in supplementary Fig. S1.

Results

Characterization of rearrangements of 1p36

Array CGH was performed to initially characterize the 1p36 deletions in all five original subjects (subjects 139, 140, 141, 142 and 143). Figure 1a shows an example of array CGH results for the rearrangement in subject 143. A terminal deletion of ~2.3 Mb is shown by a loss of DNA as compared to the normal control reference. Likewise, this rearrangement shows a ~2.0 Mb gain of 4q sequences as compared to the normal control reference. In the same way, array CGH results for subjects 140 and 141 indicated an apparently pure terminal deletion of ~2.8 Mb. In subject 142, array CGH indicated a ~6.6 Mb terminal deletion with no other concurrent copy number change. In subject 139, array CGH exposed a ~1.9 Mb terminal deletion followed by a copy number gain of ~0.1 Mb (Fig. 1b). FISH was performed afterwards to confirm the array CGH results and localize the 1p36 deletion breakpoint regions in the physical map. Table 1 presents the results obtained with the clones used in FISH and include the results from previous works on subject 5 ascribed with a derivative chromosome (Ballif et al. 2004a; Heilstedt et al. 2003a). Apparently pure terminal deletions were confirmed in subjects 140 and 141, as well as a derivative chromosome in subject 143, and a complex rearrangement in subject 139. Interphase FISH in subject 139 to characterize the copy number gain revealed triplication of two overlapping clones in the proximal side of the deletion breakpoint (RP4-713A8 and RP4-740C4), followed by two duplicated clones (RP11-361M21 and RP3-395M20; data not shown). The order and orientation of the rearranged segments have not been delineated. Furthermore, FISH identified a single-copy gain at 1q44 in subject 142, previously ascertained by MLPA (D. Angelo, unpublished data) and not detected by array CGH. The most distal 1q clone on the microarray (RP11-438F14) is mapped proximal to this translocation breakpoint. The 1p36 deletion breakpoint regions were successfully refined to within a large-insert clone (subjects 140–143) or between two overlapping clones (subjects 5 and 139). Breakpoint locations were different in all but two subjects (subjects 140 and 141). Most breakpoints clustered at 2.0–2.6 Mb from the 1p telomere.

Breakpoint mapping and junction sequencing

STS marker walking analyses using hybrids containing the rearranged chromosomes 1 allowed us to progressively

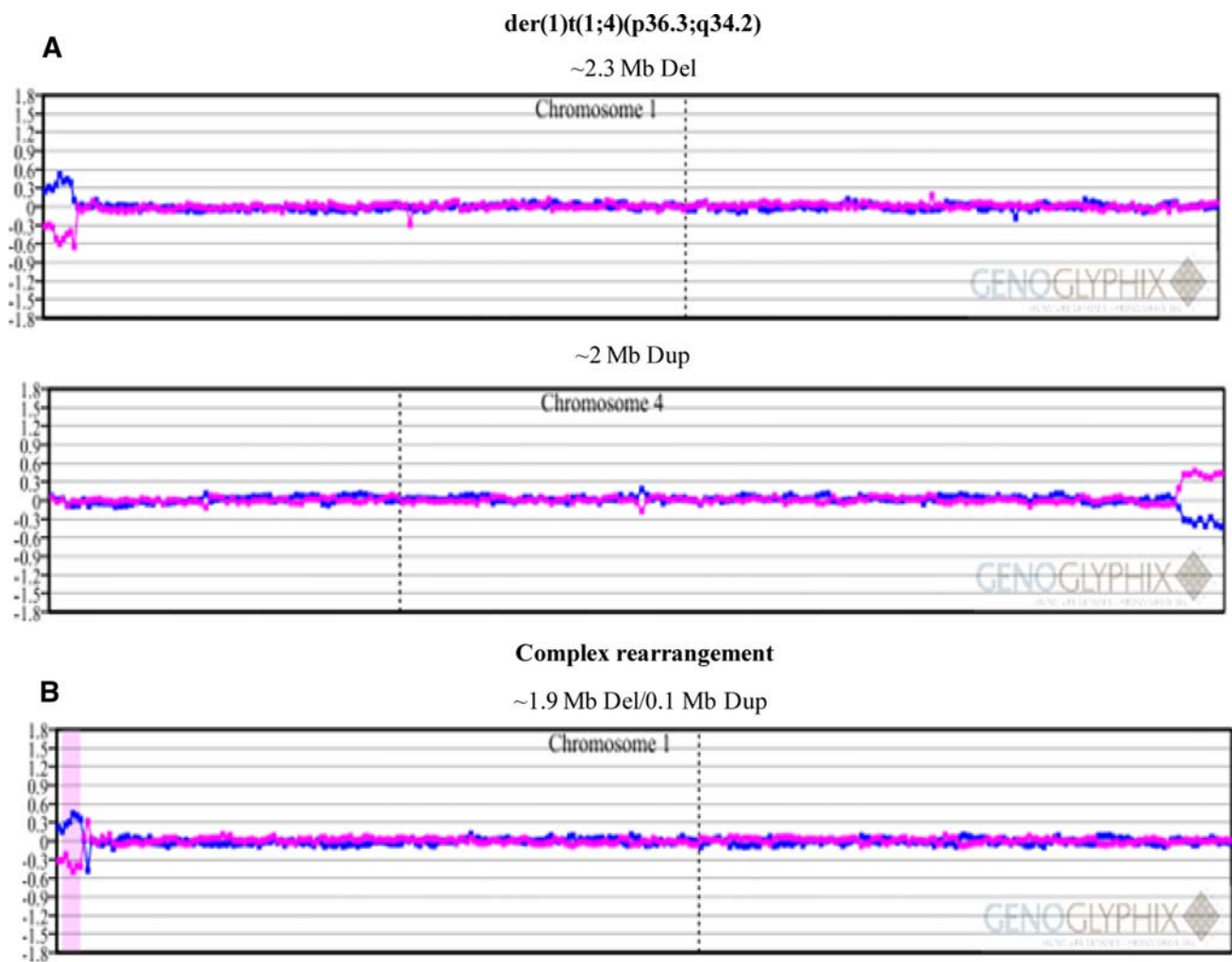


Fig. 1 Characterization of rearrangements of 1p36 using the SignatureChip[®] targeted array. Array CGH data for the entire chromosome showing abnormalities are displayed. Each clone on the plot is arranged along the *x*-axis according to its location on the chromosome, with the most distal p-arm clones on the left and the most distal q-arm clones on the right. The *blue line* represents the control:patient fluorescence intensity ratios for each clone, whereas the *pink line* represents

the fluorescence intensity ratios obtained from a second hybridization in which the dyes were reversed (patient:control). **a** Array CGH results for subject 143: detection of a der(1)t(1;4)(p36;q34.2) with a ~2.3 Mb deletion of 1p36 and a ~2.0 Mb duplication of 4q35.2. **b** Array CGH results for subject 139: detection of a complex rearrangement of 1p36 in which the most distal ~1.9 Mb of sequence is deleted followed by ~0.1 Mb of the duplicated sequence (color figure online)

narrow each deletion breakpoint of 1p36. Table 2 presents the locations and extent of the breakpoint intervals. The given nucleotide positions are relative to the original chromosome 1 based on the reference sequence in the human genome assembly (hg18). Breakpoint regions on chromosome 1 were narrowed down to the base pair level in four subjects (subjects 5, 139, 142 and 143). In subjects 140 and 141, we were unable to refine the breakpoints further than ~2.0 kb. For these latter patients, we set the nucleotide positions of the breakpoint intervals as a query in the UCSC Genome Browser with the “segmental dups” option, which revealed that each breakpoint region falls within a genomic interval containing a series of directly orientated 1p36 specific segmental duplications with 90–

98% identity (Fig. 2). This finding precluded the design of a unique set of primers to further narrow down these regions.

The TOPO Walker protocol was performed on those four subjects with the breakpoints refined to a ~200–300 bp region. We were able to clone specific junction fragments from all subjects and localize the chromosome positions inherent to the sequences found on either side of the junctions in the human reference genome sequence (hg18) or an alternate human genome assembly (HuRef; Table 3). The breakpoint regions were unique in all subjects. Sequenced fragments showed 98.5–100% identity to sequences for that respective chromosome in the reference assembly (hg18) or the alternate assembly (HuRef).

Table 1 BAC clones used in FISH analyses to confirm the array CGH results and localize the 1p36 deletion breakpoints within the physical map

Rearrangement type	Subject	Breakpoint location (Mb) from telomere				
Apparently pure terminal deletion	140	2.5–2.6	Deletion	Normal		
			RP11-54O7	RP13-436F16 ±		
	141	2.5–2.6	RP1-283E3	RP11-740P5		
			RP4-755G5			
Derivative chromosome der(1)t(1;1)(p36;q44)	05*	5.3–5.4 ^a	Deletion	Normal	Translocation	Normal
			RP4-703E10	RP1-58B11*	RP11-978I15	RP11-433K2
	142	6.6–6.7	CTD-2338G21*		RP11-656O22	RP11-488L18
						RP11-107G24
der(1)t(1;1)(p36;q44)	142	6.6–6.7	RP11-54O7	RP11-242F24 ±	GS-160-H23	WI2-2118C23
			RP11-49J3	RP11-312B8		
			RP11-58A11	RP11-334N17		
			RP1-126A5	RP3-505B13		
der(1)t(1;4)(p36;q35.2)	143	2.2–2.3	RP3-467L1			
			RP11-54O7	RP4-740C4 ±	RP11-1141D18	RP11-713C19
			RP4-713A8	RP11-361M21	RP11-45F23	
				RP3-395M20		
Complex rearrangement	139	2.0–2.2	Deletion	Duplication	Triplication	Normal
			RP11-54O7	RP11-361M21	RP4-713A8*	RP4-755G5
			RP11-465B22	RP3-395M20	RP4-740C4	RP13-436F16
			RP5-902P8			
			RP1-283E3			
			RP3-484O5			
			RP11-181G12*			

Breakpoint locations estimated in accordance with the Human March 2006 (hg18) assembly. Clones that showed a reduced signal by FISH are indicated by a “±” sign and were interpreted as partially deleted with breakpoints failing within these clones. The breakpoint regions in subjects 5 (Heilstedt et al. 2003a) and 139 were located between the two clones marked by an asterisk

^a Breakpoint region flanking a sequence gap

Confirmation by independent PCR was achieved for all of the junctions (data not shown).

The sequences found right next to either side of the cloned breakpoint junction for each subject are presented in Fig. 3. Microhomology of a few nucleotides (2–3 nt) was identified at the junctions of two derivative chromosomes (subjects 5 and 142) and a complex rearrangement (subject 139). On the derivative chromosomes 1 for subjects 5 and 142, the region of microhomology consists of a two-nucleotide (CT) and a three-nucleotide (GTG) microhomology found in frame with both original chromosome sequences, respectively. In subject 139, the deletion breakpoint was followed by an inverted duplication of 517 bp of 1p36 sequences from a proximal region, together with a two-nucleotide (AG) microhomology. The breakpoint of this duplication lies approximately 7.0 kb proximal to the deletion breakpoint. Only the derivative

chromosome 1 in subject 143 was recognized with a simple junction.

Bioinformatics analysis

To uncover DNA sequences prone to recombination or predisposed to cleavage and to get clues on the mutagenic mechanisms involved, we investigated the sequences directly flanking the breakpoint regions for the presence of repetitive elements, potential stretches of non-B-DNA conformations and recombinogenic motifs. The junction analysis results for 145-bp window are shown in Fig. 3. Interspersed repeats are found spanning the breakpoint junctions of numerous rearrangements and usually associated with aberrant homologous recombination (Abeyasinghe et al. 2006). Here, all the breakpoints were located in non-repetitive DNA sequences. With the exception of a 30-bp

Table 2 Locations and extent of the 1p36 breakpoint intervals

Subject	Deletion size (Mb)	Nucleotide position (bp) from telomere	Breakpoint interval size
05	5.4	5,452,895–5,453,105	211 bp
139	2.2	2,238,109–2,238,285	177 bp
140	2.6	2,603,090–2,605,937	2.8 kb
141	2.5	2,575,963–2,578,538	2.5 kb
142	6.7	6,729,654–6,729,801	148 bp
143	2.3	2,335,048–2,335,317	270 bp

Deletion sizes and breakpoint locations of the refined breakpoint regions in 1p36 are given in accordance with the Human March 2006 (hg18) assembly

portion of a retrotransposon-derived MaLR LTR element at one side of the translocation breakpoint in subject 143 and another 55-bp portion of a L1 sequence at the opposite side, no other interspersed repeats were detected at or around the remaining breakpoints. A noncanonical DNA structure has been shown to coincide with chromosomal breakpoints and seems to play a major role in initiating chromosomal breakage (Abeyasinghe et al. 2006). Inverted repeats can form hairpin or cruciform structures, direct repeats give rise to slipped structures, alternating pyrimidine–purine sequences can adopt left-handed Z-DNA conformations and oligo purine–pyrimidine stretches are prone to form triple helix, H-DNA (Bacolla and Wells 2004). With one mismatch allowed, a short inverted repeat was found surrounding the translocation breakpoint at 4q in subject 143 with a gap of 48 nucleotides between them. Similarly, an 11-bp closely spaced inverted repeat was found near the breakpoint of the deletion in subject 139. In subject 142, a 31-bp repeat unit of a direct repeat with 9.7 copies and 97% identity was found contiguous with the breakpoint of the translocation (part of this tandem repeat is shown in Fig. 3). Putative regions of Z-DNA structure were identified in close vicinity to some breakpoints, including five copies of a 15-bp sequence surrounding the 1q translocation breakpoint in subject 142 (three copies are shown in Fig. 3) and a 15-bp sequence near the breakpoint of the deletion in subject 143. We also found a possible Z-DNA forming segment for a 20-bp sequence located as close as 100-bp from this latter breakpoint and for a further 37-bp sequence approximately 1 kb distant from the deletion breakpoint in subject 5 (not shown). Adopting a minimum value of 90% match level, we identified oligopurine ($[R]_{4-14}$) and/or oligopyrimidine tracts ($[Y]_{4-20}$), all around each breakpoint as well as at both junctions of subject 139 and at the breakpoint of the translocation in subjects 5 and 143.

Target motifs of various endonucleolytic enzymes and recombination proteins have been detected near many chromosomal translocation and deletion breakpoints (Abeyasinghe et al. 2006). We detected DNA polymerase frameshift

hotspots [α (TCCCC/GGGGGA and CTGGCG), β (ACCCWR) and α/β (TGGNGT)] near the breakpoint of the deletion in subject 5 and 143, near the inverted duplication in subject 139, and translocation in subject 142. Besides, a motif ACCCWR on the complementary strand overlapped this latter breakpoint by two nucleotides. Deletion hotspot consensus sequences (TGRKRM) were identified near all breakpoints (except of the translocation in subject 142) and at the breakpoint of the duplication in subject 139. With one mismatch allowed, we identified a consensus cleavage site of the vertebrate topoisomerase II (RNYNCCNNGYNGKTNINY) located 3-bp upstream from the breakpoint of the translocation in subject 5. Translin long (GCCCWSSW) sites were detected all around each breakpoint (except of the translocation in subject 5) and overlapping the junction of the deletion and translocation in subjects 139 and 142, respectively. Immunoglobulin heavy chain class switch repeats (GAGCT, GGGCT, GGGGT, TGGGG and TGAGC) were found nearby all breakpoint regions, except from the derivative chromosome in subject 142. Potential secondary DNA structures for these sequences are presented in Supplementary Fig. S1.

Extending the breakpoint junction regions by ~ 1 kb on either side, we identified interspersed repeats around the breakpoint of the deletion in subjects 5 and 142, representing more than 50% and nearly 40% of these regions, respectively. Repetitive elements were also identified around the breakpoint of these same subjects, corresponding to nearly 15% and more than 40% of the regions in that order. In subject 143, more than 80% of the sequence around the breakpoint of the translocation corresponds to interspersed repeats. A simple repeat $[(CA)_n]$ and another low complexity repeat (CT-rich) were identified ~ 1 kb distant from the breakpoint of the deletion in subjects 5 and 139, respectively. Palindromes with at least 10-bp of the sequence were identified all around these regions in each of the breakpoints, as well as a small number of direct repeats with more than 90% matches in the vicinity of the breakpoint of the deletion in subjects 5, 139 and 142. The lowest GC content flanking the breakpoint of the deletion was detected for subject 142 (46%). The remaining breakpoint-flanking sequences contained a GC content of at least 53% (subject 5), with the sequences of two comprising more than 65% (subjects 139 and 143). Other than the duplication breakpoint-flanking sequence of subject 139 with 67% GC content, all the translocation breakpoint-flanking sequences showed a GC content below 46%. The mean GC content for the whole genome is calculated in 41% (Bauters et al. 2008). A high level of GC content is positively correlated with DNA bending and B–Z transitions. The most common sequence motifs detected were deletion hotspot consensus sequences, translin long sites and polymerase frameshift hotspots. The vertebrate topoisomerase consensus cleavage site, the heptamer

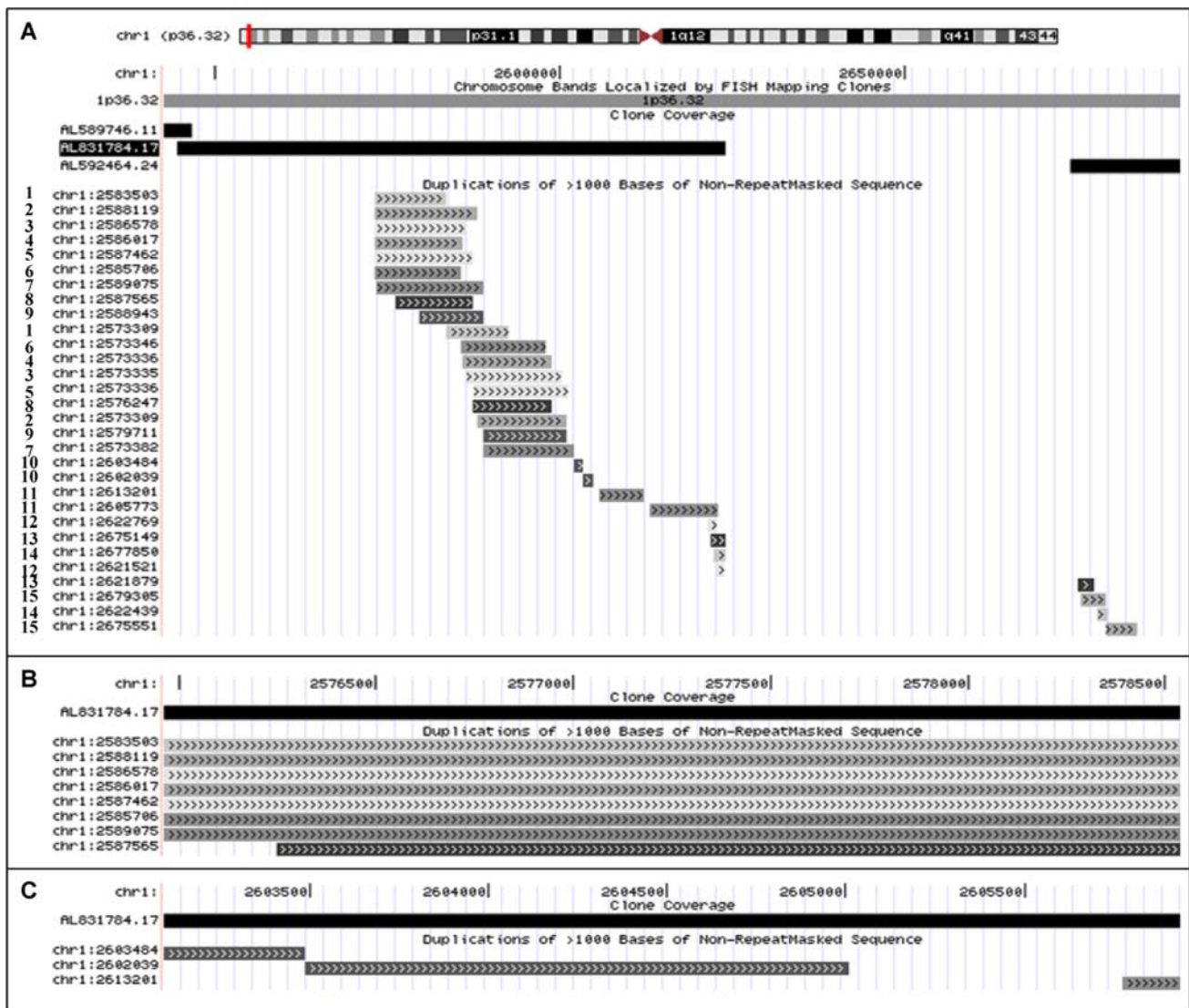


Fig. 2 UCSC Genome Browser graphic overview of 1p36 specific segmental duplications. **a** Genomic region surrounding the breakpoint-containing clone of subjects 140 and 141 with the “segmental dups” track. Clone RP4-755G5 (AL589746) precedes the breakpoint-containing clone RP13-436F16 (AL831784), which in turn is followed by a 50 kb genomic gap and more proximally by clone RP11-740P5 (AL592464). Putative genomic duplications with 90–98% identity are shown as *light to dark gray bars* (the darker the color, the higher is the

identity). The doubled numbers adjacent to the segmental duplications identifiers indicate the other position of the sequence. Most of the copies are arrayed in tandem with just a few base pairs in between, and several segmental duplications exhibit overlap with others. Relative orientation of the sequence in the other position is deduced from the hatch marks. **b** Genomic duplications mapped to the breakpoint interval of subject 141. **c** Genomic duplications mapped to the breakpoint interval of subject 140 (color figure online)

recombination signal [CAC(AT)GTG] and translin short sites (ATGCAG) were also discoverable. The distribution of occurrences of short motifs in 200-bp windows across the whole chromosome 1 was recently reported (Gajeka et al. 2008). Using the same window size, we compared the densities of motifs near each breakpoint junction in chromosome 1 to the frequency published above. We found a significantly higher number of DNA polymerase frameshift hotspots close to the breakpoint of the deletion in subjects 5, next to the breakpoint of the duplication in subject 139, and alongside the breakpoint of translocation in subject 142. We also

found enrichment for translin sites near the two former breakpoints, as well as at the side of the breakpoint of the deletion in subject 139. Both motifs were already reported to be significantly over-represented near the translocation breakpoints (Abeyasinghe et al. 2006).

Discussion

Sequence analysis of chromosomal rearrangement breakpoints, mostly from yeast and mammalian somatic cells,

Table 3 Locations of the cloned and sequenced breakpoint junctions, relative to normal chromosome

Subject	Normal chromosome sequences nucleotide position (bp) from telomere	Breakpoint containing-clones	Junction sequences relative nucleotide position	Identity (%)
05	Chr1 (+) 5,452,985–5,453,152	CTD-2298C19	651–817	99.5
	Chr1 (–) 245,828,705–245,829,355	RP11-978I15	1–652	99.1
139	Chr1 (+) 2,238,212–2,238,590	RP11-181G12	516–896	98.5
	Chr1 (–) 2,245,347–2,245,862	RP4-713A8	1–517	99.5
142	Chr1 (+) 6,729,767–6,729,928	RP11-242F24	183–344	100
	Chr1 (–) 175,156–175,340*	Genomic gap	1–185	99
143	Chr1 (+) 2,335,147–2,335,459	RP4-740C4	160–470	98.8
	Chr4 (–) 189,347,380–189,347,538	RP11-516D7	1–159	100

Normal chromosome coordinates are given relative to the Human March 2006 (hg18) assembly. For subject 142, the chromosome 1 coordinate indicated by an asterisk is in agreement with the NW_001838555.1 contig from the HuRef genome assembly. Relative nucleotide positions are given in accordance with the number of nucleotides found on either side of the breaks that matches with the normal chromosome sequences in that position on the hg18 or HuRef assembly

has long been devoted to unraveling the pathways to repair DNA double-strand breaks (DSBs) and ensure the maintenance of genomic integrity in mammalian cells (Argueso et al. 2008; Haber 2000; Iliakis et al. 2004; Riha et al. 2006; Weterings and Chen 2008). Insights into human genomic disorders with respect to the mis-repair of DSBs were gained only recently and have been implicated in specific genome architectural features at the breakpoints (Abeysinghe et al. 2003; Sankaranarayanan and Wassom 2005). The observation of homologous sequences at the breakpoint junctions constitutes an evidence for homologous recombination repair (HRR), whereas little or no homology at the junctions indicates NHEJ. A variant form of HRR, single strand annealing (SSA), can also occur using a few bases of homology, even if it is more common to happen between breakpoint-flanking homologous repeat sequences (Sankaranarayanan and Wassom 2005). Likewise, homology of only a few nucleotides can mediate an alternative mechanism of HRR, extensively studied in yeast, known as break-induced replication (BIR) (Koszul et al. 2004; Ricchetti et al. 2003). We have cloned the breakpoints in a complex rearrangement and three de novo non-reciprocal translocations involving the subtelomere of 1p and found similarities at the junctions, such as microhomology of up to 3 nts along with no significant sequence identity in close proximity to the breakpoint regions. All the breakpoints appeared to be unique and their occurrence was limited to non-repetitive, unique DNA sequences. In addition, breakpoint mapping of two apparently pure terminal deletions of 1p36 revealed that both occurred within two distinct genomic intervals ~25-kb apart, each containing a series of 1p36 specific segmental duplications that share 90–98% identity.

Previous sequencing data at the breakpoint junctions in complex rearrangements of 1p36 with identical structure reported herein, i.e., partial deletion, duplication and/or triplication of the same distal chromosome region, have

implicated NHEJ repair of uncapped sister chromatids resulting in little or no homology between the breakpoint regions (Ballif et al. 2003; Gajecka et al. 2005). More complex rearrangements of the same type were reported afterwards, but breakpoint analysis were not accomplished for these cases (Ballif et al. 2007; Gajecka et al. 2005). NHEJ-induced complex constitutional rearrangements involving the tips of human chromosomes are likely to be originated by a premeiotic DSB leading to a terminally deleted chromosome, which behaves in essentially the same way as mitotically dividing chromosomes marked by telomere dysfunction. After the DNA replication and end-to-end fusion of sister chromatids, there is the passage by the dicentric chromosome through at least one BFB cycle until restoration of telomeric repeats by telomere healing or capture (Murnane 2006; Riha et al. 2006). In agreement with the above-mentioned, we suggest a role for NHEJ repair in originating the complex rearrangement of subject 139. Even though we have not fully characterized this rearrangement, the observation of duplicated and triplicated segments in addition to the deletion indicates that the deleted chromosome underwent more than one BFB cycle before becoming structurally stable. At this point, we were unable to determine the mechanism engaged in telomere restoration. Nevertheless, direct telomere addition or a telomere capture event from a very distal subtelomeric region seems to be the most likely means of healing, since no other imbalance was detected by aCGH, FISH and MLPA.

Recently, microhomology-dependent BIR has turned out to be an appealing pathway of telomere capture in humans causing non-reciprocal translocations between the subtelomeres (Ballif et al. 2004a) and unique microduplications (Bauters et al. 2008; Sheen et al. 2007). This one-ended recombination event can occur when a single end of a DSB invades a DNA duplex at any chromosome location, based on large stretches of identical complementary sequence, or

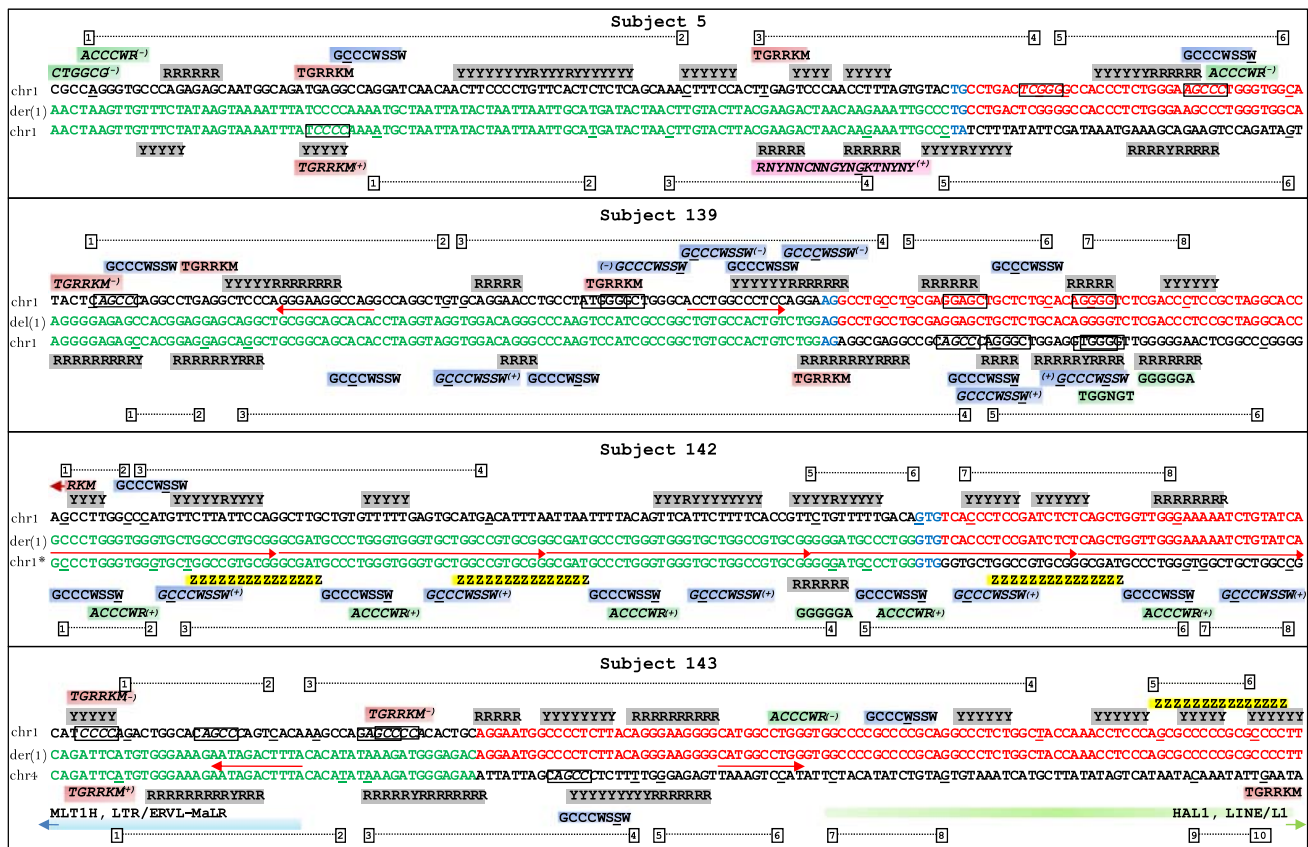


Fig. 3 Sequence analyses of the breakpoint junctions. For each subject, the alignments show sequences from the rearranged chromosome 1 (*center*) with the normal chromosome sequences from 1p36 (*top*, 5'–3' forward strand) and from the other breakpoint-flanking sequences (*bottom*, 5'–3' reverse strand). Normal chromosome sequences are relative to the Human March 2006 (hg18) assembly or HuRef assembly (*asterisk*). Relative contribution to the rearranged chromosome is marked with *red letters* (1p36 intact sequences) and *green letters* (sequences translocated or duplicated). Nucleotide sequence identities shared by the breakpoints are marked in *blue letters*. Oligopyrimidine/purine tracks (pR/Y) are specified as *gray boxed letters* and putative regions of Z-DNA structure (pZ) as *pink boxed letters*. Inverted repeats (*outward-facing arrows*), direct repeats (*right-facing arrows*) and

immunoglobulin heavy chain class switching repeats (*outlined boxes*) are indicated. Sequence motifs are highlighted by *colored boxes* adjacent to the alignments: DNA polymerase frameshift hotspots (*green*), deletion hotspot consensus (*red*), translin long motifs (*blue*) and eukaryotic topoisomerase cleavage site consensus (*pink*). Interspersed repeats are represented by a *colored bar* below the alignment together with the repeat type. *Boxed numbers* adjacent to the (*underlined*) normal chromosome sequences indicate significant potential DNA structural features, which are shown in the corresponding Supplementary Fig. S1. “(+)”, “(–)”, and/or *italicized letters* indicate that the motif is in the complementary strand. *Underlined letters* for the translin long motif show the mismatches (color figure online)

occasionally a few nucleotides of homology, and replicates the sequence to the end or to a second DSB creating a “duplicative translocation” with no loss of DNA from the donor chromosome (Kozsul et al. 2004; Ricchetti et al. 2003). In contrast, NHEJ and SSA are unlikely to result in duplications, but rather reciprocal translocations when two DSBs occurring in non-homologous chromosomes are joined together. When such translocations are created in meiotically dividing cells, unbalanced gametes carrying non-reciprocal translocations are expected to be formed, as a result of pairing and segregation in meiosis (Sankaranarayanan and Wassom 2005). NHEJ has been recently implicated in a novel mechanism of reciprocal translocation formation (Gajecka et al. 2006b, 2008). SSA, on the other hand, has been identified as a significant pathway leading to

translocations frequent in human cancers (Weinstock et al. 2006) but not constitutional translocations. To date, sequence analysis in only one non-reciprocal translocation breakpoint junction, consistent with telomere capture events, generating and/or stabilizing a derivative chromosome [der(11)t(11;20)(qter;qter)] disclosed nucleotide insertion of 8-bp from unknown origin at the recombination site and lack of homology between the breakpoint regions of both chromosomes (Rooms et al. 2006). Now, we report the finding of 2 to 3-nt in-phase at the breakpoint of two derivative chromosomes der(1)t(1;1)(p36;q44) (subjects 5 and 142) and a simple junction at the breakpoint of a third derivative chromosome [der(1)t(1;4)(p36;q35)] (subject 143). Limited or complete lack of homology at the breakpoint junctions of chromosomal rearrangements strongly

supports NHEJ-based repair, and we did not find any significant sequence identity in close proximity to the breakpoint regions of these nonreciprocal translocations. Here, we favor the NHEJ pathway in the formation of these de novo nonreciprocal translocations, because of the lack of evidence to support a homology-based recombination mechanism. Besides, NHEJ seems to exhibit a dominant role in DNA repair in mammalian cells (Mansour et al. 2008), as it is a very proficient mechanism in mediating translocation formation, whereas SSA is not (Weinstock et al. 2006). Furthermore, it is still not known if BIR does take place in mammalian cells (Deem et al. 2008). We speculate whether NHEJ through microhomology-based repair and direct joining mechanisms was involved in the reciprocal translocations formation during meiosis, causing the unbalanced gametes carrying the nonreciprocal translocations seen in subjects 5, 142 and 143.

As a corollary to the hypothesis of NHEJ inducing these rearrangements, all breakpoints were located in non-repetitive, unique DNA sequences. Besides, we identified several non-homologous signal sequences in the 2 kb region surrounding the breakpoints, including the vertebrate topoisomerase II consensus cleavage site, the heptamer recombination signal, the deletion hotspot consensus sequence, translin target sites and DNA polymerase α/β frameshift hotspots. Using a window size of 200-bp, we verified that the density of translin target sites and DNA polymerase frameshift hotspots was higher than expected by chance in a couple of breakpoints in chromosome 1 (subjects 5, 139, and 142). The association of translin binding motifs with breakpoints of chromosome rearrangements is not unusual, and the translin protein might be involved in joining the broken chromosome ends of staggered nicks during the repair of DSBs through NHEJ (Gajecka et al. 2006b). DNA polymerase frameshift hotspots are associated with replication slippage and are over-represented at breakpoint junctions (Abeyasinghe et al. 2006). The observation of immunoglobulin class switch repeats in the vicinity of deletion and translocation breakpoints is consistent with NHEJ repair (Abeyasinghe et al. 2006). These sequences were observed at all but one rearrangement breakpoint. We also identified several potential stretches of non-B-DNA conformations at or as close as a 100 base pairs from the putative breakpoints, which may have facilitated DNA breaks in these chromosomal regions. Yet, Unafold analysis revealed that the vast majority of the breakpoints were located within flanking sequences with the potential to form stem-loop structures, making the DNA sequence more susceptible to breakage. Moreover, all breakpoint-flanking sequences were associated with a higher GC-content than the mean 41% yield for the whole genome. Thus, our findings further emphasize evidences supporting the potential of noncanonical DNA structure-

induced DNA strand breaks, implicating NHEJ in the repair and in the subsequent rearrangement.

Moreover, the breakpoints of two apparently pure terminal deletions of 1p36 were shown to be located within two distinct genomic intervals \sim 25-kb apart, each containing a series of 1p36 specific segmental duplications with 90–98% identity. These rearrangements could occur via homologous recombination between subtelomeric segmental duplications, or could be subtelomeric breaks healed by telomere sequences. However, the breakpoints have not been cloned and thus it is not yet known what sequences are present directly after the breaks. Therefore, at this point, this finding is not conclusive to suggest an exclusive homology-based recombination mechanism of origin for these deletions. Besides, breakpoints in several cases have been shown to coincide with segmental duplications that were not physically involved in the rearrangement formation (Bauters et al. 2008; Potocki et al. 2007).

Apart from the highest GC-content of the 1p36 breakpoint-flanking sequences, which is in agreement with the high level of recombination reported for this chromosome region, we found no obvious difference in the density and distribution of specific recombination- or cleavage associated motifs near the 1p36 breakpoint-flanking sequences, compared to the other breakpoint-flanking sequences that could explain the fact that the 1p subtelomere is the most common occurring terminal deletion in humans.

Taken together, it is likely that NHEJ is the mechanism of DNA repair, which appears to play a role in most rearrangements of 1p36.

Acknowledgments This work was supported by The State of São Paulo Research Foundation, FAPESP (04/10380-6 to C.S.D.); Centers for Research, Innovation and Diffusion, CEPID (1998/14254-2); and The National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (304381/2007-1 to C.P.K.). We thank the families for participating in the study.

References

- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, Ball EV, Cooper DN (2003) Translocations and gross deletion breakpoints in human-inherited disease and cancer I: nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat* 22:229–244
- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Cooper D (2006) Gross deletions and translocations in human genetic disease. In: Genome Disease, Volff J-N (eds) *Genome dynamics*. Karger, Basel, pp 17–34
- Argueso JL, Westmoreland J, Mieczkowski PA, Gawel M, Petes TD, Resnick MA (2008) Repetitive DNA can reshape the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11845–11850
- Bacolla A, Wells RD (2004) Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease. *J Biol Chem* 279:47411–47414
- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12:2153–2165

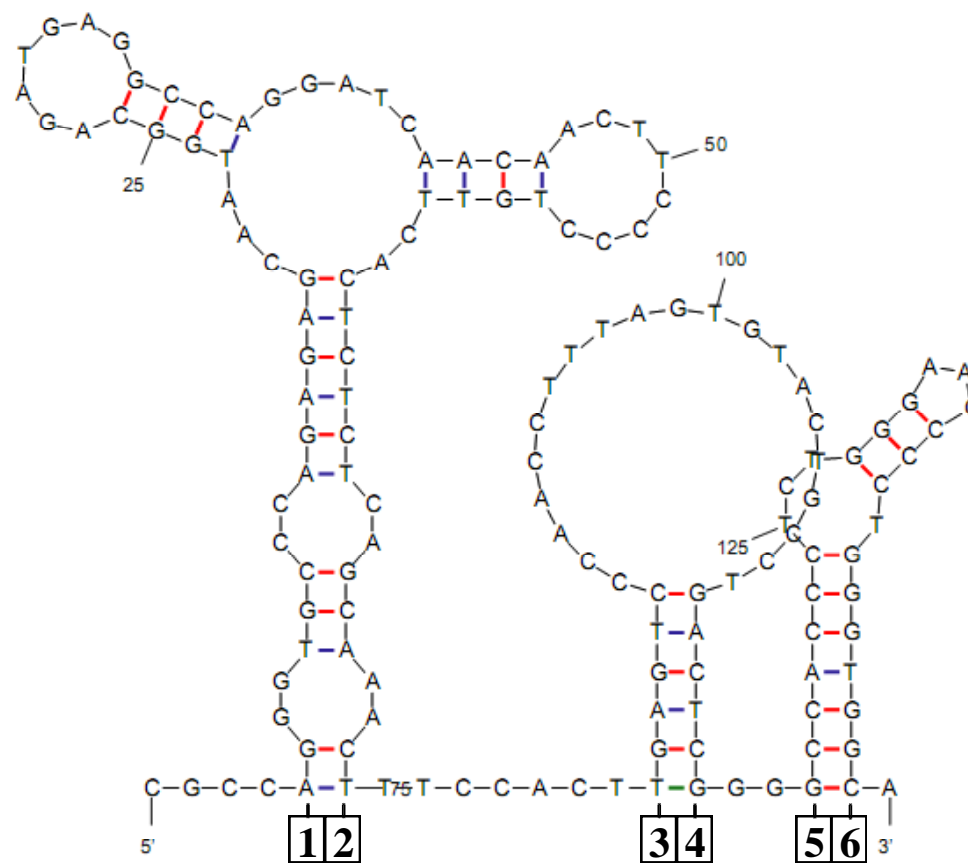
- Ballif BC, Wakui K, Gajecka M, Shaffer LG (2004a) Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet* 114:198–206
- Ballif BC, Gajecka M, Shaffer LG (2004b) Monosomy 1p36 breakpoints indicate repetitive DNA sequence elements may be involved in generating and/or stabilizing some terminal deletions. *Chromosome Res* 12:133–141
- 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 Part A* 143A:1850–1857
- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, Zuberi SM, Carey JC (2008) Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 121:404–410
- Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K, Govaerts K, Vandenreijt K, Niel F, Blanc P, Stevenson RE, Fryns JP, Marynen P, Schwartz CE, Froyen G (2008) Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* 18:847–858
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG (2005) Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A* 134:259–267
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580
- Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O (2006) Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J Med Genet* 43:822–828
- Deem A, Barker K, Vanhulle K, Downing B, Vayl A, Malkova A (2008) Defective break-induced replication leads to half-cross-overs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179:1845–1860
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanello R, Cao A, Wood WG, Ayyub H, Higgs DR (1994) Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet* 55:505–512
- Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dode C, Vignes B, Horsley SW, Kearney L, Buckle VJ, Ayyub H, Higgs DR (1996) Chromosomal stabilization by a subtelomeric rearrangement involving two closely related Alu elements. *Hum Mol Genet* 5:1163–1169
- Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen 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
- Gajecka M, Glotzbach CD, Jarmuz M, Ballif BC, Shaffer LG (2006a) Identification of cryptic imbalance in phenotypically normal and abnormal translocation carriers. *Eur J Hum Genet* 14:1255–1262
- Gajecka M, Pavlicek A, Glotzbach CD, Ballif BC, Jarmuz M, Jurka J, Shaffer LG (2006b) Identification of sequence motifs at the breakpoint junctions in three t(1;9)(p36.3;q34) and delineation of mechanisms involved in generating balanced translocations. *Hum Genet* 120:519–526
- Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:346–356
- Gajecka M, Gentles AJ, Tsai A, Chitayat D, Mackay KL, Glotzbach CD, Lieber MR, Shaffer LG (2008) Unexpected complexity at breakpoint junctions in phenotypically normal individuals and mechanisms involved in generating balanced translocations t(1;22)(p36;q13). *Genome Res* 18:1733–1742
- Haber JE (2000) Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16:259–264
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003a) 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, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003b) Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet* 64:310–316
- Ho PS, Ellison MJ, Quigley GJ, Rich A (1986) A computer-aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences. *EMBO J* 5:2737–2744
- Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G (2004) Mechanisms of DNA double-strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* 104:14–20
- Kozul R, Caburet S, Dujon B, Fischer G (2004) Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO J* 23:234–243
- Lamb J, Harris PC, Wilkie AO, Wood WG, Dauwerse JG, Higgs DR (1993) De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)_n in the alpha thalassaemia/mental retardation syndrome (ATP-16). *Am J Hum Genet* 52:668–676
- Ledbetter DH, Martin CL (2007) Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:327–334
- Mansour WY, Schumacher S, Roskopf R, Rhein T, Schmidt-Petersen F, Gatzemeier F, Haag F, Borgmann K, Willers H, Dahm-Daphi J (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 36:4088–4098
- Markham NR, Zuker M (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. In: Keith JM (ed) *Bioinformatics: structure, functions and applications*, vol 2. Humana Press, Totowa, pp 1–31
- Murnane JP (2006) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair* 5:1082–1092
- Page SL, Shaffer LG (1997) Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. *Nat Genet* 15:231–232
- Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CMB, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee JA, Lewis RA, Mendoza-Londono R, Robbins-Furman P, Shaw C, Shi X, Weissenberger G, Withers M, Yatsenko SA, Zackai EH, Stankiewicz P, Lupski JR (2007) Characterization of Potocki–Lupski syndrome (dup(17)(p112p112)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet* 80:633–649
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL (2006) Subtelomere FISH, analysis of 11, 688 cases: an evaluation of the frequency, pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478–489
- Ricchetti M, Dujon B, Fairhead C (2003) Distance from the chromosome end determines the efficiency of double-strand break repair in subtelomeres of haploid yeast. *J Mol Biol* 328:847–862
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet* 16:276–277
- Riha K, Heacock ML, Shippen DE (2006) The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu Rev Genet* 40:237–277

- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF (2006) Diverse chromosome breakage mechanisms underlie subtelomeric rearrangements, a common cause of mental retardation. *Hum Mutat* 28:177–182
- Sankaranarayanan K, Wassom JS (2005) Ionizing radiation and genetic risks XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic disorders. *Mutat Res* 578:333–370
- Shaffer LG, McCaskill C, Han JY, Choo KH, Cuttillo DM, Donnemfeld AE, Weiss L, Van Dyke DL (1994) Molecular characterization of de novo secondary trisomy 13. *Am J Hum Genet* 55:968–974
- 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
- Sheen CR, Jewell UR, Morris CM, Brennan SO, Férec C, George PM, Smith MP, Chen JM (2007) Double complex mutations involving F8 and FUNDC2 caused by distinct break-induced replication. *Hum Mutat* 28:1198–1206
- Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ (2000) Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by de novo telomere addition. *Am J Hum Genet* 67:610–622
- Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B, Jasin M (2006) Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair* 5:1065–1074
- Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18:114–124
- Wilkie AO, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR (1990) A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by the addition of telomeric repeats (TTAGGG)_n. *Nature* 346:868–871

Table S1: BAC clones used in FISH analyses. The location of all clones corresponds to the March 2006 draft sequence of the human genome on the UCSC Genome Browser

Clone	Location (pb)	Subject
<i>1p36 clones</i>		
RP11-54O7	chr1:801,394-988,152 (1p36.33)	139, 140, 141, 142, 143
RP11-465B22	chr1:986,126-1,117,131 (1p36.33)	139
RP5-902P8	chr1:1,115,132-1,227,290 (1p36.33)	139
RP1-283E3	chr1:1,609,516-1,720,123 (1p36.33)	139, 140, 141
RP3-484O5	chr1:2,012,199-2,059,766 (1p36.33)	139
RP11-181G12	chr1:2,062,347-2,242,269 (1p36.33)	139
RP4-713A8	chr1:2,240,270-2,263,787 (1p36.33)	139, 143
RP4-740C4	chr1:2,261,788-2,368,113 (1p36.33~32)	139, 143
RP11-361M21	chr1:2,366,114-2,370,109 (1p36.32)	139, 143
RP3-395M20	chr1:2,368,110-2,522,845 (1p36.32)	139, 143
RP4-755G5	chr1:2,522,760-2,546,655 (1p36.32)	139, 140, 141
RP13-436F16	chr1:2,544,656-2,624,080 (1p36.32)	139, 140, 141
RP11-740P5	chr1:2,674,081-2,794,108 (1p36.32)	140, 141
RP11-49J3	chr1:5,866,139-5,966,440 (1p36.31)	142
RP11-58A11	chr1:6,485,456-6,587,996 (1p36.31)	142
RP1-126A5	chr1:6,571,374-6,683,531 (1p36.31)	142
RP11-242F24	chr1:6,689,444-6,761,263 (1p36.31)	142
RP11-312B8	chr1:6,759,263-6,963,656 (1p36.31)	142
RP11-334N17	chr1:6,961,657-7,023,161 (1p36.31)	142
RP3-505B13	chr1:7,146,893-7,259,359 (1p36.23)	142
RP3-467L1	chr1:7,705,429-7,868,155 (1p36.23)	142
<i>4q35.2 clones</i>		
RP11-713C19	chr4:189,051,560-189,277,198	143
RP11-1141D18	chr4:189,390,935-189,553,757	143
RP11-45F23	chr4:190,520,006-190,668,423	143
<i>1q44 clones</i>		
WI2-2118C23	chr1:246,932,402-246,974,833	142
GS-160-H23	chr1:247,115,289-247,115,443	142

Figure S1



(A)
Subject 5
Breakpoint region of 1p36 deletion

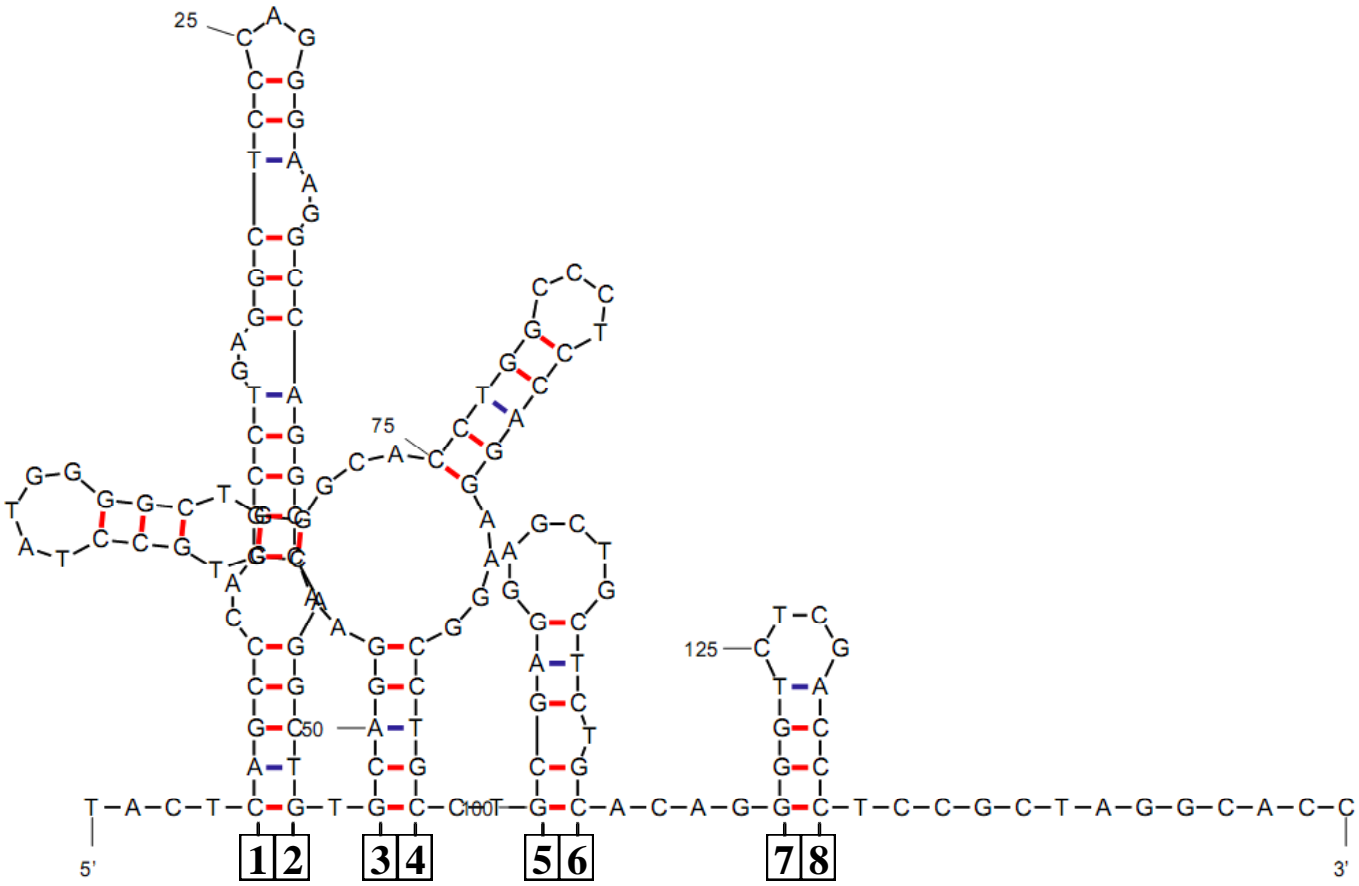
$$dG = -16.75A$$

Figure S1



(B)
Subject 5
Breakpoint region of 1q44 translocation
 $dG = -7.54A$

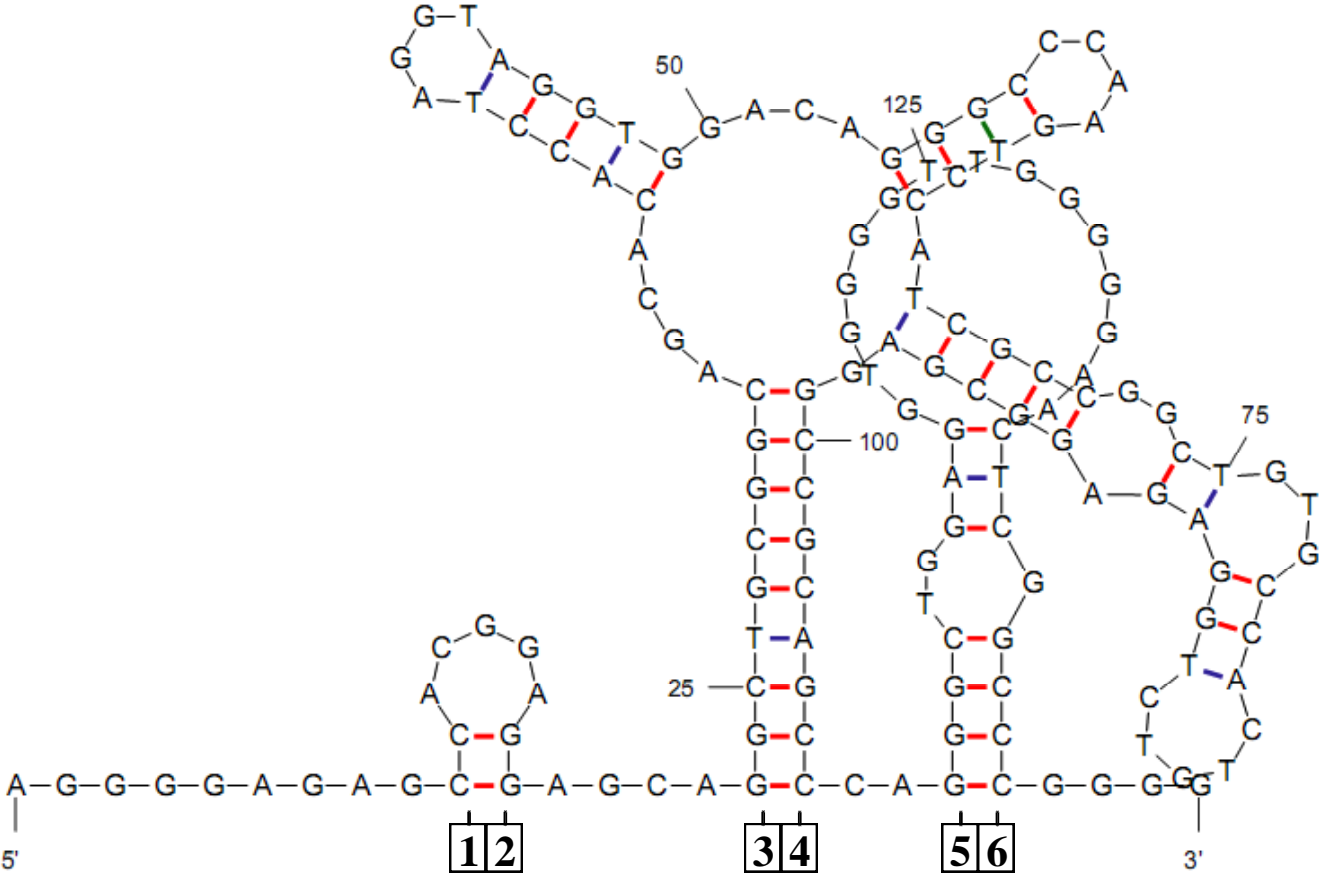
Figure S1



(C)
Subject 139
Breakpoint region of 1p36 deletion

$$dG = -29.251p139$$

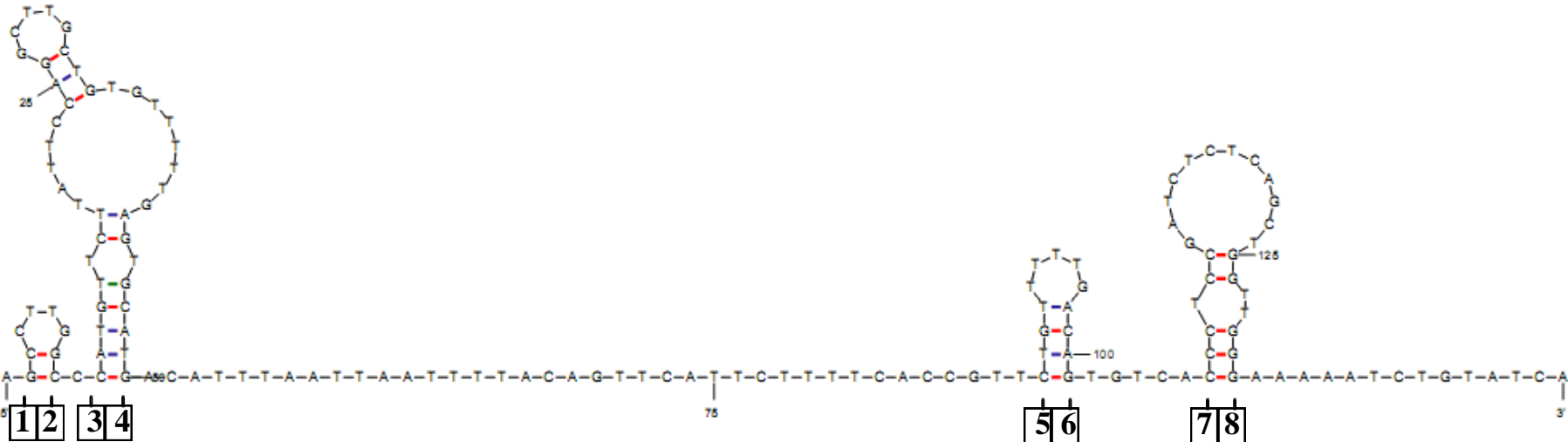
Figure S1



(D)
Subject 139
Breakpoint region of 1p36 duplication

$$dG = -25.22A$$

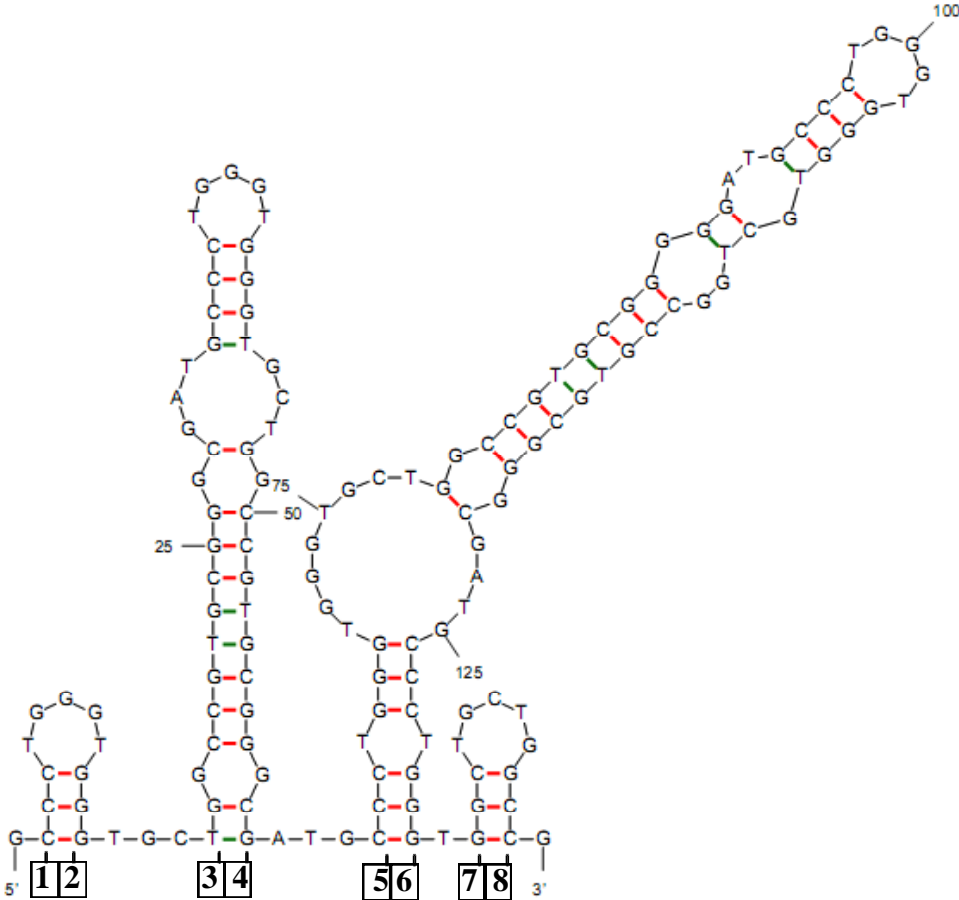
Figure S1



(E)
Subject 142
Breakpoint region of 1p36 deletion

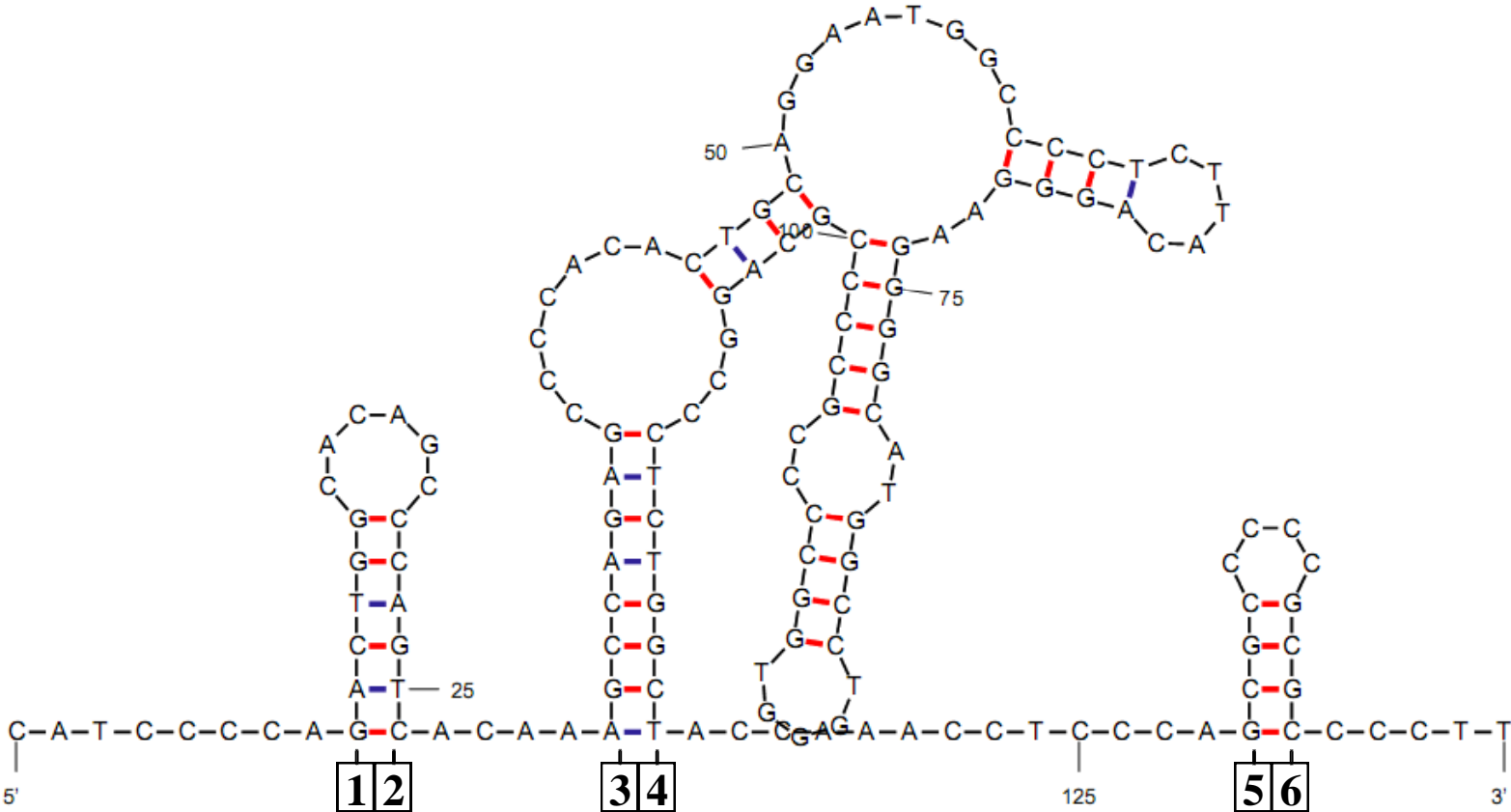
$$dG = -8.11A$$

Figure S1



(F)
Subject 142
Breakpoint region of 1q44 translocation
 $dG = -31.67A$

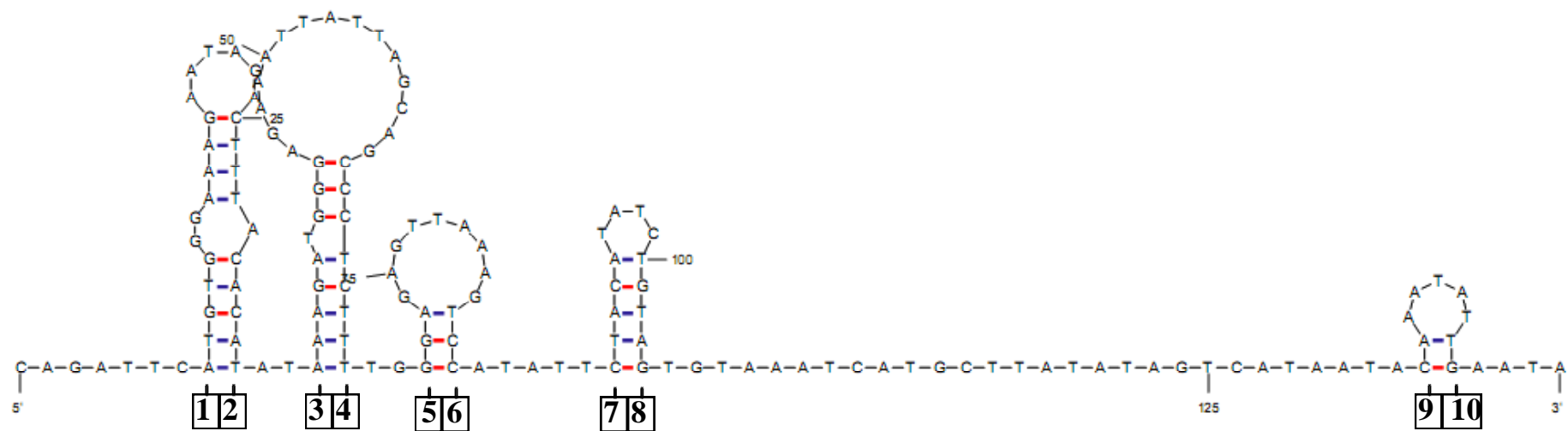
Figure S1



(G)
Subject 143
Breakpoint region of 1p36 deletion

$$dG = -29.31A$$

Figure S1



(H)
Subject 143
Breakpoint region of 4q35 translocation

$$dG = -11.47A$$

Capítulo 4 – Resultados

Multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of typical and atypical monosomy 1p36 subjects and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia.

Carla S. D'Angelo¹; Ilana Kohl¹; Mônica Castro Varela¹; Cláudia I. E. de Castro¹; Chong A. Kim²; Débora R. Bertola²; Charles M. Lourenço³; Célia P. Koiffmann¹.

¹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, SP-05508-900 São Paulo, Brazil;

²Genetics Unit, Department of Pediatrics, Children Institute, University of São Paulo, SP-05403-000 São Paulo, Brazil;

³Neurogenetics Unit, Department of Medical Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP-14049-900 Ribeirão Preto, Brazil.

email: Carla S. D'Angelo (cdangelo@ib.usp.br)

*Correspondence to Carla Sustek D'Angelo, Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, sala 204/209 CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Key words: MLPA, Monosomy 1p36, PWS, Obesity.

To be submitted to The European Journal of Human Genetics

Abstract

Rearrangements of 1p36 are the most frequently detected abnormalities in diagnostic testing for chromosomal cryptic imbalances and include different-sized simple terminal deletions, derivative chromosomes, interstitial deletions and complex rearrangements. These rearrangements have been reported to result in the specific pattern of malformation and neurodevelopmental disabilities that characterizes monosomy 1p36 syndrome. Thus far, no genes have been conclusively determined to be causative. Besides, it is still not known if a mechanism of haploinsufficiency or position effect that influences phenotype expression in this commonest terminal deletion syndrome. Obesity and hyperphagia have been reported in ~15% of cases. We have used multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to screen for monosomy 1p36 in a group of 154 hyperphagic and obese, PWS negative patients and in a separate group of 83 patients sent to investigate a variety of other conditions. The strategy used allowed the identification of a diversity of rearrangements in nine subjects with typical, mild or atypical phenotypes. Our work reinforces the association between monosomy 1p36 and obesity and hyperphagia, and further suggests that these features might be associated with an atypical/mild phenotype in addition to a submicroscopic deletion of ~2 to 3 Mb in size. Potential candidate genes within this critical interval are presented. We discuss the value of MLPA as a primary diagnostic tool for rapid detection and delineation of rearrangements at 1p36.

Introduction

Constitutional rearrangements of 1p36 are the most common clinically significant chromosomal abnormalities detected in diagnostic laboratories testing for cryptic imbalances in subtelomeres and other targeted genomic regions (Ravnan et al. 2006; Ballif et al. 2007; Shaffer et al. 2007). Deletion of the subtelomeric region of 1p causes the specific constellation of clinical features characteristic of monosomy 1p36 syndrome (Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008), which is now recognized as the most common terminal deletion syndrome, given the estimated incidence of 1 in 5000 to 1 in 10000 births (Shapira et al. 1997; Heilstedt et al. 2003b). The phenotype of the chromosome 1p36 deletion syndrome was first delineated in 1997, with basis on the clinical findings of 13 patients with isolated deletions of 1p36 (Shapira et al. 1997). Since then, extensive clinical data have been reported (Shapira et al. 1997; Knight-Jones et al. 2000; Zenker 2002; Heilstedt et al. 2003a; Battaglia 2005; Redon et al. 2005; Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008). The two largest clinical series to date of individuals ascertained with monosomy 1p36 reported on 134 (Gajecka et al. 2007) and 60 subjects (Battaglia et al. 2008). Developmental delay/mental retardation (MR) of variable degree (mostly moderate to severe) and the facial appearance of individuals with 1p36 deletion syndrome constitutes the hallmark of this condition (Battaglia 2005; Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008). Language skills are commonly delayed (Gajecka et al. 2007) and expressive language is normally absent (Battaglia et al. 2008). A number of patients are able to walk independently after the age of 2 years and usually exhibit a broad-based gait but there is a majority of nonambulatory patients (Battaglia et al. 2008). The facial characteristics includes straight eyebrows, deep-set eyes, midface hypoplasia, broad and flat nasal root/bridge, long philtrum, and pointed chin (Battaglia and Shaffer 2008). Large anterior fontanel, microbrachycephaly, epicanthal folds, and posteriorly rotated, low-set, abnormal ears are also common (Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008). Behavioral disorders (particularly self-abusive behaviors), hypotonia, feeding difficulties, seizures, hearing deficits, eye/vision problems (mostly strabismus) and congenital heart defects are common referral problems in over 50% of subjects (Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008). Additional characteristic findings are cleft lip/palate, craniosynostosis, cardiomyopathy, brain abnormalities, skeletal anomalies, genitourinary malformations, renal abnormalities, hypothyroidism, short feet, brachycamptodactyly, and clinodactily (Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008; Battaglia and Shaffer 2008). Other abnormalities have been reported in a few

individuals with monosomy 1p36 (Slavotinek et al. 1999; Gajecka et al. 2007; Battaglia et al. 2008; Battaglia and Shaffer 2008). Guidelines to establish the extent of disease in an individual diagnosed with 1p36 deletion syndrome and for routine health supervision have already been depicted (Heilstedt et al. 2003a; Battaglia et al. 2008; Battaglia and Shaffer 2008).

There have been several genetic mechanisms reported to result in deletions of 1p36 and no common breakpoint or deletion size has been observed (Heilstedt et al. 2003a; Gajecka et al. 2007; Ballif et al. 2007). Instead, the breakpoint locations are found scattered over several megabases (Mb) from the telomere (Heilstedt et al. 2003a; Gajecka et al. 2007; Ballif et al. 2007). The four classes of rearrangements identified in individuals with monosomy 1p36 in order of occurrence are apparently pure/simple terminal deletions (67%), unbalanced translocations (derivative chromosomes) (16%), interstitial deletions (10%), and more complex rearrangements (7%) (Gajecka et al. 2007). One cluster of breakpoints for all four classes of rearrangements has been recently identified between 4-5 Mb from the 1p telomere (Gajecka et al. 2007). These rearrangements are usually *de novo* chromosome abnormalities and mostly maternally derived (65%) (Heilstedt et al. 2003a). A parent-of-origin effect has been described in regard to the extent of the deletion, with most maternally derived deletions being smaller than 5 Mb in size, whereas the largest deletions are among the paternally derived chromosomes (Heilstedt et al. 2003a; Gajecka et al. 2007). In approximately one-third of individuals with an unbalanced translocation, the derivative chromosome 1 results from malsegregation of a balanced parental translocation (Battaglia and Shaffer 2008).

Deletion of genes in the 1p36 critical region is the only known cause of 1p36 deletion syndrome, but no genes have been conclusively determined to be causative for any of the clinical features associated with 1p36 deletion syndrome (Battaglia and Shaffer 2008). Otherwise, a few genes within the distal end of the short arm of chromosome 1 have been implicated as potential candidates for some features, such as the *SKI* proto-oncogene and the peroxisomal biogenesis factor 10 gene (*PEX10*) (Colmenares et al. 2002), the potassium channel beta subunit gene *KCNAB2* (Heilstedt et al. 2001), the matrix metalloproteinase 23 gene (*MMP23*) (Gajecka et al. 2005), and the gamma-aminobutyric acid A receptor delta-subunit gene (*GABRD*) (Windpassinger et al. 2002). While monosomy 1p36 syndrome has long been considered a contiguous gene deletion syndrome and potential critical regions for certain clinical findings have

been elucidated (Wu et al. 1999; Heilstedt et al. 2003a), the observation of two patients with non-overlapping 1p36 deletions and similar phenotypes prompted the hypothesis that this syndrome may be due to a positional effect of the 1p36 rearrangement rather than haploinsufficiency of contiguous genes in the deleted region (Redon et al. 2005). A more recent study found no correlation between the deletion size and the number of observed clinical features in a large cohort of patients (Gajecka et al. 2007).

In monosomy 1p36 syndrome it is assumed quite a number of subjects being unrecognized or misdiagnosed due to limitations in the standard karyotype to detect rearrangements of 1p36 (Battaglia et al. 2008). A recent suggestion that the actual resolution of routine G-banding karyotype to detect subtelomeric abnormalities might be on the order of 10-15 Mb has been made (Ballif et al. 2007). For 1p, approximately 90% of the rearrangements are less than 10 Mb in size (Ballif et al. 2007). Even more specialized techniques may not be able to detect rearrangements at 1p36 due to the complexity of some deletions (Heilstedt et al. 2003a; Battaglia and Shaffer 2008). Besides, several subjects ascertained with monosomy 1p36 have been reported with mild or atypical phenotypes or presenting features that overlap with other genetic syndromes (D'Angelo et al. 2006; Neumann et al. 2004; Tan et al. 2005; Torisu et al. 2004). Some of the differential diagnosis of 1p36 deletion syndrome are Rett syndrome (RTT), Angelman syndrome (AS) and Prader-Willi syndrome (PWS) (Battaglia and Shaffer 2008). The recognition of a PWS-like phenotype between 1p36 deleted patients date back more than a decade, when two distinguishable but overlapping phenotypes was proposed for monosomy 1p36: those with growth impairment and those with obesity and physical characteristics similar to PWS (Wargowski et al. 1991; Keppler-Noreuil et al. 1995). Even if no consistent data have been found by others to support this idea of two clinically distinct subgroups in monosomy 1p36 (Shapira et al. 1997), obesity and hyperphagia are described in a proportion of patients (D'Angelo et al. 2006; Eugster et al. 1993; Neumann et al. 2004; Roberts et al. 2004; Sandlin et al. 1995) and are roughly estimated to occur in 15% (Shapira et al. 1997) and 13% (Battaglia et al. 2008), respectively.

Previously, we reported on a patient with subtelomeric deletion of 1p36 and PWS-like phenotype identified during a research for 1p36 deletion on a cohort of 41 syndromic obesity patients with a negative genetic test for PWS (D'Angelo et al. 2006). At the time, we suggested a hypothetical critical region for the manifestation of obesity and hyperphagia in patients with monosomy 1p36 to within chromosome 1p36.33-36.32

(D'Angelo et al. 2006). We have extended this study to 154 subjects and performed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis as method of screening. Four patients (three novel cases) were identified with rearrangements of 1p36. Additionally, this screening was expanded to a sample of 83 patients included in this investigation for a variety of reasons. We detected five rearrangements at 1p36 among these cases. We attempted for genotype-phenotype correlations to narrow critical regions and search for candidate genes.

Material and methods

Subjects

We divided our cohort of cases in two groups. A total of 83 subjects were investigated for rearrangements of 1p36 in the first group, and 154 subjects in the second group. The former includes patients with normal genetic studies for AS (methylation analysis and/or *UBE3A* sequence analysis) (38 cases), patients with multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) (14 cases), patients with monosomy 1p36 suspected on clinical grounds (12 cases), and patients sent for a variety of other conditions (19 cases). The last and larger group comprises patients with normal genetic studies for PWS (methylation analysis of the SNURF-SNRPN exon 1) presenting obesity and/or hyperphagia, delayed psychomotor development, hypotonia, learning disabilities and behavioral problems. Patients were referred to our laboratory by physicians of the Neurology and Genetics Unit of the Children's Institute of Hospital das Clínicas, School of Medicine, University of São Paulo. They were examined by at least one of the authors. In the syndromic obesity group, we excluded those referred for PWS testing who were too young for the manifestation of obesity and hyperphagia. In this group, the age at first observation ranged between one year and 31 years old. Five patients were below the two years of age but already obese and most were in the range of 5 to 10 (35%) and 10 to 20 (45%) years old. Informed consent was obtained for all patients from parents or legal guardians.

MLPA analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a standard salting out method or by using the Autopure LS[®] (Gentra Systems). Rearrangements of 1p36 were detected with the specifically designed set of probes for testing for 1p36 chromosomal imbalances (SALSA MLPA kit P147 1p36 deletions) or by one of two

MLPA kits: SALSA P036 Human Telomere and SALSA P064 Mental retardation 1 (MRC-Holland, www.mlpa.com). We used both P147 and P036 kits to ascertain the extent of the deletion and to distinguish a simple terminal deletion from a derivative chromosome. DNA denaturation and hybridization, ligation and PCR reactions were carried out according to the manufacturer's instructions, as described in Schouten et al. (2002). We used MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare) to perform fragment separation and MegaBACE fragment profiler software to analysis of the peaks signal intensities. Further analyses included the NGRL Manchester MLPA spreadsheets (National Genetics Reference Laboratory, NGRL, Manchester, www.ngrl.org.uk/Manchester).

FISH studies

Subtelomeric FISH was performed on metaphase chromosome preparations of cultivated peripheral blood lymphocytes from each subject. FISH probes to the 1p region included the commercially available TelVysion™ 1p SpectrumGreen (Vysis®), which contains a locus (CEB108/T7) estimated to be within 300 kb of the end of the chromosome or TEL 1p DNA probe, Green (Oncor®) also within 300 kb of the 1p telomere. Alternatively, subtelomeric FISH was performed with digoxigenin-labeled bacterial artificial chromosome (BAC) probe GS-232-B23 as already described (Shaffer et al. 1994). The Chromoprobe Multiprobe-T System (Cytocell®) was used as needed following the provided protocol. To determine whether the rearrangements were inherited or a *de novo* event we extended subtelomeric FISH studies to the parents.

Polymorphic marker analysis

To establish the parent of origin of the 1p deletion we performed analysis of five different microsatellite markers (D1S243, D1S171, D1S468, D1S2845 and D1S2660) on genomic DNA samples from the patients and their parents. Primer sequences were obtained at The Genome Database (www.gdb.org/gdb) and ordered from Invitrogen™ (www.invitrogen.com.br). PCR reactions and conditions are described elsewhere (Gajecka et al. 2006). We used MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare) to perform allele separation and MegaBACE genetic profiler software for microsatellite genotyping.

Results

Thirty-six probes spread out over 15 Mb of the 1p36 region are represented in the MLPA kit P147, whereas kit P064 (latest version) contains seven probes in the most

distal 4 Mb region and kit P036 a single subtelomeric probe. Therefore, any of these probemixes should be able to identify 1p36 chromosomal imbalances. The screening for rearrangements of 1p36 by MLPA identified nine patients with monosomy 1p36 (Table I). Five were detected among the first group of patients (subjects 140, 142, 148, D1P2, and D1P3) and four in the group with syndromic obesity (subjects 139, 141, 143, and D1P1). Throughout the MLPA screening we also detected three patients with 17p11.2 deletion and Smith-Magenis syndrome (SMS), one patient with 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2 DS) (D'Angelo et al. 2007), another patient with an unbalanced translocation [t(3;11)(3p;11q)] and an additional with a subtelomeric deletion of 2p. These other imbalances were all detected within the group of patients with syndromic obesity. Herein, we will focus on those patients with monosomy 1p36 only.

Relevant information and clinical findings from our patients with monosomy 1p36 are summarized in Tables II and III, respectively. Photographs are shown in Fig. 1. Since we performed a retrospective and prospective study, the age at evaluation differs from the age at diagnosis in some cases but not in others. Pregnancy and family history were generally unremarkable. All patients except one were born at term and most were small for gestational age. Parental ages varied broadly (from 16 to 40 years between mothers and 18 to 44 years between fathers). Four patients were referred to chromosomal analysis as possible having PWS, one patient with probable diagnose of AS and of Miller-Dieker syndrome (MDS) to another. However, methylation-specific testing had excluded the diagnosis of PWS/AS and hybridization with clone bA135N5 which covers the *LIS1* gene had been normal. Two patients were directly referred with clinical indication of monosomy 1p36 and a further had this diagnosis previously ascertained by a different Centre.

All patients exhibited global developmental delay. Head control had been acquired between 5 and 12 months of age; except one, all patients were able to sit without support (range: 8 months to 2 years) and were able to walk independently (range: ~2 years to 4 years). The speech did not occur before the age of 4 years and was mostly at the level of first word associations or limited to a few isolated words. Our cohort comprises two non-verbal patients (one at the age of 13) and two patients with complex speech abilities. These two are also the less severely affected patients. Subject 143 had been previously described with an atypical phenotype and presenting complex speech abilities and syllabic reading by the age of 13 (D'Angelo et al. 2006). Subject D1P1 is the oldest patient in our cohort (31 years old) and the only who is able to read,

write and count. She speaks using whole sentences with a vast vocabulary and has been attending a professional course. She does, however, take some time to formulate sentences and exhibit some trouble reading and pronouncing complex words. She has never had behavioral problems apart from hyperphagia (which is now controlled) and skin picking. Her facial appearance does not resemble those seen in monosomy 1p36 (Fig. 1). Similarly, facial features of subject 141 are not suggestive of this syndrome and her cognitive impairment is milder than the commonly reported, except for the speech delay. For the remaining patients, the craniofacial features and other characteristic findings are more typical. Microcephaly, short stature, fifth fingers clinodactily and hypertrichosis were common findings. Feeding difficulties in infancy, seizures, and abnormal MRI/CT were described in a proportion of patients. Abnormalities reported individually were congenital heart defect, hypothyroidism, micropenis, criptorquidism, scrotal hypoplasia, diabetes, and tooth agenesis. The most common behavioral issues were hyperphagia and skin picking and aggressive or self-injurious behavior. A body mass index (BMI) score was calculated for each subject. We used the BMI-for-age charts and cutoff points (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, www.cdc.gov) as screening tool for overweight in patients aged 2 years and older. For the only adult patient, we used fixed BMI and cut points. Four patients were overweight by the time of the first evaluation and another was at risk of overweight.

Characterization of the 1p36 deletions is given in Table IV. Upon detection of rearrangements of 1p36, four cases (subjects 139, 140, 141, 142, and 143) were chosen for additional analyses to investigate the mechanisms of chromosome breakage, repair, and stabilization mediating subtelomeric rearrangements in humans. In each case, rearrangements were further characterized by array CGH and FISH using various large-insert clones from a minimal tiling path contig of the most distal 10.5 Mb of 1p36. These analyses have been described elsewhere together with the mapping and cloning of the breakpoints (D'Angelo et al. 2009). In the same way, rearrangement of subject 148 was further characterized by array CGH and FISH as well (data not shown). Taken together, six rearrangements are simple terminal deletions, two are derivative chromosomes and one refers to a complex rearrangement with deletion, duplication and triplication of 1p36 sequences. For this later case, the copy number gain of 1p36 proximal sequences was estimated in approximately 0.2 Mb (D'Angelo et al. 2009). One unbalanced translocation is a derivative chromosome 1 $\text{der}(1)t(1;4)(p36;q35)$ (subject 143) and another is a $\text{der}(1)t(1;1)(p36;q44)$ (subject 142). The copy number

gain of 4q sequences is estimated in approximately 2 Mb and to be about 0.2 Mb for the 1q sequences. Duplicated genes at 4q include the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) region gene 1 (*FRG1*) and 2 (*FRG2*), the tubulin, beta polypeptide 4, member Q (*TUBB4Q*), and the double homeobox, 4 (*DUX4*), which is located within each D4Z4 locus, the subtelomeric polymorphic repeat array whose contraction causes FSHD. This harbors an element where specifically binds a multiprotein complex that mediates transcriptional repression of 4q35 genes (Gabellini et al. 2002). The 1q44 genes found duplicated are SH3-binding domain protein 5-like (*SH3BP5L*) and two zinc finger proteins (*ZNF672* and *ZNF692*). While no function has been attributed to the former gene, both zinc-finger genes may be involved with transcriptional regulation. All rearrangements are *de novo* events and those with established origin were maternally derived. Breakpoint locations of the deletions are unique but closely placed for six rearrangements (~2-3 Mb from the 1p telomere).

Figure 2 schematizes the different-sized deletions. We have used the “manage custom tracks” option from the UCSC to display our own annotations in the genome browser. Breakpoint-containing clones/interval and candidate genes for monosomy 1p36 are shown. All patients have in common hemizygous deletion of genes *MMP23*, *GABRD* and *SKI*. The *PEX10* gene is deleted for all but subject 139. Only subject 142 and D1P3 are deleted for gene *KCNAB2*. A total of 124 coding genes are mapped to the chromosome region shown in Fig. 2 (RefSeq records retrieved from UCSC Genome Browser using the “hide non-coding genes” option). Using data from the GO database (<http://www.geneontology.org>), Uniprot (<http://www.uniprot.org>), GeneCards (<http://www.genecards.org>), OMIM and AceView (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), we found that a proportion of these genes may be involved with nervous system development or (embryonic) multicellular organismal development, such as the family members *HES4* and *HES5* of hairy and enhancer of split (Hes) genes, the kinesin family member 1B (*KIF1B*), the leucine zipper and CTNNBIP1 domain containing (*LZIC*), the catenin, beta interacting protein 1 (*CTNNBIP1*), the chromodomain helicase DNA binding protein 5 (*CHD5*), and the dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila) (*DVLI*). We also found several genes that are potentially associated with carbohydrate or lipid metabolism or that may be involved in the insulin signaling pathway, including the glycolipid transfer protein domain containing 1 (*GLTPDI*), the calmodulin-like 6 (*CALML6*), the protein kinase C, zeta (*PRKCZ*), the phospholipase C, eta 2 (*PLCH2*),

the acyl-CoA thioesterase 7 (*ACOT7*), the solute carrier family 45, member 1 (*SLC45A1*), the enolase 1, (alpha) (*ENO1*), the solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 7 (*SLC2A7*), the solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5 (*SLC2A5*), the hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase) (*H6PD*), the phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide (*PIK3CD*), the phosphogluconate dehydrogenase (*PGD*), the FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (*FRAP1*), and the retinol binding protein 7, cellular (*RBP7*).

Table V lists coding genes mapped to the 1p36.3 region comprised between 2 to 3 Mb from the 1p telomere, where most of the breakpoints occurred. Apart two candidate genes mapped to this region (*SKI* and *PEX10*), of particular interest are *PRKCZ*, which is highly expressed in brain and is involved in the insulin signal pathway, *PLCH2*, which is a neuron-specific phospholipase C (PLC) isozyme highly expressed in neuron-enriched regions in the brain that may be important for formation and maintenance of the neuronal network in the postnatal brain and that is involved with lipid metabolic process, and *HES5*, which is involved with the Notch signaling pathway, an evolutionarily conserved intercellular signaling mechanism essential for proper embryonic development. While *PRKCZ* is deleted to all patients, *PLCH2* is mapped to the duplicated or triplicated region in subject 139, is in the normal dosage state in subject 143 and deleted for the remaining patients. Gene *HES5* is intact in subject 143 and can be either in the normal state or with an extra copy in subject 139, but deleted to all other cases (Fig. 3).

Discussion

Identification of monosomy 1p36 in a single step is strongly not recommended because of diversity in both the types and sizes of the rearrangements (Heilstedt et al. 2003a). A targeted FISH approach was suggested elsewhere (Heilstedt et al. 2003b), but array-based comparative genomic hybridization (array CGH) has emerged as a more efficient and comprehensive detection method (Ballif et al. 2007; Shaffer et al. 2007). MLPA is a novel method that allows the relative quantification of a number of targeted genomic DNA regions in one single experiment (Schouten et al. 2002). This technique has been broadly used to detect copy number alterations in various genetic disorders. We have used MLPA as method of screening for monosomy 1p36 in a group of 237 subjects. Deletions were detected by one of three commercially available kits (P147,

P064 and P036). Nine cases were confirmed as having monosomy 1p36. Molecular characterization of the deletions was accomplished by performing MLPA analysis with the specific monosomy 1p36 kit (P147) coupled to subtelomeric MLPA screening (P036). Five cases were further characterized by array CGH and FISH with various large-insert clones (D'Angelo et al. 2009). In order to assess MLPA usefulness as an alternative method for detection of rearrangements at 1p36, we evaluated its reliability by comparing the MLPA results with those from array CGH and FISH. The specific monosomy 1p36 kit precisely identified a complex rearrangement and all breakpoints. Subtelomeric MLPA screening correctly detected all deletions and a copy number gain of 1q sequences in one case. Previously, subtelomeric MLPA failed to detect a copy number gain of 4q sequences in another case (D'Angelo et al. 2006). Inability of this kit to detect one derivative chromosome in the past was because the subtelomeric 4q probe at the time was mapped far (~4 Mb) from the telomere. However, the duplication could be detected using any of the updated versions of this MLPA kit, for which a different, more distal 4q probe is contained. Therefore, since individual MLPA probes are regularly replaced to offer a reliable and robust molecular assay, we suggest the use of MLPA as an alternative to array CGH in the identification and delineation of different types of rearrangements at 1p36. Since coverage at over 15 Mb on 1p is provided by the MLPA kit P147 and of ~4 Mb by the mental retardation kit (P064), and given that ~5 Mb of subtelomeric coverage is sufficient to detect all 1p36 deletions and only 10% extend beyond 10 Mb (Ballif et al. 2007), it is expected none deletion to be missed by the use of any of these kits. However, only the specific 1p36 kit should be able to map most breakpoints. Likewise subtelomere FISH screening, subtelomeric test by MLPA does not identify the size of the imbalance and may not uncover interstitial deletions or complex rearrangements because it contains one probe for each subtelomeric region. However, the SALSA P036 human telomere test kit can be used to distinguish a terminal deletion from a derivative chromosome.

It is acknowledged that the diagnosis of monosomy 1p36 may be suggested by clinical findings, especially the characteristic facial appearance, hypotonia, psychomotor retardation, and poor/absent speech (Battaglia and Shaffer 2008). However, monosomy 1p36 has been frequently detected through the screening of individuals with mental retardation and developmental disabilities (Ballif et al. 2007; Shaffer et al. 2007), and commonly reported in individuals with atypical phenotypes or resembling other conditions (D'Angelo et al. 2006; Heilstedt et al. 2003b; Neumann et

al. 2004; Tan et al. 2005). For this research, we divided our sample in 83 patients sent to investigate a variety of conditions, and 154 obese and hyperphagic, PWS negative patients. Of nine patients detected with deletions, three had the diagnosis of monosomy 1p36 primarily suspected on clinical evaluation, two had been previously tested for AS or MDS and four other cases for PWS. Both AS and PWS are differential diagnosis of monosomy 1p36 (Battaglia and Shaffer 2008). Regardless the clinical indications, the diagnosis of monosomy 1p36 would have been suggested in a proportion of our cases if we consider the facial appearance, the pattern of malformation and neurodevelopmental disabilities. However, the specificity of certain features in some diseases, such as lissencephaly in MDS, may confound the clinical indication for testing specifically for monosomy 1p36, which is otherwise not related to any distinguishable characteristic. On those three patients specifically referred to investigate monosomy 1p36, the craniofacial features, seizures and the presence of a major malformation, such as a structural heart defect (aortic valve stenosis) or central nervous system defect (craniosynostosis) were of utmost importance to suggest the diagnosis. An additional three cases were considered as having an atypical or mild phenotype, presenting obesity and hyperphagia, a facial gestalt not indicative of monosomy 1p36 and a cognitive impairment milder than the commonly reported. Considering the relevant clinical findings for the diagnosis of monosomy 1p36, these patients would be missed from our attention. One, in particular, is the oldest patient in our cohort and the less severely affected patient, to our knowledge, reported in the literature. Although the neonatal period had been marked by severe hypotonia and developmental delay, she retains the ability for complex speech and has developed reading, writing and counting skills. At the age of 31 years she has been attending a professional course and working out in a gym. Recently, Battaglia et al. (2008) made an observation of a clear improvement for patients with monosomy 1p36 in relation to their gross and fine motor abilities, adaptive behavior, and social interaction over time.

In spite of the variability reported in both clinical presentation and deletion size in monosomy 1p36, no consistent data has been found to support an underlying contiguous gene deletion syndrome (Gajecka et al. 2007), and a position effect has been suggested (Redon et al. 2005). Otherwise, most of the genes responsible might be at the distal end of the chromosome, while additional proximally placed genes would be causative or modifiers of certain features (Gajecka et al. 2007). A few genes have been implicated as potential candidates for some characteristics (Colmenares et al. 2002;

Gajecka et al. 2005; Heilstedt et al. 2001; Windpassinger et al. 2002). Herein, we detected different sized deletions (~2 to 10 Mb) that included mostly simple terminal deletions, two derivative chromosomes and a complex rearrangement. We did, however, observed one cluster of breakpoints for six cases between ~2-3 Mb from the telomere. These included patients exhibiting either typical or atypical/mild phenotypes, whereas larger deletions (~3.5 - 10 Mb) were observed on those patients presenting the typical phenotype only. Interestingly, all the breakpoints of the deletions detected within the syndromic obesity group were mapped within this interval. Deletion of the proto-oncogene *SKI* is a probable cause of cleft lip/palate in monosomy 1p36 and is likely under influence of modifier gene(s) (Colmenares et al. 2002). Despite deletion of *SKI* to all our patients, none had cleft lip/palate. Expression of *MMP23* gene may play a role in regulating closure of the fontanels and its duplication/triplication is possible associated with craniosynostosis (Gajecka et al. 2005). One patient in our cohort had craniosynostosis, but a deletion instead of duplication or triplication of *MMP23A/B*. Recently, Chen et al. (2008) reported on a patient with a duplication of 1p36 encompassing these genes who did not have craniosynostosis. Therefore, overexpression of *MMP23A/B* genes may indeed not be sufficient for craniosynostosis. The *GABRD* gene is a candidate for epilepsy and the neuropsychiatry and neurodevelopmental disabilities seen in monosomy 1p36 (Windpassinger et al. 2002). Deletion of *PEX10* and *KCNAB2* genes may also be responsible for seizures or other features of 1p36 deletion syndrome (Colmenares et al. 2002; Heilstedt et al. 2001; Kurosawa et al. 2005). All of our patients were deleted for *GABRD*, all but one to *PEX10* (the exception refers to a patient with duplication or triplication of this gene), and only two for *KCNAB2*. The two patients with *KCNAB2* deletion had seizures as well as the patient with *PEX10* duplication/triplication. However, an additional two patients also manifested this phenotype. In the view of the fact that *GABRD* is mapped to the very distal portion of 1p36, we suggest this gene to be a more suitable candidate gene for seizures in patients with monosomy 1p36.

Other than that, we found a number of genes in the distal portion of ~10 Mb of the short arm of chromosome 1 that might be involved with nervous system or multicellular organismal development and an even higher number of genes potentially associated with carbohydrate or lipid metabolism or likely involved in the insulin signaling pathway. Some of these genes may be implicated in the monosomy 1p36 phenotype through a mechanism of haploinsufficiency or position effect or gene

interactions (epistasis). Since patients exhibiting mild/atypical phenotypes and obesity and hyperphagia had the breakpoints of the deletions occurring exclusively within the common ~2-3 Mb breakpoint clustering, we searched for potential candidate genes in this interval. Apart two previously known candidate genes (*SKI* and *PEX10*), we drawn attention to three genes mapped to this region: *PRKCZ*, *PLCH2*, and *HES5*. Recently, Fitzgibbon et al. (2008), based on the expression of *PLCH2* gene in cerebral cortex, speculated on a possible association between *PLCH2* deletion and learning difficulties, developmental delay and speech delay in a patient with complex rearrangement of 1p36. A brain-specific isoform of PKC-zeta, PKM-zeta, is persistently active and required for maintenance of long-term potentiation (LTP) and spatial memory in the hippocampus (Sacktor et al. 1993). Recently, Shema et al. (2007) found that in the rat cortex, long-term associative memories vanished rapidly after local application of an inhibitor of PKM-zeta, and thus, persistent phosphorylation by this protein kinase C isoform would be critical for storage of long-term memory in cortex. Also recently, Zhang et al. (2007) demonstrated that Pkc-zeta is a downstream mediator of Dvl1 in promoting axon differentiation in rat isolated hippocampal neurons. On the other hand, Hes5 is a downstream target of Notch and together with Hes1 plays a pivotal role in the regulation of mammalian neuronal differentiation, by controlling the timing for differentiation of neural progenitor cells during neurogenesis (Ohtsuka et al. 1999). In double-mutant mice for these genes, neural stem cells are not properly maintained and prematurely differentiated into early-born types of neurons only, without giving rise to later-born cell types that are required for the maintenance of the CNS structures at later stages. Therefore, since each of these genes are somewhat implicated with neural development or maintenance, it is possible that altered expression of these genes might compromise normal nervous system function. Besides, *PRKCZ* is a gene in the insulin signaling pathway and *PLCH2* is involved with lipid metabolic process. The former is a downstream of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and play important roles in insulin-stimulated glucose transport, which is defective in type 2 diabetes mellitus and obesity (Bandyopadhyay et al. 2002). Changes in the expression of genes involved in glucose and lipid metabolism or the impact of a disease susceptibility gene variant might contribute to the development of obesity in monosomy 1p36 syndrome.

With regard to genotype-phenotype correlations in monosomy 1p36, it is apparent from our work that larger deletions are most likely to be associated with a typical phenotype, while smaller deletions can be either related to a typical phenotype as

to atypical/mild phenotypes. Here we found the region between 2-3 Mb from the end of the short arm of chromosome 1 to be critical for this spectrum of clinical phenotypes and for the manifestation of obesity and hyperphagia. However, this phenotypic range in monosomy 1p36 cannot be explained solely by dosage of genes within this region, neither obesity nor hyperphagia.

In conclusion, we have shown that MLPA is an attractive alternative method for high-throughput detection and delineation of rearrangements at 1p36. This is important as for monosomy 1p36 most abnormalities are under the resolution provided by routine G-banding, and MLPA could be used as a stand-alone test for monosomy 1p36 instead of array CGH. However, high resolution array CGH is more suitable for fine mapping of the breakpoints, which might be needed to investigate mechanisms of chromosome rearrangements. Our work reinforces the association between monosomy 1p36 and obesity and hyperphagia, and further suggests that these features might be associated with an atypical/mild phenotype in addition to a deletion size of ~2 to 3 Mb. Important nervous system genes and glucose or lipid metabolism genes are mapped to this region as to the entire distal portion of the short arm of chromosome 1. Monosomy 1p36 is unlikely to be a simple contiguous gene deletion syndrome, and given the diverse category of rearrangements it is conceivable that telomeric position effect (TPE) might play a role in the disease as a result of repositioning of active genes near telomeres or subtelomeres sequences following such chromosome rearrangements.

Acknowledgments

This work was supported by The State of São Paulo Research Foundation, FAPESP [04/10380-6 to C.S.D.]; Centers for Research, Innovation and Diffusion, CEPID [1998/14254-2]; and The National Council for Scientific and Technological Development, CNPq [304381/2007-1 to C.P.K.]. We thank Dr. Angela M. V. Morgante, who collaborated with this work, Roseli Zanellato for technical assistance, and the families for participating in the study.

Conflict of interest statement: None declared.

References

- 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 Part A* 143A:1850-1857.
- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12:2153-2165.
- Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Standaert ML, Lea-Currie R, Sen A, Farese RV (2002) Protein kinase C- ζ mediates insulin effects on glucose transport in cultured pre-adipocyte-derived human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:716-723.
- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, Zuberi SM, Carey JC (2008) Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 121:404-410.
- Battaglia A (2005) Del 1p36 syndrome: A newly emerging clinical entity. *Brain Dev* 27(5):358-361.
- Battaglia A, Shaffer LG (2008) 1p36 deletion syndrome (Monosomy 1p36 Syndrome). In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2009. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [March 25, 2009].
- Chen E, Obolensky E, Rauhen KA, Shaffer LG, Li X (2008) Cytogenetic and array CGH characterization of de novo 1p36 duplications and deletion in a patient with congenital cataracts, hearing loss, choanal atresia, and mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 146A(21):2785-2790.
- Colmenares C, Heilstedt HA, Shaffer LG, Schwartz S, Berk M, Murray JC, Stavnezer E (2002) Loss of the SKI proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain dependent defects in Ski $-/-$ mice. *Nat Genet* 30:106-109.
- D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CIE, Varela MC, Koiffmann CP (2006) Prader-willi-like phenotype: Investigation of 1p36 deletion in 41 patients with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. *Eur J Med Genet* 49(6):451-460.

- D'Angelo CS, Jehee FS, Koiffmann CP (2007) An inherited atypical 1 Mb 22q11.2 deletion within the DGS/VCFS 3 Mb region in a child with obesity and aggressive behavior. *Am J Med Genet Part A* 143A:1928-1932.
- D'Angelo CS, GajECKA M, Kim CA, Gentles AJ, Glotzbach CD, Shaffer LG, Koiffmann CP (2009) Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements. *Hum Genet* (doi:10.1007/s00439-009-0650-9).
- Eugster EA, Berry SA, Hirsch B (1997) Mosaicism for deletion 1p36.33 in a patient with obesity and hyperphagia. *Am J Med Genet* 70:409-412.
- Fitzgibbon GJ, Clayton-Smith J, Banka S, Hamilton SJ, Needham MM, Dore JK, Miller JT, Pawson GD, Gaunt L (2008) Array comparative genomic hybridisation-based identification of two imbalances of chromosome 1p in a 9-year-old girl with a monosomy 1p36 related phenotype and a family history of learning difficulties: a case report. *J Med Case Reports* 2:355.
- Gabellini D, Green MR, Tupler R (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110:339-348.
- GajECKA M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:346-356.
- GajECKA M, Glotzbach CD, Jarmuz M, Ballif BC, Shaffer LG (2006) Identification of cryptic imbalance in phenotypically normal and abnormal translocation carriers. *Eur J Hum Genet* 14:1255-1262.
- GajECKA M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen 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.
- 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.

- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet* 64:310-316. (b)
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003) Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1200-1212. (a)
- Kepler-Noreuil KM, Carrol AJ, Finley WH, Rutledge SL (1995) Chromosome 1p terminal deletion: Report of new findings and confirmation of two characteristic phenotypes. *J Med Genet* 32(8):619-622.
- Knight-Jones E, Knight S, Heussler H, Regan R, Flint J, Martin K (2000) Neurodevelopmental profile of a new dysmorphic syndrome associated with submicroscopic partial deletion of 1p36.3. *Dev Med Child Neurol* 42:201-206.
- Kurosawa K, Kawame H, Okamoto N, Ochiai Y, Akatsuka A, Kobayashi M, Shimohira M, Mizuno S, Wada K, Fukushima Y, Kawawaki H, Yamamoto T, Masuno M, Imaizumi K, Kuroki Y (2005) Epilepsy and neurological findings in 11 individuals with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev* 27:378-382.
- Neumann BLM, Polster T, Spantzel T, Bartsch O (2004) Unexpected death of a 12-year-old boy with monosomy 1p36. *Genet Counsel* 15(1):19-26.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1999) *Hes1* and *Hes5* as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18:2196-2207.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL (2006) Subtelomere FISH, analysis of 11,688 cases: An evaluation of the frequency, pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478-489.
- Redon R, Rio M, Gregory SG, Cooper RA, Fiegler H, Sanlaville D, Banerjee R, Scott C, Carr P, Langford C, Cormier-Daire V, Munnich A, Carter NP, Colleaux L (2005) Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or "deletion with positional effect" syndrome? *J Med Genet* 42:166-171.
- Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O, Cormier-Daire V, Amiel J, Lyonnet S, Le Merrer M, De Blois M.-C., Prieur M, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L (2004) Automated fluorescent genotyping detects 10% of

- cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet* 39:266–270.
- Roberts AE, Cox GF, Kimonis V, Lamb A, Irons M (2004) Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature. *Am J Med Genet* 128A(4):352–363.
- Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E (1993) Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Nat Acad Sci* 90:8342-8346.
- Sandlin CJ, Dodd BS, Dumars KW, Bartley JA, Bernstein R, Lamb A (1995) Phenotypes associated with terminal deletion of the short arm of chromosome 1. *Am J Hum Genet Suppl* 57:A125.
- 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:e57.
- Shaffer LG, McCaskill C, Han JY, Choo KH, Cutillo DM, Donnenfeld AE, Weiss L, Van Dyke DL (1994) Molecular characterization of de novo secondary trisomy 13. *Am J Hum Genet* 55:968–974.
- 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.
- 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.
- Shema R, Sacktor TC, Dudai Y (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317:951-953.
- Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK (1999) Monosomy 1p36. *J Med Genet* 36(9):657-663.
- Tan TY, Bankier A, Slater HR, Northrop EL, Zacharin M, Savarirayan R (2005) A patient with monosomy 1p36, atypical features and phenotypic similarities with cantu syndrome. *Am J Med Gen* 139A(3):216-220.
- Toritsu H, Yamamoto T, Fujiwaki T, Kadota M, Oshimura M, Kurosawa K, Akaboshi S, Oka A (2004) Girl with monosomy 1p36 and Angelman syndrome due to

- unbalanced der(1) transmission of a maternal translocation t(1;15)(p36.3.3;q13.1). *Am J Med Genet* 131A:94–98.
- Wargowski D, Sekhon G, Laxova R, Thompson K, Kent C (1991) Terminal deletions of band 1p36: emergence of two overlapping phenotypes. *Am J Hum Genet Suppl* 49:278.
- 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.
- Wu Y, Heilstedt HA, Bedell JA, May KM, Starkey DE, McPherson JD, et al. (1999) Molecular refinement of the 1p36 deletion syndrome reveals size diversity and a preponderance of maternally derived deletions. *Hum Mol Genet* 8(2):313-321.
- Zenker M, Rittinger O, Grosse K-P, Speicher MR, Kraus J, Rauch A, Trautmann U (2002) Monosomy 1p36-a recently delineated, clinically recognizable syndrome. *Clin Dysmorphol* 11:43–48.
- Zhang X, Zhu J, Yang G-Y, Wang Q-J, Qian L, Chen Y-M, Chen F, Tao Y, Hu H-S, Wang T, Luo Z-G (2007) Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nature Cell Biol* 9:743-754.

Legend to Figures

Fig. 1: Photographs of our patients with deletions of 1p36: subject 139, female aged 4 years old; subject 140, male at ages 6 and 13, respectively; subject 141, female at age 8 years; subject 142, male aged 7 years old; subject 143, female aged 12 years old; subject 148, male at age 6 years; subjects D1P1, D1P2 and D1P3, females at ages 31 years, 1 year, and 1 year, 5 months, respectively. Note the typical facial appearance (deep-set eyes, flat nasal bridge and pointed chin) in a number of subjects (139, 142, and 148). A full body photo of each patient with risk of or with overweight is also shown.

Fig. 2: UCSC genome browser with our annotation data. On the top, the black bars identify the extent of the deletion in each subject. The breakpoint-containing clones or the clones in the boundaries of the breakpoint intervals are given below. Only the known candidate genes for monosomy 1p36 are also shown on the bottom.

Fig. 3: State for each patient of the coding genes within the breakpoint cluster comprised between 2 to 3 Mb from the 1p telomere. Only the characterized genes are shown. Empty boxes denote deleted genes and black boxes, intact genes. Gray boxes indicate duplicated or triplicated genes and dashed vertical boxes, partially deleted genes. Dark horizontal boxes designate (partially) duplicated/triplicated or intact, non-deleted genes.

Table I: MLPA screening results

<i>Cohort</i>	<i>Number of patients investigated</i>	<i>Number of detected anomalies</i>	<i>Chromosomal imbalances description</i>
First group	83	5	
AS negative	38	1	del 1p36 (subject 140)
MCA/MR	14	0	--
Possibly 1p36 deletion	12	3	del 1p36 (subject 142)* del 1p36 (subject 148) del 1p36 (subject D1P2)
Other conditions	19	1	del 1p36 (subject D1P3)
Second group	154	10	
Syndromic obesity	154	10	del 1p36 (subject 139) del 1p36 (subject 141) del 1p36 (subject 143) [†] del 1p36 (subject D1P1) del 17q11.2 (subject SMS1) del 17q11.2 (subject SMS2) del 17q11.2 (subject SMS3) del 22q11.2 (subject DG1) del 3p, dup11q (subject SB1) del 2p (subject SB2)

*Subject 142 was already referred with the diagnosis of monosomy 1p36 given by another Centre;

[†]Subject 143 was previously referred to as patient 41 (D'Angelo et al. 2006).

Table II: Relevant information on our patients with 1p36 monosomy.

Subjects	139	140	141[†]	142	143	148	D1P1	D1P2	D1P3
<i>Age at evaluation (years, months)</i>	4y, 5m	6y, 9m	8y, 6m	7y, 4m	12y, 2m		31y, 5m		1y, 5m
<i>Referred to investigate</i>	PWS	AS	PWS	Del 1p36	PWS	Del 1p36	PWS	Del 1p36	Miller-Dieker
<i>Age at diagnosis (years)</i>	8	13	12	NI	13	4	31	1	5
<i>Maternal age (years)</i>	24	21	16	29	19		NI		40
<i>Paternal age (years)</i>	26	26	21	44	18		NI		43
<i>Birth weight (g)</i>	2510 (3<p<10)	2500 (3<p<10)	1900 ¹	2600 (3<p<10)	2350 (<p3)		2130 (<p3)		2880 (75<p<90)
<i>Birth length (cm)</i>	46 (3<p<10)	NI	42.5 ¹	43 (<p3)	45 (p3)		44 (<p3)		NI
<i>Neck support (months)</i>	6	5	6	8	6		12		NI
<i>Sitting without support (months)</i>	10	12	8	12	12		24		Absent*
<i>Independent gait (years, months)</i>	~3y	2y, 6m	~3y	~4y	2y, 2m		2y, 6m		Absent*
<i>Speech (years, months)</i>	~4y	Absent*	~7y	~7y	4y, 6m		~5y		Absent*
<i>OFC-for-age percentiles (cm)</i>	47 (<p2)	51 (2<p<50)	48.5 (p2)	48 (<p2)	53 (p50)	(<p3)	53 (2<p<50)		42.5 (<p3)
<i>Length-for-age percentiles² (cm)</i>	99 (10<p<25)	106 (<p3)	130 (p50)	110 (<p3)	152 (75<p<90)	(<p3)	150 (<p3)		75 (3<p<10)
<i>Weight-for-age percentiles (kg)</i>	20.5 (75<p<90)	23 (p50)	37.5 (90<p<97)	18 (<p3)	56 (>p97)	(10<p<25)	64 kg (50<p<75)		NI
<i>BMI-for-age percentiles</i>	>p95 (overweight)	>p95 (overweight)	>p95 (overweight)	25<p<50 (normal)	90<p<95 (risk of overweight)		28.4 (overweight)		--

OFC, occipitofrontal circumference; BMI, body mass index; NI, not informed. We used the CDC growth charts (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, www.cdc.gov); [†]Gestational age of 36 weeks; *By the age of 13 years (subject 140) and by the time of first evaluation (subject D1P3).

Table III: Major phenotypic characteristics in our patients

<i>Subjects</i>	<i>Clinical features</i>	<i>Category</i>	<i>Behavior</i>
139	Asymmetry, brachycephaly, asymmetric and posteriorly rotated ears, synophrys, downslanting palpebral fissures, deep-set eyes, flat nasal bridge, pointed chin, fifth fingers clinodactily.	Developmental delay, hypotonia, feeding difficulties (poor suck), motor and speech delay (limited to a few isolated words), seizures (onset at 3 months of age).	Hyperphagia, higher pain threshold, skin picking, hyperactivity, aggressive and self-injurious behavior.
140	Brachycephaly, posteriorly rotated ears, synophrys, downslanting palpebral fissures, deep-set eyes, strabismus, pointed chin, micropenis, criptorquidism, fifth fingers clinodactily. MRI: multifocal hyperintensity areas in the white matter.	Developmental delay, hypotonia, motor and speech delay (absent), seizures (onset at 5 years of age).	Hyperphagia, hyperactivity, self-injurious behavior, ataxia of gait and tremulous movement of limbs
141	Synophrys, upslanting palpebral fissures, almond shaped eyes, strabismus, long philtrum, short hands and feet, fifth fingers clinodactily.	Developmental delay, hypotonia, motor and speech delay (at the level of first word associations), feeding difficulties (gastroesophageal reflux, vomiting).	Hyperphagia, higher pain threshold, hyperactivity, skin picking, tantrums, stubbornness, OCD.
142	Asymmetry, brachycephaly, low-set ears, synophrys, epicanthus, deep-set eyes, flat nasal bridge, pointed chin, prognathism, short hands and feet. Congenital aortic valve stenosis, hypothyroidism.	Developmental delay, hypotonia, motor and speech delay (limited to a few isolated words), seizures (onset at 30 days of age).	Hyperactivity, aggressive and self-injurious behavior.
143	Congenital bilateral cataract, posteriorly rotated ears, synophrys, slightly deep-set eyes, downslanting palpebral fissures, myopia and astigmatism, fifth fingers clinodactily. Advanced	Developmental delay, hypotonia, motor and speech delay (expressive language acquired).	Hyperphagia, skin picking, ADHD.

bone age; hypercholesterolemia and diabetes (onset at 13 years of age). Thyroid US: nodules

148 Downslanting palpebral fissures, flat nasal bridge, pointed chin, short hands, fifth fingers clinodactily, scrotal hypoplasia. MRI: craniosynostosis (turricephaly)

D1P1 Synophrys, slightly deep-set eyes, short palpebral fissures, short philtrum, pointed chin, fifth fingers clinodactily, short hands and feet. Missing the four canine teeth; hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Developmental delay, hypotonia, motor and speech delay (expressive language acquired), feeding difficulties (poor suck). Hyperphagia, skin picking

D1P2 Seizures

D1P3 Asymmetry, brachycephaly, dysplastic ears, epicanthus, strabismus. MRI + CT: lissencephaly. Developmental delay, hypotonia, seizures. NI

OCD, obsessive compulsive disorder; ADHD, attention-deficit hyperactivity disorder; NI, not informed.

Table IV: Characterization of the 1p36 rearrangements.

Subjects	MLPA		FISH		Parent of origin*	Deletion size (Mb)	BP containing clone/interval	Rearrangement category
	P036	P147	Subtelomere	Multiprobe				
139 [†]	Del 1p	Del of 11 probes Dup of 1 probe Trip of 1 probe	Del 1p		N.I	2.2	RP11-181G12	Complex deletion
140 [†]	Del 1p	Del of 14 probes	Del 1p		MAT	2.6	RP13-436F16	Simple terminal deletion
141 [†]	Del 1p	Del of 14 probes	Del 1p		MAT	2.5	RP13-436F16	Simple terminal deletion
142 [†]	Del 1p Dup 1q	Del of 21 probes	Del 1p	t(1p;1q)	MAT	6.7	RP11-242F24	Derivative chromosome [t(1p;1q)]
143 [†]	Del 1p	Del of 12 probes	Del 1p		N.I	2.3	RP4-740C4	Derivative chromosome [t(1p;4q)]
148	Del 1p	Del of 14 probes	Del 1p		MAT	2.4-2.5	RP3-395M20	Simple terminal deletion
D1P1	Del 1p	Del of 17 probes	Del 1p		N.D	3.5-3.7	RP5-1092A11(-) RP13-531C17 (+)	Simple terminal deletion
D1P2	Del 1p	Del of 14 probes	Del 1p		N.D	2.4-2.9	RP3-395M20 (-) RP11-333E3 (+)	Simple terminal deletion
D1P3	Del 1p	Del of 25 probes	Del 1p		N.D	8.3-10.2	RP11-141M15 (-) RP11-874A11 (+)	Simple terminal deletion

N.I, non informative; N.D, not determined; BP, breakpoint; (-), deleted; (+), intact.

*On the basis of the microsatellite analysis; [†]Further characterization and breakpoint mapping of these rearrangements have been described elsewhere (D'Angelo et al. 2009).

Table V: Known genes mapped in 1p36.3 and located between 2-3 Mb from the 1p telomere.

Gene symbol	Full gene name	Function
PRKCZ	Protein kinase c, zeta form	PKC family members are involved in a variety of cellular processes such as proliferation, differentiation and secretion. Plays an important role in insulin-stimulated glucose transport and may be associated with type II diabetes. Exhibits expression in brain, and to a lesser extent in lung, kidney and testis. PKM-zeta is a brain-specific isoform of PKC-zeta that plays a role in memories processes and may be associated with a variety of Alzheimer's disease pathology. Proposed to participate in pathways (Insulin signaling pathway, Phosphoinositides and their downstream targets, Tight junction) and processes (anti-apoptosis, protein amino acid phosphorylation, intracellular signaling cascade, microtubule cytoskeleton organization and biogenesis).
C1orf86*	Uncharacterized	Uncharacterized. Proteins are expected to localize in various compartments (extracellular, mitochondrion, nucleus).
SKI	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)	Component of the TGFB1 signaling pathway. Involved in neural tube development and muscle differentiation. Depending on the genetic background, the penetrance and expressivity of the Ski ^{-/-} mice phenotype changes, with the principal change involving a switch from a neural tube defect to midline facial clefting. Other defects, including depressed nasal bridge, eye abnormalities, skeletal muscle defects, and digit abnormalities resemble some of the features observed in individuals with 1p36 deletion syndrome [†] . Proposed to participate in processes (cell differentiation, embryonic limb morphogenesis).
MORN1	MORN repeat containing 1	Uncharacterized. Proteins are expected to localize in various compartments (cytoplasm, extracellular, mitochondrion)
RER1	RER1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Involved in the retrieval of endoplasmic reticulum membrane proteins from the early Golgi compartment. Proposed to participate in a process (retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER)
PEX10	Peroxisomal biogenesis factor 10	Involved in import of peroxisomal matrix proteins. Somewhat implicated in the biogenesis of peroxisomes. Mutations in this gene result in phenotypes within the Zellweger spectrum of peroxisomal biogenesis disorders, ranging from neonatal adrenoleukodystrophy to Zellweger syndrome. Mutations in many of the PEX genes cause a spectrum of human developmental disorders whose symptoms overlap with those in monosomy 1p36, including seizures, hypotonia, mental retardation and prominent broad forehead [†] . Proposed to participate in processes (peroxisome organization and biogenesis, protein import into peroxisome matrix).
PLCH2	Phospholipase C, eta 2	A neuron-specific phospholipase C (PLC) isozyme that is highly expressed in neuron-enriched regions in the brain, suggesting a particular involvement in the regulation of neural or neuroendocrine systems. It may be important for the formation and/or maintenance of the neuronal network in the postnatal brain. Proposed to participate in processes (intracellular signaling cascade, lipid catabolic process, lipid metabolic process, lipid metabolism, signal transduction)
PANK4	Pantothenate kinase 4	Pantothenate kinase (PANK) is a key regulatory enzyme in the biosynthesis of coenzyme A (CoA). This family member is most abundant in muscle but is expressed in all tissues and plays a role in the physiological regulation of the intracellular CoA concentration. Proposed to participate in pathway (Pantothenate and CoA

MLPA screening for monosomy 1p36 and a critical region for obesity

HES5	Hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	biosynthesis) and a process (coenzyme A biosynthetic process). Hes genes are mammalian homologues of Drosophila hairy and Enhancer of split and play an essential role in neural development by regulating proliferation, differentiation and specification of neural stem cells. The HES5 protein is activated downstream of the Notch pathway and regulates cell differentiation in multiple tissues. Disruptions in the normal expression of this gene have been associated with developmental diseases and cancer. Proposed to participate in pathway (Notch signaling pathway) and processes (auditory receptor cell differentiation, auditory receptor cell fate determination, cell adhesion, cell maturation, multicellular organismal development, negative regulation of neuron differentiation, nervous system development, regulation of transcription, DNA-dependent).
TNFSRF14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	A member of the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This protein has been shown to stimulate the proliferation of T cells, and trigger apoptosis of various tumor cells. This protein is also reported to prevent tumor necrosis factor alpha mediated apoptosis in primary hepatocyte. It is widely expressed, with the highest expression in lung, spleen and thymus. Proposed to participate in pathway (Cytokine-cytokine receptor interaction) and processes (cell surface, receptor linked signal transduction, immune response, apoptosis, negative regulation of alpha-beta T cell proliferation, positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation).
C1orf93*	Uncharacterized	Uncharacterized. Proteins are expected to localize in cytoplasm.
MMEL1	Membrane metallo-endopeptidase-like 1	A member of the neutral endopeptidase (NEP) or membrane metallo-endopeptidase (MME) family, which play important roles in pain perception, arterial pressure regulation, phosphate metabolism and homeostasis. This protein is a type II transmembrane protein that is expressed mainly in testis and may be involved in sperm function, possibly by modulating the processes of fertilization and early embryonic development. Proposed to participate in a process (proteolysis).
ACTRT2	actin-related protein T2	Belongs to the actin family. This protein may be involved in cytoskeletal organization similar to other cytoplasmic actin-related protein (ARP) subfamily members and presents specific synthesis in the testis, late in spermatid differentiation, and its localization in the calyx. Proteins are expected to have molecular functions (protein binding, structural molecule activity) and to localize in cytoskeleton.
PRDM16	PR domain containing 16	A zinc finger transcription factor that contains an N-terminal PR domain and may be involved in transcriptional regulation. The reciprocal translocation t(1;3)(p36;q21) that occurs in a subset of myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), results in the overexpression of a truncated version of this protein that lacks the PR domain, which may play an important role in the pathogenesis of both diseases. Proposed to participate in a process (regulation of transcription, DNA-dependent).

All information was derived from Online Mendelian Inheritance In Man (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) and GeneCards (www.genecards.org).

Those genes marked with (*) do not have Human Genome Organisation (HUGO) assigned gene names; [†]Colmenares et al. (2001).

Figure 1

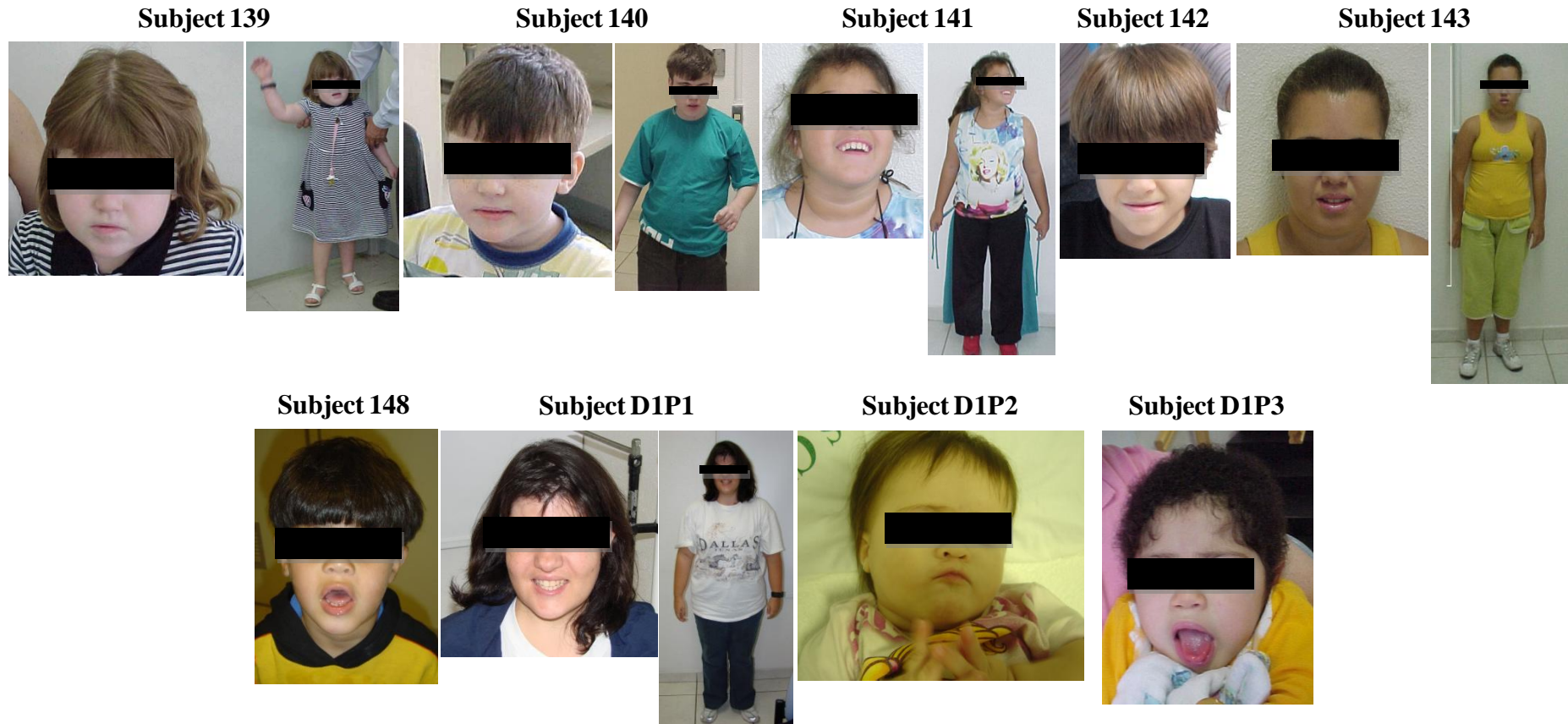


Figure 2

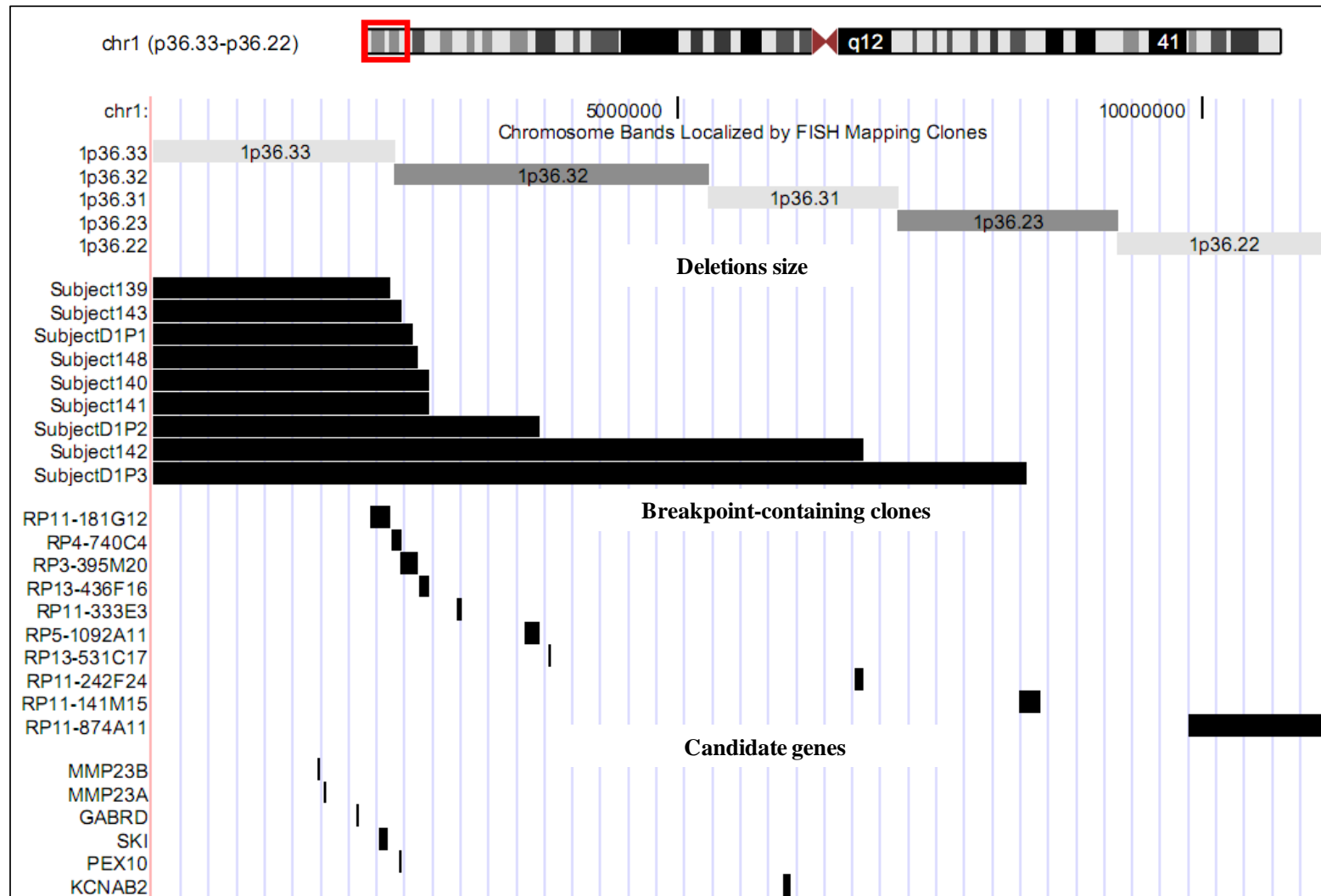
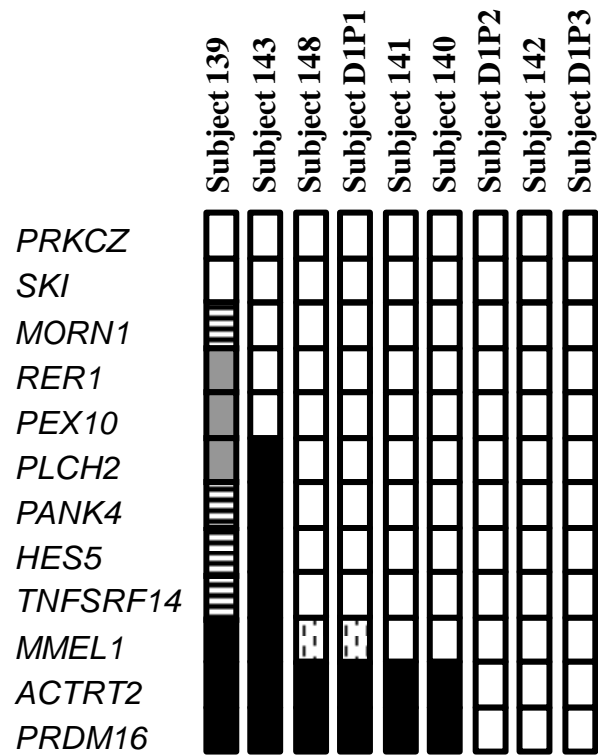


Figure 3



An Inherited Atypical 1 Mb 22q11.2 Deletion Within the DGS/VCFS 3 Mb Region in a Child With Obesity and Aggressive Behavior.

Carla S. D'Angelo¹, Fernanda S. Jehee¹, Célia P. Koiffmann^{1*}.

¹Bioscience Institute, Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Short title: atypical 22q11.2 deletion

*Correspondence to: Célia Prizskulnik Koiffmann, PhD, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – IB/USP, Rua do Matão, 277, sala 204/209 CEP 05422-970, São Paulo, SP – Brazil. E-mail: cpkoiffm@ib.usp.br; cdangelo@ib.usp.br.

Telephone: +55 11 3091 7582

Fax: +55 11 3091 7553

Research Letter

*Published in The American Journal of Medical Genetics Part A
143A:1928–1932 (2007)*

Research Letter**An Inherited Atypical 1 Mb 22q11.2 Deletion Within the DGS/VCFS 3 Mb Region in a Child With Obesity and Aggressive Behavior**

Carla S. D'Angelo, Fernanda S. Jehee, and Célia Priszkulnik Koiffmann*

Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 18 December 2006; Accepted 27 February 2007

How to cite this article: D'Angelo CS, Jehee FS, Koiffmann CP. 2007. An inherited atypical 1 Mb 22q11.2 deletion within the DGS/VCFS 3 Mb region in a child with obesity and aggressive behavior. *Am J Med Genet Part A* 143A:1928–1932.

To the Editor:

The DiGeorge, Velocardiofacial, and Conotruncal Anomaly Face syndromes (DGS/VCFS/CTAF) are known collectively as the 22q11.2 deletion syndrome (22q11 DS) [Shaikh et al., 2000; Swillen et al., 2000]. Although most individuals have the same large 3 Mb 22q11.2 de novo deletion, a recurrent 1.5–2 Mb proximally nested deletion is more common in familial cases of 22q11.2 DS [Iascone et al., 2002; Adeyinka et al., 2004; Fernandez et al., 2005]. Atypical smaller or uniquely placed deletions have been described in only a few patients [Kurahashi et al., 1996, 1997; Amati et al., 1999; Shaikh et al., 2000; Garcia-Minaur et al., 2002; Rauch et al., 2005]. We report on a rare 1 Mb 22q11.2 deletion in a female patient with obesity, hyperphagia, and aggressive behavior, and in her mother who had a major depressive disorder. The deletion was identified serendipitously in the proband during a microdeletion screening for syndromic obesity and was limited to the most telomeric region of the 3 Mb typically deleted region.

The patient (Fig. 1) was the first child of non-consanguineous parents with an unremarkable family history. Decreased fetal movement was reported. She was delivered at term by caesarean. Apgar scores were 8 and 9 at 1 and 5 min, respectively. The birth weight was 2.9 kg (~25th centile), length 48 cm (~10th centile), and the OFC 34 cm (~25th centile). Neonatal jaundice was treated with phototherapy. The sucking reflex was present, but she fed with difficulty until 1 year of age when gastroesophageal reflux was diagnosed. Delayed closure of anterior fontanel was reported. She walked independently at 1 year and 4 months. On examination at 4 years of age, the OFC was 52 cm (50–98th centile), height

was 101 cm (25–50th centile), and weight was 27 kg (>97th centile). She had a narrow forehead, synophrys, upslanted palpebral fissures, deep-set eyes, divergent strabismus of the right eye, small mouth and thin lips, high-arched palate, short philtrum, retrognathia, small hands, and *pes planus*. Her problems included speech articulation, sleep difficulties, hyperphagia, decreased sensitivity to pain, hyperactivity, and aggressive behavior, such as beating strangers, and self-injurious behaviors including head banging, biting, hair pulling, and skin picking. When re-evaluated at age 8 years, there were no significant changes. Compulsive food eating and behavioral problems had worsened. She weighed 67 kg (>97th centile) with truncal obesity, and height was 130 cm (50–75th centile). She took antipsychotic medication to control aggressiveness and attended a special education school.

The patient's mother has had a major depressive disorder and anxiety for 10 years, for which she has taken several psychiatric medications. She had similar facial features to her daughter including divergent strabismus on the right eye, and a hypernasal speech. She weighed 71 kg and was 160 cm tall (BMI 27.7, overweight). She was otherwise

This article contains supplementary material, which may be viewed at the American Journal of Medical Genetics website at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1552-4825/suppmat/index.html>.

Grant sponsor: FAPESP, CEPID-FAPESP, CNPq, and CAPES.

*Correspondence to: Célia Priszkulnik Koiffmann, PhD, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB/USP, Rua do Matão, 277, sala 204/209 CEP 05422-970, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: cpkoiffm@ib.usp.br; cdangelo@ib.usp.br

DOI 10.1002/ajmg.a.31787



FIG. 1. **a, b:** Proband at ages 4 and 8 years old, respectively, with mildly dysmorphic facial features and truncal obesity. **c:** The patient's mother is a carrier of the same del 22q11.2.

healthy and had successfully obtained a higher education degree.

The patient's routine laboratory exams, including thyroid function, glucose, cholesterol, triglycerides, calcium, and phosphate were normal. Newborn screening for sickle cell disease, galactosemia, and congenital adrenal hyperplasia was also normal, as well as hearing evaluation, abdominal ultrasonography, echocardiography, and electrocardiography. Brain MRI disclosed abnormal signal in the posterior periventricular white matter, possibly secondary to gliosis, or incomplete myelination. The 400–550-band resolution karyotype was normal and the suspected diagnosis of Prader–Willi syndrome (PWS) was ruled out by methylation analysis of the *SNURF-SNRPN* exon 1 [Zeschnigk et al., 1997].

Informed consent was obtained from both parents to include the patient in an ongoing research of syndromic obesity [Delrue and Michaud, 2004]. Multiplex ligation probe-dependent amplification (MLPA) with the SALSA kits P023, P064, and P204 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) was carried out according to the manufacturer's instructions [Schouten et al., 2002]. Electrophoresis and fragment analysis were performed using the MegaBACE™ 1000 DNA analysis system and Fragment Profiler software version 1.2 (GE Healthcare). Statistical analyses of the results for kits P064 and P023 were carried out using an excel spreadsheet developed by National Genetics Reference Laboratories (NGRL, Manchester, UK). For a comprehensive explanation of the analysis see www.ngrl.org.uk/Manchester. The analysis for kit P204 was performed visually, because no spreadsheet is currently available.

The first MLPA screening with kit P064, that detects deletions and duplications of chromosomal regions frequently involved in mental retardation syndromes, disclosed a deletion of probe *SNAP29* in the patient and her mother (data not shown). Kit P023, specific for 22q11 DS, confirmed the deletion in both mother and daughter and revealed an additional deletion of probe *LZTR1* (data not shown). Kit P204, especially designed to map 22q11 deletion breakpoints, was used to characterize our patient's deletion extension. The P204 probemix provides 37 probes in 22q11.2 and a few probes in the low-copy repeats (LCR) regions -A and -D (see the online Table II at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1552-4825/suppmat/index.html>). Both mother and daughter showed deletions of three probes mapped to genes *SNAP29*, *LZTR1*, and *P2RXL1*, and of a probe in the distal LCR-D (Fig. 2). Probe LCRD-b has shown to give false positive and false negative results and is currently being redesigned (MRC-Holland, personal communication). Therefore, no results for probes within LCR-D were used to define our deletion's breakpoints. The proximal deletion breakpoint was mapped between probes *PCQAP* and *SNAP29*, a region of 305 Kb containing LCR-C, and the distal deletion breakpoint was located within a 420 Kb region between probes *P2RXL1* and *HIC2*, comprising LCR-D (Fig. 3). Considering the recombination mechanisms mediated through LCR22 repeats, it is likely that both mother and patient have a 1 Mb C–D deletion in the distal region of the 3 Mb region. Microsatellite analysis of five markers (D22S1638, D22S1648, D22S944, D22S1623, D22S1709) spanning the 3 Mb region showed no maternal contribution of D22S1709 and normal segregation for the other markers (data not shown).

The typically deleted 3 Mb region in 22q11 DS is mediated by the largest LCR-A and LCR-D (A–D deletion), while the 1.5–2 Mb deletion is mediated by LCR-A and LCR-B (A–B deletion) or LCR-A and

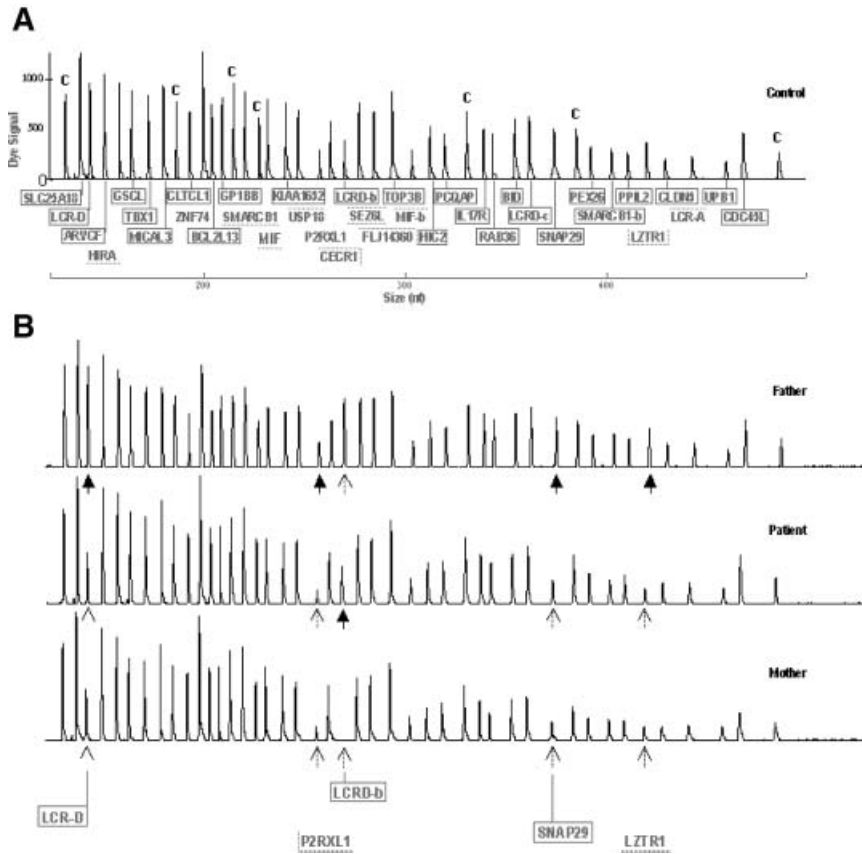


FIG. 2. Characterization of 22q11.2 deletion in the mother and daughter by MLPA with kit P204. **A:** Results obtained on a DNA control sample. Relative copy number of a genomic target sequence is detected as fluorescent signals (Y-axis) of the amplification product generated by each probe (X-axis). MLPA probes are shown above the corresponding peaks (c = control probes) and do not correspond to the physical 22q11 map. **B:** Electropherogram of the patient and her parents. Dotted arrows indicate the position of the aberrant MLPA probe compared to peak signal intensity of the control sample. Black arrows show corresponding probes with peak intensity similar to the control peak profile.

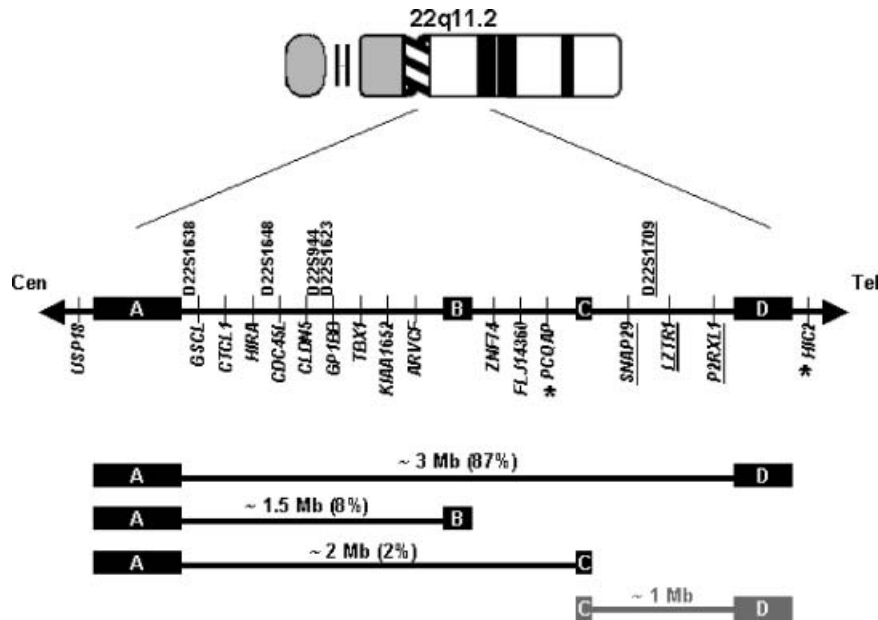


FIG. 3. Schematic overview of the DGS/VCFS 22q11.2 typically deleted region. LCR22 -A, -B, -C, and -D are indicated as filled boxes. The sizes of the boxes are proportional to the estimated size of each LCR22 (~350 kb, 135 kb, 75 kb, and 250 kb, respectively [Shaikh et al., 2000]). Microsatellite markers used in the study are shown above the line. The genes detected by MLPA probes within the TDR in kit P204 are labeled with *italic*. Asterisks indicate the maximum deleted region. The probes/markers that disclosed deletions are underlined. Bars below the map depict the common ~3 Mb deletion (A-D) and the ~1.5–2 Mb nested deletion (A-B or A-C) as mentioned in Shaikh et al. [2000]. The gray bar represents the deletion interval (C-D) described in our patient.

TABLE I. Common Clinical Findings in the 22q11.2 Deletion Syndrome [Bassett et al., 2005; Goldmuntz, 2005; McDonald-McGinn et al., 2005] Compared to Those Presented in Our Case and in One Previously Described Patient With a Similar 1 Mb C–D Deletion [Kurahashi et al., 1996, 1997]

Common features of 22q11.2 deletion	Atypical 1 Mb C-D 22q11.2 deletion	
	Kurahashi et al. 1996, [1997]	Present case
Congenital heart disease (74%) (Particularly conotruncal malformations)	Pulmonary atresia and tetralogy of fallot	Absent
Palatal abnormalities (69%) (especially velopharyngeal insufficiency)	No cleft palate	High arched palate
Hypocalcemia (50%) /other endocrinologic disorders ^a	No hypocalcemia	No hypocalcemia
Immune deficiency (77%)	No thymic hypoplasia	Absent
Speech and language disabilities ^b	No nasal voice	Speech delay and articulation problems
Feeding disorders ^c (30%)		Gastroesophageal reflux
Otorhinolaryngologic problems ^d		Chronic otitis media
Characteristic facial features	Typical facial features	Mild facial features
Cognitive or learning disabilities (70–90%)		Learning disability
Behavioral problems and/or psychiatric disorders ^e		Hyperphagia, aggressiveness, hyperactivity, sleep problems
Additional findings ^f		Obesity cerebral white matter alterations

^aGrowth hormone deficiency and thyroid disease.

^bSpeech delay, hypernasality (64–84%), articulation problems (62–77%).

^cNasopharyngeal (70%) or gastroesophageal reflux, esophageal dysmotility, constipation.

^dChronic otitis media, sinusitis, hearing deficits (28% of adults).

^eAutistic spectrum, attention deficit and hyperactivity, anxiety, depression, social withdrawal, obsessive-compulsive disorder, schizophrenia.

^fRenal (31%) and skeletal abnormalities, CNS alterations, obesity (35% of adults), etc.

LCR-C (A–C deletion) [Shaikh et al., 2000] (see Fig. 3). Only three patients have shown deletions in the distal half of the 3 Mb region, two of them delineated as having a B–C deletion [Garcia-Minaur et al., 2002; Rauch et al., 2005], and a single patient with a C–D deletion [Kurahashi et al., 1996, 1997]. This report describes the second report of an atypical 1 Mb C–D deletion, the first one transmitted from mother to daughter. Despite the fact that most of DGS/VCFS patients have the same 3 Mb deletion, the 22q11 DS is among the most clinically variable syndromes. While the majority of studies have shown that this variability has no correlation with the size of the deletion [Goldmuntz, 2005; McDonald-McGinn et al., 2005], a recent study reported possible genotype–phenotype correlations [Rauch et al., 2005]. In 350 DGS/VCFS patients, atypical distal deletions were only weakly suggestive of 22q11.2 DS, whereas patients with conotruncal congenital heart defects or with typical DGS/VCFS phenotype had the common 1.5–3 Mb deletion.

In addition to obesity and hyperphagia, our patient has aggressive and self-injurious behavior, learning disabilities, delayed emergence of speech, and articulation problems. Her dysmorphic facial features were subtle and not typical for this syndrome. Her mother had an even milder phenotype, accompanied by a major depressive disorder and hypernasal voice. In contrast, the previously described patient with a C–D deletion had a congenital heart defect and typical facial features. The lack of resemblance between our patient and that described by Kurahashi et al. [1996, 1997] (Table I) suggests that for smaller atypical deletions, there seems to be no

clear genotype–phenotype correlation, although additional patients should be studied.

Although the observation of these atypical deletions may appear to be inconsistent with the presence of a unique major gene causing the 22q11 DS, a *TBX1* mutation has recently been identified in patients with no detectable 22q11.2 deletions [Yagi et al., 2003]. *CRKL* has also been implicated in the underlying molecular mechanism of 22q11 DS [Guris et al., 2001] and would explain those cases with more distal deletions given that it is mapped to the C–D interval. Recent studies pointed to an important role of *COMT* and *DGCR2* genes, both mapped within the A–B interval, in the pathology of the psychiatric and behavioral disorders of 22q11 DS [Shifman et al., 2006; Weksberg et al., 2007]. However, a B–C deletion was reported in a patient with early signs of psychiatric illness, whose schizophrenic father was not available for analysis [Rauch et al., 2005]. Our C–D deleted patient started showing severe behavioral problems before the age of 4 years, and her carrier mother had suffered from major depressive disorder since age 26. These findings suggest that another gene, within the C–D interval, could also be responsible for the onset of neuropsychiatric disorders in 22q11 DS.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants of FAPESP, CEPID-FAPESP, CNPq, and CAPES. We are grateful to Dr. Jan Schouten for the kind donation of MLPA kit P204. We thank the family for the collaboration.

REFERENCES

- Adeyinka A, Stockero KJ, Flynn HC, Lorentz CP, Ketterling RP, Jalal SM. 2004. Familial 22q11.2 deletions in DiGeorge/velocardiofacial syndrome are predominantly smaller than the commonly observed 3 Mb. *Genet Med* 6:517–520.
- Amati F, Conti E, Novelli A, Bengala M, Diglio MC, Marino B, Giannotti A, Gabrielli O, Novelli G, Dallapiccola B. 1999. Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet* 7:903–909.
- Bassett AS, Chow EW, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb GD, Gatzoulis MA. 2005. Clinical features of 78 adults with 22q11 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 138A:307–313.
- Delrue MA, Michaud JL. 2004. Fat chance: Genetic syndromes with obesity. *Clin Genet* 66:83–93.
- Fernandez L, Lapunzina P, Pajares IL, Criado GR, Garcia-Guereta L, Perez J, Quero J, Delicado A. 2005. Higher frequency of uncommon 1.5-2Mb deletions found in familial cases of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 136A:71–75.
- Garcia-Minaur S, Fantes J, Murray RS, Porteous ME, Strain L, Burns JE, Stephen J, Warner JP. 2002. A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet* 39:e62.
- Goldmuntz E. 2005. DiGeorge syndrome: New insights. *Clin Perinatol* 32:963–978.
- Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. 2001. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet* 27:293–298.
- Iascone MR, Vittorini S, Sacchelli M, Spadoni I, Simi P, Giusti S. 2002. Molecular characterization of 22q11 deletion in a three-generation family with maternal transmission. *Am J Med Genet* 108:319–321.
- Kurahashi H, Nakayama T, Osugi Y, Tsuda E, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I. 1996. Deletion mapping of 22q11 in CATCH22 syndrome: Identification of a second critical region. *Am J Hum Genet* 58:1377–1381.
- Kurahashi H, Tsuda E, Kohama R, Nakayama T, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I. 1997. Another critical region for deletion of 22q11: A study of 100 patients. *Am J Med Genet* 72:180–185.
- McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 2005. 22q11.2 deletion syndrome. In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997–2006. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed 20 July 2006.
- Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, Lascorz J, Huffmeier U, Weyand M, Singer H, Hofbeck M. 2005. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet* 42:871–876.
- 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:e57.
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare 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.
- Shifman S, Levit A, Chen ML, Chen CH, Bronstein M, Weizman A, Yakir B, Navon R, Darvasi A. 2006. A complete genetic association scan of the 22q11 deletion region and functional evidence reveal an association between DGCR2 and schizophrenia. *Hum Genet* 120:160–170.
- Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. 2000. Chromosome 22q11 deletion syndrome: Update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 97:128–135.
- Weksberg R, Stachon AC, Squire JA, Moldovan L, Bayani J, Meyn S, Chow E, Bassett AS. 2007. Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome. *Hum Genet* 120:837–845.
- 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.
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. 1997. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* 5:94–98.

Chromosomal order of the 22q11 probes in SALSA MLPA P204

Length (nt)	Gene detected	Distance to next probe (kb)	Length (nt)	Gene detected	Distance to next probe (kb)
337	IL17R	108	283	FLJ14360	93
261	CECR1	355	319	PCQAP	305
136	SLC25A18	128	373	SNAP29	107
202	BCL2L13	55	418	LZTR1	32
355	BID	98	256	P2RXL1	69
178	MICAL3	236	142	LCR-D	164
391	PEX26	72	268	LCRD-b	187
247	USP18	303	310	HIC2	117
442	LCR-A	202	361	LCRD-c	133
166	GSCL	104	409	PPIL2	280
190	CLTCL1	77	292	TOP3B	1157
157	HIRA	148	346	RAB36	642
463	CDC45L	44	220	SMARCB1	47
427	CLDN5	200	400	SMARCB1-b	60
208	GP1BB	36	229	MIF	1
172	TBX1	139	301	MIF-b	654
238	KIAA1652	92	454	UPB1	1797
148	ARVCF	800	274	SEZ6L	--
196	ZNF74	94			

Beside of thirty-seven 22q11 probes, the SALSA P204 kit also contains seven probes from another chromosomal region that are used as control probes. One of these detects a sequence within DGS chromosome region-2 in 10p14. The unique length of the amplification product of each probe and the gene detected are shown as well the distance to next probe.

Aggressive behavior: lessons from individuals with Prader-Willi Syndrome-like phenotype

Contributor Author: Carla Sustek D'Angelo

Author Affiliation: Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Correspondence to Carla S. D'Angelo, Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, sala 204/209 CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; cdangelo@ib.usp.br

Book Chapter

Accepted: 8 January 2009

For publication in an invited edited collection entitled “Aggressive Behavior”

Nova Science Publishers

Introduction

Aggression is a complex social behavior with multiple causes ^[1]. Most of the research on the genetics of aggression has been done with mice ^[2], but the goal is to elucidate the mechanisms responsible for a predisposition to aggression in humans. The difficult in determining the effects of genetic factors in the etiology of specific human behaviors is part of the problematic of research in behavioral genetics. The association between genetic syndromes and behavior is of great importance because in general it is easier to discern the relationship between biology and behavior for chromosomal and single-gene disorders than for common, complex human behavior traits ^[3]. The introduction of the term behavioral phenotype towards the recognition of syndrome-specific behaviors ^[4] attempted to convey the idea of a causal relationship between the underlying genetic condition and the behavioral features. Research with behavioral phenotypes has begun in the hope that the demonstration of a behavioral phenotype with a particular syndrome would lead to the isolation of genes that influence behavior ^[5]. There have since been many conceptual and methodological issues for behavioral phenotype research ^[3,5,6,7,8]. In considering a simplistic gene-behavior pathway, any variation in a gene involved in some aspect of brain development or maturation (central nervous system or CNS genes) may result in a behavioral phenotype ^[8]. However, a direct causal relationship between a single gene and a specific behavior is highly unlikely ^[8]. Besides, the behavioral expressions are not simple direct results of the gene's action on behavior but to some extent dependent on the individual's environment and the reaction of others (stigma) ^[7,8]. Some genetic syndromes do not even qualify as having a behavioral phenotype, despite the existence of a striking and common neurobehavioral profile that is of particular importance for the diagnosis, either because the extreme variability in expression or severity of the phenotype and because the behavioral characteristics change over the time or due to the inexistence of validated behavior measures for some traits ^[5,9,10]. Another main issue for research with behavioral phenotype is whether the observed behavior is mainly a reflection of the level or severity of the learning disability that is typical of the genetic syndrome in question or if it is linked to some other specific characteristic of that syndrome ^[8]. Still, once an association between behavior and syndrome has been made, molecular characterization of the disorder can give us the opportunity to identify genes that influence behavior, which can be further assess for its functional role in brain in animal models.

The actual concept of the term refers to the characteristic pattern of behavioral, psychiatric, neuropsychological and linguistic components of a genetic disorder ^[11]. What is meant by this definition is that the biological disorder increases the probability of occurrence of the behavioral features in opposition to the early definition that the behavior suggests the diagnosis ^[12]. Of particular relevance to behavioral phenotype research is the occurrence of disturbed behaviors that are otherwise uncommon in the general population and present over a wide IQ (Intelligence quotient) range in genetic syndromes ^[8]. The unusual food-related behavior in Prader-Willi syndrome (PWS) is such an example. The establishment of a close relationship between genes, brain, and behavior is far more complicated for non-specific behaviors like aggression, anxiety, mood disturbances, obsessive-compulsive disorders (OCD), attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autistic-spectrum disorder (ASD), and psychiatric disorders ^[3,7,13]. These behaviors occur across many genetic disorders and are common referral problems in individuals with developmental disabilities (DD) and mental illness ^[13]. Therefore they do not qualify as good markers to indicate a causal role of the underlying genetic defect. Yet, although these conditions have low specificity, they are part of the behavioral phenotype of several genetic disorders. For instance, in Lesch-Nyhan syndrome (LNS), a rare X-linked recessive disorder, the self-injury is a hallmark of the disease. Finger and lip biting usually resulting in tissue damage is so characteristic of the disease as it is any physical abnormality ^[7,8,14]. The biological basis for this behavior is an inborn error of purine metabolism caused by mutations in the HPRT-encoding gene and complete deficiency of the enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*). Presence or absence of self-injury was already shown to be related to HPRT levels, but the direct cause of the self-injurious remains unclear ^[7,8,14].

In the next sections I shall illustrate very briefly on recent contributions of studies of genetic disorders to this line of inquiry.

Single-gene disorders and aggression

Two important contributions to the genetics of aggression were provided recently with the study of the effect of secondary genes in Fragile-X syndrome (FXS) ^[15] and with the construction of mouse models for Rett syndrome (RTT) by using a conditional knockout strategy in specific neurons ^[16].

Aggression and self-injurious behavior are significant problems in a number of males with FXS and the phenotypic expression of these features is variable [17]. Fifty males with FXS were evaluated for polymorphism genotypes in both genes serotonin transporter (5-HTT) and monoamine oxidase A (MAOA), which are candidate genes known to affect mood and behavior, especially impulsive aggressive behavior [15]. Previous studies had established that variants of the 5-HTT-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and MAOA-VNTR polymorphisms were associated with aggression [15]. In the study with FXS males, while homozygosity for the long allelic variant of 5-HTT was associated with significantly higher levels of aggressive/destructive behavior than homozygosity for the short allelic variant, there was no effect of MAOA-VNTR polymorphisms on these behaviors. Therefore, genotype differences in the 5-HTTLPR locus and not in the MAOA-VNTR may modify expression of aggressive behavior in males with FXS. Given that the L (long) variant results in higher transcription of 5-HTT gene and transporter levels and increased serotonin reuptake, it is speculated that the relative decrease of synaptic 5-HT in individuals with L/L genotype lowers their threshold for irritability and aggressive behavior [15].

In Rett syndrome, it has been hypothesized that different patterns of X chromosome inactivation (XCI) result in distinctive subsets of phenotypes, and that particular RTT phenotypes result from loss of function of MECP2 in specific neurons [16]. To test this hypothesis, *Mecp2* was removed from mouse *Sim1*-expressing neurons in the hypothalamus [16]. These *Mecp2* conditional knockout (*Mecp2* CKO) mice recapitulated a subset of RTT-like features and not all the phenotypes that are observed in mice where *Mecp2* is mutated in all neurons. Interestingly, features not typically seen in patients with classic RTT, such as obesity, hyperphagia and increased aggressive behavior were observed in these *Mecp2* CKO mice but not in mice with deletion of *Mecp2* from other selected brain regions. The increased body weight alone did not seem to be responsible for the aggressive phenotype, but the molecular basis for the aggression seen in the *Mecp2* CKO mice has not been revealed. However, this study detected a strictly decreased expression of *Bdnf*, a downstream mediator of the melanocortin-4 receptor (MC4R) signaling pathway, in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). It has been proposed that misregulation of *Bdnf* expression may lead to disrupted social behavior in the form of aggression and to hyperphagia and obesity, owing to disrupted MC4R signaling. Thus, MeCP2 can play a role in the MC4R

signaling pathway that regulates food intake and in pathways important for aggression [16].

Genomic disorders and behavioral genetics

Smith-Magenis syndrome (SMS) and PWS are two examples of genomic disorders in which a distinctive pattern of self-injury behavior occur. It takes form of nail-yanking and bodily insertions in the former and skin-picking in the last [7,18]. In both syndromes, the neurobehavioral phenotypes are a cause of major concern and the most challenging problems.

Behavioral issues are one of the unique characteristic features of SMS and are related with a striking pattern of stereotypies, hyperactivity, insertion of objects into bodily orifices (polyembolokoilamania), pulling out of fingernails and toenails (onychotillomania), maladaptive, self-injurious and aggressive behavior, which are observed with increasing age [19]. Until recently, the only genetic defect associated with SMS was a chromosome 17p11.2 microdeletion. We now know that loss of function of a single gene, the retinoic acid-induced 1 gene (*RAI1*), is sufficient to cause most SMS features [20]. Enrollment of *RAI1* in the etiology of SMS happened through direct sequencing of candidate genes within the smallest region of deletion overlap (SRO) in patients with SMS clinical features lacking the microdeletion [21]. Since then, over 12 unique mutations affecting all known transcripts of the gene and several single-nucleotide polymorphisms have been identified [20]. Genotype-phenotype correlation studies indicate that individuals with the mutation have the full SMS phenotype including the behavioral and neurologic signs and symptoms [9,19]. Both engineered SMS mouse models carrying different-sized deletions or heterozygous deficient for *Rai1* reproduced the craniofacial features and obesity seen in patients with SMS [19]. Interestingly, mice with heterozygous duplication of chromosome 17p11.2 region are underweight [22]. Besides, these mice show behavioral anomalies such as impaired contextual fear conditioning. Compound heterozygous mice with a dup17p11.2 allele and a null *Rai1* allele, and thus with normal disomic gene dosage of *Rai1*, rescued many of these features including normalization of body weight and partial normalization of behavior. Therefore, it has been proposed that *Rai1* is a dosage sensitive gene involved in body weight control and complex behavioral responses [22]. *RAI1* is likely involved in transcriptional regulation, but its functional role is still unclear [20]. The mutations so far identified include single to multiple nucleotide deletions and nonsense and missense

mutations ^[20]. While functional abrogation of *RAI1* due to a deletion or nonsense/frameshift mutation is a likely mechanism for *RAI1* haploinsufficiency, the causative role of missense mutations and the effect(s) of polymorphisms are not completely understood ^[20].

In PWS, the distinctive behavioral profile includes unusual food related behaviors, temper tantrums, stubbornness, controlling and manipulative behavior, compulsive-like behaviors, and difficulty with change in routine and sometimes psychiatric disturbance ^[23]. These behaviors are associated with the effect of the PWS genotype ^[24]. PWS is an example of a genetic condition involving genomic imprinting caused by the absence of expression of the normally active paternally-inherited genes in 15q11-q13. Its genotypes consist of two subtypes of paternal interstitial deletion (type I and II) (70-75%), maternal uniparental disomy (UPD) (20-25%), and imprinting center mutations (2-5%) ^[25]. The PWS critical region contains a number of imprinted and non-imprinted genes. The exact function of each of these genes in the PWS phenotype is still being elucidated ^[23]. Whilst UPD cases have the normal dosage of non-imprinted genes, cases resulting from deletion only have one copy of these genes. In addition, non-deleted cases over-express genes that are normally just expressed on the maternally derived chromosome. The molecular differences between the deletion subtypes refer to four biparentally expressed genes that are found with one copy in type I deletion but with two copies in type II deletion ^[26]. These different genotypes prompted several studies of genotype-phenotype correlations and a number of reports concerning phenotypic differences between deletion and UPD groups ^[26,27,28]. While reports have been contradictory about behavioral differences across type I versus type II deletions, various studies have related reduced skin-picking in those with UPD and a higher risk for autism spectrum disorders (ASD) as for psychiatric disorders in young adulthood persons with UPD ^[26,27,28]. Over-expression of the ubiquitin protein ligase gene (*UBE3A*) has been suggested as a genetic risk factor for individuals with UPD to develop the autism phenotype ^[26]. Expression of this gene is exclusively from the maternally derived chromosome in a few specific areas of brain, including hippocampus and the cerebellar Purkinje cells and both areas have been implicated in the neuropathology of autism ^[26]. More recent, a study revealed consistent age-related changes in correlates of behavior within type I deletion group only ^[28]. Advancing age was negatively correlated to behaviors such as tantrums, aggression, impulsivity, clumsiness, restlessness, talking too much, mood swings, being argumentative, and

hyperphagic severity as well. It is hypothesized that such behavioral mellowing in type I group might be correlated with altered expression of biparentally expressed genes, which are found with one copy in type I deletion in comparison with two copies in type II deletion or UPD cases. In special, *CYFIP1* gene is a primary target of the FMRP protein. While over-expression of this gene was linked to co-occurring FXS and autism and 15q duplications and autism, reduced levels of CYFIP1 mRNA was reported in several individuals with fragile X mutations along with a PWS-like phenotype (fragile X-PWS phenotype) ^[28].

Final considerations

I have presented just a few examples of the insights that can be gained into the genetic basis of aggression and other human behaviors by studying genetic disorders. In particular, came to our attention the identification of a common neurologic origin for aggression, hyperphagia and obesity in those *Mecp2* CKO mice. PWS has been the subject of our research program for over two decades. A PWS-like phenotype has been described in a subset of patients with SMS, FXS, UPD14, Cohen syndrome, Bardet–Biedl syndrome, Alstrom syndrome, duplications of 3p25.3–p26.2 and of Xq27.2-ter and deletions 1p36, 6q16.2, and 10q26 ^[20,23,29]. In an ongoing research of over 300 patients with syndromic obesity, we have diagnosed 142 patients with PWS, three patients with SMS, one patient with a 6q16.2 deletion, and four patients with 1p36 monosomy. We had previously reported on a 10-year-old girl presenting obesity, hyperphagia and aggressive behavior with a *de novo* 6q16.2 deletion including the *SIMI* gene ^[30]. We also reported on a patient with an inherited atypical 22q11.2 deletion featuring obesity and aggressive behavior ^[31]. Therefore, my own work has suggested to us that the research on the genetics of aggression can benefit from the study of obesity-related syndromes to the identification of genes elsewhere in the genome that might influence propensities towards overeating and aggressive behavior. The recognition of a relatively new X-linked mental retardation syndrome featuring unprovoked aggressive outbursts and central obesity during adolescence and the identification of mutations in the Cullin 4B (*CUL4B*) gene in eight families with 39 affected males ^[32] further emphasizes the genetic association between obesity and aggression.

Acknowledgments

This work is supported by grants of FAPESP, CEPID-FAPESP, CNPq, and CAPES.

References

- [1] Nelson RJ, Chiavegatto S (2001) Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci* 24(12):713-719.
- [2] Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays* 28(5):495–503.
- [3] Skuse DH (2000) Behavioural phenotypes: what do they teach us? *Arch Dis Child* 82:222–225.
- [4] Nyhan WL (1971) Behavioral phenotypes in organic genetic disease: presidential address to the Society for Pediatric Research. *Pediatr Res* 6:1-9.
- [5] Flint J (1998) Behavioral phenotypes: conceptual and methodological issues. *Am J Med Genet* 81:235–240.
- [6] Dykens EM (2001) Introduction to the Special Issue on Behavioral Phenotypes. *Am J Ment Retard* 106(1):1–3.
- [7] Harris JC (2001) Behavioral phenotypes of neurodevelopmental disorders: portals into the developing brain. In Davis, KL Coyle, JT, Charney, D and Nemeroff C. (eds.), *Psychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*, American College of Psychopharmacology, Nashville, TN.
- [8] O'Brien G (2006) Behavioural phenotypes: causes and clinical implications. *Adv Psychiatr Treat* 12:338-348.
- [9] Madduri N, Peters SU, Voigt RG, Llorente AM, Lupski JR, Potocki L (2006) Cognitive and adaptive behavior profiles in Smith-Magenis syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 27:188–192.
- [10] Philippe A, Boddaert N, Vaivre-Douret L, Robel L, Danon-Boileau L, Malan V, de Blois MC, Heron D, Colleaux L, Golse B, Zilbovicius M, Munnich A (2008) Neurobehavioral profile and brain imaging study of the 22q13.3 deletion syndrome in childhood. *Pediatr* 122(2):e376-382.
- [11] Murphy KC (2004) The behavioural phenotype in velo-cardio-facial syndrome. *J Intellect Disabil Res* 48(6):524–530.
- [12] Prasad SE, Howley S, Murphy KC (2008) Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 14:26–34.
- [13] Antonacci DJ, Manuel C, Davis E (2008) Diagnosis and Treatment of Aggression in Individuals with Developmental Disabilities. *Psychiatr Q* 79(3):225-247.

- [14] Deb S. Self-injurious behaviour as part of genetic syndromes (1998) *Br J Psychiatry* 172:385-388.
- [15] Hessler D, Tassone F, Cordeiro L, Koldewyn K, McCormick C, Green C, Wegelin J, Yuhas J, Hagerman RJ (2008). Brief Report: Aggression and Stereotypic Behavior in Males with Fragile X Syndrome—Moderating Secondary Genes in a “Single Gene” Disorder. *J Autism Dev Disord* 38:184–189.
- [16] Fyffe S, Neul J, Samaco R, Chao H, Ben-Shachar S, Moretti P, McGill B, Goulding E, Sullivan E, Tecott L (2008) Deletion of *Mecp2* in *Sim1*-Expressing Neurons Reveals a Critical Role for MeCP2 in Feeding Behavior, Aggression, and the Response to Stress. *Neuron* 59(6):947–958.
- [17] Valdovinos MG (2007) Brief review of current research in FXS: Implications for treatment with psychotropic medication. *Res Dev Disabil* 28(6):539-545.
- [18] Dykens EM, Smith AC (1998). Distinctiveness and correlates of maladaptive behaviour in children and adolescents with Smith–Magenis syndrome. *J Intellect Disabil Res* 42(6):481–489.
- [19] Gropman AL, Elsea SC, Duncan WC Jr, Smith AC (2007) New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol* 20(2):125-134.
- [20] Elsea SH, Girirajan S (2008). Smith–Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:412-421.
- [21] Slager RE, Newton TL, Vlangos CN, Finucane B, Elsea SH (2003) Mutations in *RAI1* associated with Smith–Magenis syndrome. *Nat Genet* 33:466–468.
- [22] Walz K, Paylor R, Yan J, Bi W, Luspi JR (2006) *Rai1* duplication causes physical and behavioral phenotypes in a mouse model of dup(17)(p11.2p11.2). *J Clin Invest* 116:3035-3041.
- [23] Cassidy SB, Driscoll DJ (2009). Prader–Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:3-13.
- [24] Holland AJ, Whittington JE, Butler J, Webb T, Boer H, Clarke D (2003) Behavioural phenotypes associated with specific genetic disorders: evidence from a population-based study of people with Prader-Willi syndrome. *Psychol Med* 33:141–153.
- [25] Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP (2005) Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet* 67:47–52.

- [26] Milner KM, Craig EE, Thompson RJ, Veltman MWM, Thomas NS, Roberts S, Bellamy M, Curran SR, Sporikou CMJ, Bolton PF (2005) Prader-Willi syndrome: intellectual abilities and behavioural features by genetic subtype. *J Child Psychol Psychiatry* 46:1089–1096.
- [27] Webb T, Whittington J, Clarke D, Boer H, Butler J, Holland A (2002) A study of the influence of different genotypes on the physical and behavioral phenotypes of children and adults ascertained clinically as having PWS. *Clin Genet* 62:273–281.
- [28] Dykens EM, Roof E (2008) Behavior in Prader-Willi syndrome: relationship to genetic subtypes and age. *J Child Psychol Psychiatry* 49(9):1001–1008.
- [29] D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CI, Varela MC, Koiffmann CP (2006) Prader-Willi-like phenotype: investigation of 1p36 deletion in 41 patients with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. *Eur J Med Genet* 49(6):451-460.
- [30] Varela MC, Simões-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, De Castro CIE, Koiffmann CP (2006) A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader–Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur J Med Genet* 49(4):298-305.
- [31] D'Angelo CS, Jehee FS, Koiffmann CP (2007) An Inherited Atypical 1 Mb 22q11.2 Deletion Within the DGS/VCFS 3 Mb Region in a Child With Obesity and Aggressive Behavior. *Am J Med Genet Part A* 143A:1928–1932.
- [32] Tarpey P, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slauch R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M (2007) Mutations in CUL4B, Which Encodes a Ubiquitin E3 Ligase Subunit, Cause an X-linked Mental Retardation Syndrome Associated with Aggressive Outbursts, Seizures, Relative Macrocephaly, Central Obesity, Hypogonadism, Pes Cavus, and Tremor . *Am J Hum Genet* 80(2):345-352.

Capítulo 7 – Discussão Geral

Basicamente, este trabalho consistiu de duas partes: investigação de rearranjos no segmento cromossômico distal de 1p36 em uma amostra total de 237 pacientes e investigação dos mecanismos de quebra, reparo e estabilização cromossômica envolvidos em rearranjos subteloméricos utilizando como modelo seis rearranjos constitucionais de pacientes com a síndrome de monossomia 1p36.

Atualmente, o sucesso na identificação de rearranjos no segmento cromossômico distal de 1p36 depende do diagnóstico clínico, que pode direcionar testes genéticos específicos, ou de uma metodologia de *screening* genômico, que pode detectar estes rearranjos em uma população de pacientes sem considerar o fenótipo.

Geralmente, o diagnóstico clínico de síndrome de monossomia 1p36 é feito pelo fácies característico e pela presença de hipotonia, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) ou retardo mental (RM) e ausência ou déficit importante de fala (Battaglia e Shaffer 2008).

O cariótipo por banda G pode não detectar pelo menos 90% dos rearranjos cromossômicos em 1p36 (Ballif *et al.* 2007) e o *screening* genômico por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e, principalmente, *array* CGH (“Array-based Comparative Genomic Hybridization”) têm permitido o diagnóstico de síndrome de monossomia 1p36 em um número grande de pacientes com malformações congênitas múltiplas e RM inespecífico (Ravnan *et al.* 2006; Ballif *et al.* 2007; Shaffer *et al.* 2007).

No estudo do capítulo 4 (“Multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of typical and atypical monosomy 1p36 subjects and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia”), utilizamos a técnica de MLPA para o *screening* de rearranjos no segmento cromossômico distal de 1p36 em uma amostra clinicamente heterogênea e 154 pacientes com obesidade e hiperfagia e testes genéticos negativos para a síndrome de Prader-Willi (PWS). Identificamos a monossomia 1p36 em nove pacientes com fenótipos típicos, atípicos ou menos graves.

A síndrome de Prader-Willi (PWS) compõe um dos diagnósticos diferenciais da monossomia 1p36 (Battaglia e Shaffer 2008). Em um estudo anterior (D’Angelo *et al.* 2006), já tínhamos descrito um paciente com deleção 1p36 submicroscópica e fenótipo “PWS-like”. Agora, descrevemos a monossomia 1p36 para quatro pacientes (três casos novos) em uma população de indivíduos com obesidade e hiperfagia. Portanto, nosso trabalho reforça a associação da monossomia 1p36 com estas características.

No outro grupo, apenas três pacientes tinham diagnóstico clínico de síndrome de monossomia 1p36 e outros dois tinham sido avaliados para as síndromes de Angelman (AS) e Miller-Dieker (MDS). Entretanto, a apresentação fenotípica de nossos pacientes poderia sugerir o diagnóstico de síndrome de monossomia 1p36 em todos, exceto três pacientes com obesidade síndrômica. Nesses pacientes, além do fenótipo facial da deleção estar ausente, os déficits cognitivos foram considerados leves comparados ao de pacientes com a monossomia 1p36, geralmente descritos com RM entre moderado e grave e linguagem expressiva ausente (Battaglia *et al.* 2008); apesar de alguns pacientes descritos com RM leve e habilidade de fala complexa (Wu *et al.* 1999). Destacamos um paciente com 31 anos que apresentou capacidade de leitura e escrita e habilidade de fala, incluindo o uso de sentenças mais complexas e vocabulário bem vasto. Recentemente, Battaglia *et al.* (2008) observou uma melhora com a idade nas habilidades motoras, sociais e adaptativas de pacientes com a monossomia 1p36.

Apenas 12 pacientes em nossa amostra foram encaminhados para estudos cromossômicos com a suspeita clínica de síndrome de monossomia 1p36. Pela nossa experiência, a dificuldade de diagnóstico clínico da monossomia 1p36 pode ser atribuída em parte a não especificidade das características que compõem o seu quadro clínico. Por exemplo, lissencefalia sugere a hipótese diagnóstica de MDS, igualmente a obesidade e hiperfagia de PWS. Outro aspecto é a falta de familiaridade com o fenótipo nesta que constitui a síndrome de deleção terminal mais comum em humanos. Diante da sua incidência em 1/5000 nascimentos, enfatizamos a necessidade de (re) avaliar a hipótese diagnóstica de síndrome de monossomia 1p36 em um número grande de pacientes com suspeita de alteração cromossômica, mas atualmente sem diagnóstico. Contudo, pacientes com fenótipos não clássicos serão identificados apenas no *screening* genômico.

Apesar de grandes diferenças no tamanho das deleções em 1p36, as correlações genótipo-fenótipo descritas até hoje não identificaram uma relação clara entre a extensão física das deleções e a variabilidade fenotípica (Gajecka *et al.* 2007), e o mecanismo de efeito de posição já foi considerado na variabilidade da expressão fenotípica (Redon *et al.* 2005). Um resultado bastante interessante em nosso trabalho foi a observação de um agrupamento de pontos de quebra entre 2.0-3.0 Mb do telômero de 1p. Enquanto as maiores deleções foram encontradas exclusivamente em pacientes com fenótipos típicos, as deleções com os pontos de quebra mapeados neste intervalo foram atribuídas à pacientes com fenótipos típicos, atípicos ou menos graves. Além disso,

todos os pacientes com obesidade e hiperfagia e monossomia 1p36 apresentaram tamanhos de deleções neste mesmo intervalo. Portanto, nosso trabalho sugere que a região distal de 2-3 Mb de 1p seja crítica para o espectro da variabilidade fenotípica na síndrome de monossomia 1p36 e para a manifestação de obesidade e hiperfagia, que devem estar frequentemente associadas com fenótipo atípicos/leves.

Indicamos três genes mapeados neste intervalo que estão implicados com o desenvolvimento e manutenção neural: *PRKCZ* (“Protein kinase C, zeta”), *PLCH2* (“Phospholipase C, eta 2”) e *HES5* (“Hairy and enhancer of split 5”). Um destes genes (*PRKCZ*) está envolvido também com a via sinalizadora de insulina e outro gene (*PLCH2*) ainda tem função nos processos metabólicos de lipídios. Sugerimos que padrões de expressão alterados nestes genes possam comprometer o funcionamento adequado do sistema nervoso ou contribuir para o desenvolvimento de obesidade em pacientes com a monossomia 1p36; mas somente a hemizigose destes genes não explica o espectro de variabilidade fenotípica nem a manifestação de obesidade e hiperfagia. Recentemente, Fitzgibbon et al. (2008), especulou sobre uma possível associação entre a hemizigose do gene *PLCH2* e as dificuldades de aprendizado, atraso do DNPM e de fala em um paciente com rearranjo complexo em 1p36.

A literatura recomenda a utilização de FISH com várias sondas (Heilstedt *et al.* 2003a) para o diagnóstico genético de monossomia 1p36, em função da diversidade nos tipos e tamanhos de rearranjos em 1p. Atualmente, plataformas específicas de *array* CGH permitem definir o tipo e a extensão dos rearranjos em 1p36 em uma única etapa (Shaffer *et al.* 2007; Battaglia e Shaffer 2008). Descrevemos o uso de uma estratégia de MLPA com o kit específico da síndrome de monossomia 1p36 (P147) associado com o do kit subtelomérico (P036), na detecção e caracterização de rearranjos no segmento cromossômico 1p36 (capítulo 4). Nosso trabalho indica o uso desta estratégia de MLPA como um método alternativo rápido de diagnóstico de monossomia 1p36, que possibilita caracterizar os diferentes tipos de rearranjos descritos em 1p36 a baixo custo. Principalmente, esta estratégia permite reconhecer pacientes com translocações não equilibradas, para os quais o estudo dos genitores por FISH com a sonda subtelomérica específica de 1p deve ser garantida.

Um aspecto importante que se revelou com o uso dos kits de MLPA subtelomérico e de retardo mental (P064) durante o *screening* de deleções no segmento cromossômico distal de 1p36 foi a identificação de rearranjos envolvidos com outras doenças genéticas além da monossomia 1p36, em uma amostra de pacientes com

obesidade síndrômica. No capítulo 5 (“An Inherited Atypical 1 Mb 22q11.2 Deletion Within the DGS/VCFS 3 Mb Region in a Child With Obesity and Aggressive Behavior”), descrevemos um paciente com obesidade e hiperfagia e comportamento agressivo com diagnóstico de síndrome DiGeorge (DGS) dado pela detecção de uma deleção atípica com o kit P064, herdada de sua mãe com transtorno depressivo maior.

A associação entre a síndrome de deleção 22q11.2 (22q11.2 DS), que inclui as síndromes DiGeorge, Velocardiofacial e Anomalia facial Conotruncal (DGS/VCFS/CTAF) com doenças psiquiátricas, especialmente, esquizofrenia, é bem conhecida e genes candidatos que podem influenciar o risco destas doenças entre estes pacientes e na população geral já foram sugeridos (Prasad et al. 2008). Os genes candidatos mais promissores estão mapeados no terço proximal da região de deleção comum da 22q11 DS (“3 Mb A-D deletion”). No nosso trabalho, os kits de MLPA específicos da 22q11.2 DS (P023 e P204), revelaram deleção com ~1 Mb em extensão envolvendo as LCRs distais “C” e “D” (“1 Mb C-D deletion”). Descrevemos o segundo caso de monossomia no terço distal da região de deleção comum da 22q11 DS, sendo o primeiro caso transmitido de mãe para filha e associado com distúrbios neuropsiquiátricos. Portanto, além de enfatizar a associação entre a hemizigose do gene *CRKL* (“v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like”) com o fenótipo de 22q11.2 DS, nossos resultados sugeriram a presença de outro(s) gene(s) mapeados no intervalo C-D que poderia(m) estar envolvido(s) com a manifestação de doenças neuropsiquiátricas nestes pacientes (D’Angelo et al. 2007).

No capítulo 6 (“Aggressive behavior: lessons from individuals with Prader-Willi Syndrome-like phenotype”) discutimos como as respostas obtidas das pesquisas com doenças genéticas associadas com distúrbios de comportamento podem contribuir para o entendimento da genética da agressividade em humanos. A associação entre comportamento (auto) agressivo com obesidade e/ou hiperfagia (Fyffe et al. 2008; Gropman et al. 2007; Tarpey et al. 2007) têm nos chamado a atenção porque a nossa experiência com síndromes genéticas relacionadas com obesidade também apontam na direção de uma origem genética comum para estas características. Por exemplo, na pesquisa de genes ou segmentos cromossômicos envolvidos com obesidade síndrômica desenvolvida em nosso laboratório, já tínhamos descrito a deleção 6q16.2, incluindo o gene *SIMI*, em um paciente com agressividade (Varela et al. 2006). Agora, identificamos três pacientes com SMS (capítulo 4), onde ocorre um padrão específico de comportamento auto-agressivo e outro paciente com 22q11.2 DS associada com

agressividade (D'Angelo et al. 2007). Além disso, comportamentos de (auto)agressão são frequentes em pacientes com a monossomia 1p36 e, estão algumas vezes associados com obesidade e hiperfagia. Portanto, certamente, a procura por genes responsáveis por obesidade em humanos deve revelar genes importantes também para distúrbios de comportamento em humanos, entre eles agressividade, como sugerem os modelos animais do gene *MECP2*.

Um resultado muito importante de nosso trabalho consistiu do estudo dos pontos de quebra de seis rearranjos constitucionais de 1p36 (capítulo 3, “Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements”). Ao contrário de grande parte das doenças genômicas, os mecanismos moleculares de rearranjos subteloméricos começaram a ser estudados apenas recentemente e se baseiam no modelo da monossomia 1p36. Pela arquitetura genômica dos subtelômeros, poderíamos esperar um mecanismo de origem comum para rearranjos subteloméricos, como a NAHR entre duplicons subteloméricos parálogos. Atualmente, não há evidências na literatura que favoreçam esta hipótese e a possibilidade menos excitante é a de que rearranjos subteloméricos representem o produto do reparo de DSBs aleatórias por mecanismos de recombinação não exclusivos (Ledbetter 2007).

Nosso trabalho favorece o mecanismo de reparo por NHEJ na origem de três cromossomos derivados *de novo* e um rearranjo complexo, que provavelmente envolveu ciclos BFB intermediários na sua formação. Demonstramos que os pontos de quebra destes rearranjos ocorreram em seqüências de DNA cópia única e identificamos micro-homologias com até três nucleotídeos entre as junções recombinantes. Além disso, identificamos diversos motivos de seqüência clastogênicos ou recombinogênicos que poderiam promover a NHEJ, especialmente, sítios consensos da proteína *translin* e *hotspots* de erro da DNA polimerase, ambos super-representados em alguns pontos de quebra. Também identificamos vários trechos de seqüência com potencial de assumir estruturas não canônicas na molécula do DNA próximos dos pontos de quebra, que poderiam explicar a ocorrência de DSBs nestes sítios genômicos.

Apesar de trabalhos anteriores já terem demonstrado um papel proeminente da NHEJ na origem de rearranjos complexos de 1p36 e translocações recíprocas (Gajecka et al. 2006b; 2006c; 2008), o modelo BIR foi sugerido como mais provável mecanismo de captura telomérica de cromossomos com deleções terminais (Ballif et al. 2004a; Gajecka et al. 2007). Nossos resultados constituem a primeira evidência de um

mecanismo de origem comum por NHEJ para translocações recíprocas e cromossomos derivados *de novo* e implicam na ocorrência de duas DSBs com a formação de dois cromossomos com deleções terminais.

Um resultado inédito de nossa pesquisa consistiu no refinamento dos pontos de quebra de duas deleções terminais aparentemente simples em dois intervalos genômicos distintos, mas fisicamente próximos, contendo duplicações segmentares específicas de 1p36 com 90-98% de homologia e orientadas diretamente. Apesar da identificação de duplicações segmentares nas regiões de pontos de quebra destes rearranjos não constituir uma evidência direta de um mecanismo de origem exclusivo por recombinação homóloga, este resultado indica que características genômicas estruturais podem intermediar a origem de algumas deleções terminais em 1p36.

Capítulo 8 – Conclusões

- A monossomia 1p36 está relacionada com um amplo espectro fenotípico, que inclui pacientes com fenótipos típicos, atípicos ou menos graves;
- As características obesidade e hiperfagia fazem parte do fenótipo da monossomia 1p36 e podem estar frequentemente associadas com apresentações clínicas não clássicas ou com menor gravidade;
- O segmento distal de 2-3 Mb do telômero de 1p pode ser crítico para o espectro da variabilidade fenotípica na síndrome de monossomia 1p36 e para a manifestação de obesidade e hiperfagia, porém somente a hemizigose de genes mapeados neste intervalo crítico não explica o espectro de variabilidade fenotípica nem a manifestação de obesidade e hiperfagia;
- A dificuldade de diagnóstico clínico de síndrome de monossomia 1p36 pode ser atribuída a não especificidade das características que compõe o seu quadro clínico e à falta de familiaridade com o fenótipo;
- Pacientes com fenótipos atípicos/leves têm maiores chances de ser diagnosticados durante o *screening* genômico;
- Os kits de MLPA específico da síndrome de monossomia 1p36 (P147) e subtelomérico (P036) devem ser usados em conjunto como um método alternativo rápido e de baixo custo no diagnóstico genético da monossomia 1p36;
- Os kits de MLPA subtelomérico (P036) e de retardo mental (P064) como ferramentas de *screening* podem revelar outras causas de obesidade sindrômica;
- Foi sugerida a presença de genes candidatos para doenças psiquiátricas em 22q11.2 DS no segmento distal do intervalo de deleção comum de 3 Mb;
- A pesquisa com síndromes genéticas relacionadas com obesidade e distúrbios de comportamento parece revelar uma origem genética comum para estas características em humanos;
- Enquanto a NAHR é o principal mecanismo de origem de rearranjos genômicos para a maioria das doenças genômicas, a NHEJ parece ter um papel predominante na monossomia 1p36 e, possivelmente, em rearranjos envolvendo outros subtelômeros;
- A NHEJ e não o modelo BIR é o mais provável mecanismo de captura telomérica de cromossomos com deleções terminais;

Conclusões

- Os pontos de quebra de rearranjos subteloméricos parecem coincidir com seqüências que tem potencial para assumir estruturas não canônicas na molécula do DNA;

- Sugerimos que duplicações segmentares específicas de 1p36 possam estar envolvidas com a origem de algumas deleções terminais.

Capítulo 9 – Referências Bibliográficas

- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Cooper D (2006) Gross Deletions and Translocations in Human Genetic Disease. In: Genome and Disease (Volff J-N, ed) Genome Dynamics. Karger, Basel, pp 17–34.
- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, Ball EV, Cooper DN (2003) Translocations and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat* 22:229–244.
- Adeyinka A, Stockero KJ, Flynn HC, Lorentz CP, Ketterling RP, Jalal SM (2004) Familial 22q11.2 deletions in DiGeorge/velocardiofacial syndrome are predominantly smaller than the commonly observed 3 Mb. *Genet Med* 6:517-520.
- Aguilera A, Gómez-González B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics* 9:204-217.
- Amati F, Conti E, Novelli A, Bengala M, Diglio MC, Marino B, Giannotti A, Gabrielli O, Novelli G, Dallapiccola B (1999) Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet* 7:903-909.
- Ambrosini A, Paul S, Hu S, Riethman H (2007) Human subtelomeric duplicon structure and organization. *Genome Biol* 8(7):R151.
- Antonacci DJ, Manuel C, Davis E (2008) Diagnosis and Treatment of Aggression in Individuals with Developmental Disabilities. *Psychiatr Q* 79(3):225-247.
- Argueso JL, Westmoreland J, Mieczkowski PA, Gawel M, Petes TD, Resnick MA (2008) Repetitive DNA can reshape the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11845-11850.
- Ashley T, Gaeth AP, Inagaki H, Seftel A, Cohen MM, Anderson LK, Kurahashi H, Emanuel BS (2006) Meiotic Recombination and Spatial Proximity in the Etiology of the Recurrent t(11;22). *Am J Hum Genet* 79:524–538.
- Bacolla A and Wells RD (2004) Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease. *J Biol Chem* 279: 47411–47414.
- Baker E, Hinton L, Callen DF, Atree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E (2002) Study of 250 children with

- idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 107(4):285-293.
- Ballif BC, Gajecka M, Shaffer LG (2004) Monosomy 1p36 breakpoints indicate repetitive DNA sequence elements may be involved in generating and/or stabilizing some terminal deletions. *Chromosome Res* 12:133-141. (b)
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000) FISHing for mechanisms of cytogenetically defined terminal deletions using chromosome-specific subtelomeric probes. *Eur J Hum Genet* 8(10):764-770.
- Ballif BC, Shaffer LG (2006) Monosomy 1p36 as a model for the molecular basis of terminal deletions, genomic disorders: The genomic basis of disease. Totowa, NJ: Humana Press. p 301–314.
- 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 Part A* 143A:1850-1857.
- Ballif BC, Wakui K, Gajecka M, Shaffer LG (2004) Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet* 114:198-206. (a)
- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12:2153-2165.
- Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Standaert ML, Lea-Currie R, Sen A, Farese RV (2002) Protein kinase C- ζ mediates insulin effects on glucose transport in cultured pre-adipocyte-derived human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:716-723.
- Bassett AS, Chow EW, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb GD, Gatzoulis MA (2005) Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 138:307-313.
- Battaglia A (2005) Del 1p36 syndrome: A newly emerging clinical entity. *Brain Dev* 27(5):358-361.
- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, Zuberi SM, Carey JC (2008) Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable

- phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 121:404-410.
- Battaglia A, Shaffer LG (2008) 1p36 deletion syndrome (Monosomy 1p36 Syndrome). In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2009. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [March 25, 2009].
- Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K, Govaerts K, Vandenreijt K, Niel F, Blanc P, Stevenson RE, Fryns JP, Marynen P, Schwartz CE, Froyen G (2008) Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* 18:847-858.
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG (2005) Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A* 134:259-267.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580.
- Biegel JA, White PS, Marshall HN, Fujimori M, Zackai EH, Scher CD, Brodeur GM, Emanuel BS (1993) Constitutional 1p36 deletion in a child with neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 52:176-182.
- Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O (2006) Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J Med Genet* 43:822-828.
- Cassidy SB, Driscoll DJ (2009) Prader–Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:3-13.
- Chen E, Obolensky E, Rauen KA, Shaffer LG, Li X (2008) Cytogenetic and array CGH characterization of de novo 1p36 duplications and deletion in a patient with congenital cataracts, hearing loss, choanal atresia, and mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 146A(21):2785-2790.
- Colmenares C, Heilstedt HA, Shaffer LG, Schwartz S, Berk M, Murray JC, Stavnezer E (2002) Loss of the SKI proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain dependent defects in Ski $-/-$ mice. *Nat Genet* 30:106–109.
- D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CIE, Varela MC, Koiffmann CP (2006) Prader-willi-like phenotype: Investigation of 1p36 deletion in 41 patients

- with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. *Eur J Med Genet* 49(6):451-460.
- D'Angelo CS, Jehee FS, Koiffmann CP (2007) An inherited atypical 1 Mb 22q11.2 deletion within the DGS/VCFS 3 Mb region in a child with obesity and aggressive behavior. *Am J Med Genet Part A* 143A:1928-1932.
- D'Angelo CS, Gajecka M, Kim CA, Gentles AJ, Glotzbach CD, Shaffer LG, Koiffmann CP (2009) Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements. *Hum Genet* (doi:10.1007/s00439-009-0650-9).
- Deb S. Self-injurious behaviour as part of genetic syndromes (1998) *Br J Psychiatry* 172:385-388.
- Deem A, Barker K, Vanhulle K, Downing B, Vayl A, Malkova A (2008) Defective break-induced replication leads to half-crossovers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179:1845-1860.
- Delrue MA, Michaud JL (2004) Fat chance: genetic syndromes with obesity. *Clin Genet* 66:83-93.
- Dykens EM (2001) Introduction to the Special Issue on Behavioral Phenotypes. *Am J Ment Retard* 106(1):1-3.
- Dykens EM, Roof E (2008) Behavior in Prader-Willi syndrome: relationship to genetic subtypes and age. *J Child Psychol Psychiatry* 49(9):1001-1008.
- Dykens EM, Smith AC (1998) Distinctiveness and correlates of maladaptive behaviour in children and adolescents with Smith-Magenis syndrome. *J Intellect Disabil Res* 42(6):481-489.
- Elsea SH, Girirajan S (2008) Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:412-421.
- Eugster EA, Berry SA, Hirsch B (1997) Mosaicism for deletion 1p36.33 in a patient with obesity and hyperphagia. *Am J Med Genet* 70:409-412.
- Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM (2001) Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 3(6):416-421.
- Fernandez L, Lapunzina P, Pajares IL, Criado GR, Garcia-Guereta L, Perez J, Quero J, Delicado A (2005) Higher frequency of uncommon 1.5-2 Mb deletions found in familial cases of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 136:71-75.

- Fitzgibbon GJ, Clayton-Smith J, Banka S, Hamilton SJ, Needham MM, Dore JK, Miller JT, Pawson GD, Gaunt L (2008) Array comparative genomic hybridisation-based identification of two imbalances of chromosome 1p in a 9-year-old girl with a monosomy 1p36 related phenotype and a family history of learning difficulties: a case report *J Med Case Reports* 2:355.
- Flint J (1998) Behavioral phenotypes: conceptual and methodological issues. *Am J Med Genet* 81:235–240.
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanello R, Cao A, Wood WG, Ayyub H, Higgs DR (1994) Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet* 55:505–512.
- Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dode C, Vignes B, Horsley SW, Kearney L, Buckle VJ, Ayyub H, Higgs DR (1996) Chromosomal stabilization by a subtelomeric rearrangement involving two closely-related Alu elements. *Hum Mol Genet* 5:1163–1169.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, Mc Dermid HE (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-140.
- Fyffe S, Neul J, Samaco R, Chao H, Ben-Shachar S, Moretti P, McGill B, Goulding E, Sullivan E, Tecott L (2008) Deletion of *Mecp2* in *Sim1*-Expressing Neurons Reveals a Critical Role for MeCP2 in Feeding Behavior, Aggression, and the Response to Stress. *Neuron* 59(6):947–958.
- Gabellini D, Green MR, Tupler R (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110:339-348.
- Gajecka M, Gentles AJ, Tsai A, Chitayat D, Mackay KL, Glotzbach CD, Lieber MR, Shaffer LG (2008) Unexpected complexity at breakpoint junctions in phenotypically normal individuals and mechanisms involved in generating balanced translocations *t*(1;22)(p36;q13). *Genome Res* 18:1733-1742.
- Gajecka M, Glotzbach CD, Jarmuz M, Ballif BC, Shaffer LG (2006) Identification of cryptic imbalance in phenotypically normal and abnormal translocation carriers. *Eur J Hum Genet* 14:1255-1262. (a)
- Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:346-356.

- Gajecka M, Pavlicek A, Glotzbach CD, Ballif BC, Jarmuz M, Jurka J, Shaffer LG (2006) Identification of sequence motifs at the breakpoint junctions in three t(1;9)(p36.3;q34) and delineation of mechanisms involved in generating balanced translocations. *Hum Genet* 120:519-526. (b)
- Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen 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.
- Garcia-Minaur S, Fantes J, Murray RS, Porteous ME, Strain L, Burns JE, Stephen J, Warner JP (2002) A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet* 39:e62.
- Giraudeau F, Aubert D, Young I, Horsley S, Knight S, Kearney L, Vergnaud G, Flint J (1997) Molecular-cytogenetic detection of a deletion of 1p36.3. *J Med Genet* 34:314-317.
- Girardeau F, Taine L, Bianca-Lana V, Delobel B, Journel H, Missirian C, Lacombe D, Bonneau D, Parent P, Aubert D, Hauck Y, Croquette M F, Toutain A, Mattei M G, Loiseau H A, David A, Vergnaud G (2001) Use of a highly polymorphic minisatellite probes for the identification of cryptic 1p36.3 deletion in a large collection of patients with idiopathic mental retardation. *J Med Gen* 38:121-125.
- Goldmuntz E (2005) DiGeorge syndrome: new insights. *Clin Perinatol* 32:963-978.
- Griffin CS, Thacker J (2004) The role of homologous recombination repair in the formation of chromosome aberrations. *Cytogenet Genome Res* 104(1-4):21-27.
- Gropman AL, Elsea SC, Duncan WC Jr, Smith AC (2007) New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol* 20(2):125-134.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics* (doi:10.1186/1755-8417-1-4).
- Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A (2001) Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet* 27:293-298.
- Haber JE (2000) Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16:259-264.

- Hain D, Leversha M, Campbell N (1980) The ascertainment and implications of an unbalanced translocation in the neonate. Familial 1:15 translocation. *Aust Paediatr J* 16:196-200.
- Harris JC (2001) Behavioral phenotypes of neurodevelopmental disorders: portals into the developing brain. In Davis, KL Coyle, JT, Charney, D and Nemeroff C. (eds.), *Psychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*, American College of Psychopharmacology, Nashville, TN.
- Hastings PJ, Ira G, Lupski JR (2009) A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *PLoS Genet* 5(1): e1000327. doi:10.1371/journal.pgen.1000327.
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet* 64:310-316. (b)
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003) Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1200-1212. (a)
- 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.
- Hessl D, Tassone F, Cordeiro L, Koldewyn K, McCormick C, Green C, Wegelin J, Yuhas J, Hagerman RJ (2008). Brief Report: Aggression and Stereotypic Behavior in Males with Fragile X Syndrome—Moderating Secondary Genes in a “Single Gene” Disorder. *J Autism Dev Disord* 38:184–189.
- Ho PS, Ellison MJ, Quigley GJ, Rich A (1986) A computer aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences. *Embo J* 5:2737–2744.
- Holland AJ, Whittington JE, Butler J, Webb T, Boer H, Clarke D (2003) Behavioural phenotypes associated with specific genetic disorders: evidence from a population-based study of people with Prader-Willi syndrome. *Psychol Med* 33:141–153.
- Howard PJ, Porteus M (1990) Deletion of chromosome 1p: a short review. *Clin Genet* 37:127-131.

- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9):949-51.
- Iascone MR, Vittorini S, Sacchelli M, Spadoni I, Simi P, Giusti S (2002) Molecular characterization of 22q11 deletion in a three-generation family with maternal transmission. *Am J Med Genet* 108:319-321.
- Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G (2004) Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* 104:14-20.
- Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Bolor H, Taniguchi M, Shaikh TH, Emanuel BS, Kurahashi H (2009) Chromosomal instability mediated by non-B DNA: Cruciform conformation and not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. *Genome Res* 19:191-198.
- Inoue K, Lupski JR (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:199-242.
- Inoue K, Osaka H, Thurston VC, Clarke JTR, Yoneyama A, Rosenbarker L, Bird TD, Hodes ME, Shaffer LG, Lupski JR (2002) Genomic rearrangements resulting in *PLP1* deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. *Am J Hum Genet* 71:838–853.
- Keppler-Noreuil KM, Carrol AJ, Finley WH, Rutledge SL (1995) Chromosome 1p terminal deletion: Report of new findings and confirmation of two characteristic phenotypes. *J Med Genet* 32(8):619-622.
- Knight SJ, Flint J (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37(6):401-409.
- Knight SJL, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DLN, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67:320-332.
- Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Tessa H, Winter RM, Bolton P, Flint J (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354:1676-1681.
- Knight-Jones E, Knight S, Heussler H, Regan R, Flint J, Martin K (2000) Neurodevelopmental profile of a new dysmorphic syndrome associated with submicroscopic partial deletion of 1p36.3. *Dev Med Child Neurol* 42:201-206.

- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, 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(12):892-899.
- Kozul R, Caburet S, Dujon B, Fischer G (2004) Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO J* 23:234-243.
- Kurahashi H, Nakayama T, Osugi Y, Tsuda E, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I (1996) Deletion mapping of 22q11 in CATCH22 syndrome: identification of a second critical region. *Am J Hum Genet* 58:1377-1381.
- Kurahashi H, Tsuda E, Kohama R, Nakayama T, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I (1997) Another critical region for deletion of 22q11: a study of 100 patients. *Am J Med Genet* 72:180-185.
- Kurosawa K, Kawame H, Okamoto N, Ochiai Y, Akatsuka A, Kobayashi M, Shimohira M, Mizuno S, Wada K, Fukushima Y, Kawawaki H, Yamamoto T, Masuno M, Imaizumi K, Kuroki Y (2005) Epilepsy and neurological findings in 11 individuals with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev* 27:378-382.
- Lamb J, Harris PC, Wilkie AO, Wood WG, Dauwerse JG, Higgs DR (1993) De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)_n in the alpha thalasaemia/mental retardation syndrome (ATP-16). *Am J Hum Genet* 52:668-676.
- Ledbetter DH (1992) Minireview: Cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 51:451-456.
- Ledbetter DH, Martin CL (2007) Cryptic telomere imbalance: A 15-year update. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:327-334.
- Lee JA, Carvalho CMB, Lupski JR (2007) A DNA Replication Mechanism for Generating Nonrecurrent Rearrangements Associated with Genomic Disorders. *Cell* 131:1235-1247.
- Lee JA, Lupski JR (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 52:103-121.
- Lee ML, Tsao LY, Wang BT, Lee MH, Chiu IS (2004) Revisit on a distinctive chromosome 1p36 deletion syndrome: report of one case and review of the English literature. *Int J Cardiol* 96(3):477-480.

- Linardopoulou EV, Williams EM, Fan Y, Friedman C, Young JM, Trask BJ (2005) Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 437(7055):94-100.
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14(10):417-422.
- Lupski JR (2007) Structural variation in the human genome. *N Engl J Med* 356(11):1169-1171.
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1(6):e49.
- Madduri N, Peters SU, Voigt RG, Llorente AM, Lupski JR, Potocki L (2006) Cognitive and adaptive behavior profiles in Smith-Magenis syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 27:188–192.
- Mansour WY, Schumacher S, Roskopf R, Rhein T, Schmidt-Petersen F, Gatzemeier F, Haag F, Borgmann K, Willers H, Dahm-Daphi J (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 36:4088–4098.
- Markham NR, Zuker M (2008) *in* Bioinformatics: Structure, functions and applications, UNAFold: Software for nucleic acid folding and hybridization, *ed* Keith, J.M.(Humana Press, Totowa, NJ), Vol. 2, *pp* 1–31.
- Mc-Donald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 Deletion Syndrome. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2009. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [20 July 2006].
- Mefford HC, Trask BJ (2002) The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet* 3(2):91-102.
- Milner KM, Craig EE, Thompson RJ, Veltman MWM, Thomas NS, Roberts S, Bellamy M, Curran SR, Sporikou CMJ, Bolton PF (2005) Prader-Willi syndrome: intellectual abilities and behavioural features by genetic subtype. *J Child Psychol Psychiatry* 46:1089–1096.
- Moog U, Arens YH, van Lent-Albrechts JC, Huijts PE, Smeets EE, Schrandt-Stumpel CT, Engelen JJ (2005) Subtelomeric chromosome aberrations: still a lot to learn. *Clin Genet* 68(5):397-407.

- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616.
- Murnane JP (2006) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair* 5:1082-1092.
- Murphy KC (2004) The behavioural phenotype in velo-cardio-facial syndrome. *J Intellect Disabil Res* 48(6):524–530.
- Nelson RJ, Chiavegatto S (2001) Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci* 24(12):713-719.
- Neumann BLM, Polster T, Spantzel T, Bartsch O (2004) Unexpected death of a 12-year-old boy with monosomy 1p36. *Genet Counsel* 15(1):19–26.
- Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, Simionati B, Nigro V, Cardazzo B, Patarnello T, Valle G, Danieli GA (2002) Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet* 110:418–421.
- Nyhan WL (1971) Behavioral phenotypes in organic genetic disease: presidential address to the Society for Pediatric Research. *Pediatr Res* 6:1-9.
- O'Brien G (2006) Behavioural phenotypes: causes and clinical implications. *Adv Psychiatr Treat* 12:338-348.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1999) *Hes1* and *Hes5* as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18:2196-2207.
- Page SL and Shaffer LG (1997) Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. *Nat Genet* 15:231–232.
- Philippe A, Boddaert N, Vaivre-Douret L, Robel L, Danon-Boileau L, Malan V, de Blois MC, Heron D, Colleaux L, Golse B, Zilbovicius M, Munnich A (2008) Neurobehavioral profile and brain imaging study of the 22q13.3 deletion syndrome in childhood. *Pediatr* 122(2):e376-382.
- Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays* 28(5):495–503.
- Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CMB, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee JA, Lewis RA, Mendoza-Londono R, Robbins-Furman P, Shaw C, Shi X, Weissenberger G, Withers M, Yatsenko SA, Zackai EH, Stankiewicz P, Lupski JR (2007) Characterization of Potocki-Lupski syndrome

- (dup(17)(p112p112)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet* 80: 633-649.
- Prasad SE, Howley S, Murphy KC (2008) Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 14:26–34.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL (2006) Subtelomere FISH, analysis of 11, 688 cases: An evaluation of the frequency, pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478-489.
- Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, Lascorz J, Huffmeier U, Weyand M, Singer H, Hofbeck M (2005) Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet* 42:871-876.
- Redon R, Rio M, Gregory SG, Cooper RA, Fiegler H, Sanlaville D, Banerjee R, Scott C, Carr P, Langford C, Cormier-Daire V, Munnich A, Carter NP, Colleaux L (2005) Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or "deletion with positional effect" syndrome? *J Med Genet* 42:166–171.
- Ricchetti M, Dujon B, Fairhead C (2003) Distance from the chromosome end determines the efficiency of double strand break repair in subtelomeres of haploid yeast. *J Mol Biol* 328:847-862.
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet* 16:276–277.
- Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecq K, Herens C, Verloes A, Schinzel A (2001) Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109(3):286-294.
- 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.
- Riha K, Heacock ML, Shippen DE (2006) The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu Rev Genet* 40:237-277.
- Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O, Cormier-Daire V, Amiel J, Lyonnet S, Le Merrer M, De Blois M.-C., Prieur M, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L (2004) Automated fluorescent genotyping detects 10% of

- cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet* 39:266–270.
- Roberts AE, Cox GF, Kimonis V, Lamb A, Irons M (2004) Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature. *Am J Med Genet* 128A(4):352–363.
- Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Mallolas J, Carrio A, Pedrinaci S, Barrionuevo JL, Mila M (2004) Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 65(1):17-23.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF (2006) Diverse chromosome breakage mechanisms underlie subtelomeric rearrangements, a common cause of mental retardation. *Hum Mutat* 28:177-182.
- Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E (1993) Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Nat Acad Sci* 90:8342-8346.
- Sandlin CJ, Dodd BS, Dumars KW, Bartley JA, Bernstein R, Lamb A (1995) Phenotypes associated with terminal deletion of the short arm of chromosome 1. *Am J Hum Genet Suppl* 57:A125.
- Sankaranarayanan K, Wassom JS (2005) Ionizing radiation and genetic risks XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic disorders. *Mutat Res* 578:333-370.
- 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:e57.
- 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, McCaskill C, Han JY, Choo KH, Cutillo DM, Donnemfeld AE, Weiss L, Van Dyke DL (1994) Molecular characterization of de novo secondary trisomy 13. *Am J Hum Genet* 55:968–974.

- 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, Lupski JR (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 13(Spec no. 1):R57–R64
- Shaw CJ, Lupski JR (2005) Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* 116(1-2):1-7.
- Sheen CR, Jewell UR, Morris CM, Brennan SO, Férec C, George PM, Smith MP, Chen JM (2007) Double complex mutations involving F8 and FUNDC2 caused by distinct break-induced replication. *Hum Mutat* 28:1198-1206.
- Shema R, Sacktor TC, Dudai Y (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317:951-953.
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare 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.
- Shifman S, Levit A, Chen ML, Chen CH, Bronstein M, Weizman A, Yakir B, Navon R, Darvasi A (2006) A complete genetic association scan of the 22q11 deletion region and functional evidence reveal an association between DGCR2 and schizophrenia. *Hum Genet* 120:160-170.
- Skuse DH (2000) Behavioural phenotypes: what do they teach us? *Arch Dis Child* 82:222–225.
- Slager RE, Newton TL, Vlangos CN, Finucane B, Elsea SH (2003) Mutations in RAI1 associated with Smith–Magenis syndrome. *Nat Genet* 33:466–468.
- Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-smith J, Kingston H, Campbell RHA, Flint J, Donnai D, Biesecker L (1999) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* 36:405-11. (a)
- Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK (1999) Monosomy 1p36. *J Med Genet* 36(9):657-663. (b)

- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18(2):74-82.
- Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, Elizondo L, Park SS, Lupski JR (2003) Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet* 72(5):1101-1116.
- Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP (2000) Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 97:128-135.
- Tan TY, Bankier A, Slater HR, Northrop EL, Zacharin M, Savarirayan R (2005) A patient with monosomy 1p36, atypical features and phenotypic similarities with cantu syndrome. *Am J Med Gen* 139A(3):216-220.
- Tarpey P, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slauch R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M (2007) Mutations in CUL4B, Which Encodes a Ubiquitin E3 Ligase Subunit, Cause an X-linked Mental Retardation Syndrome Associated with Aggressive Outbursts, Seizures, Relative Macrocephaly, Central Obesity, Hypogonadism, Pes Cavus, and Tremor . *Am J Hum Genet* 80(2):345-352.
- Tonk VS, Wilson GN, Yatsenko SA, Stankiewicz P, Lupski JR, Schutt RC, Northup JK, Velagaleti GV (2005) Molecular cytogenetic characterization of a familial der(1)del(1)(p36.33)dup(1)(p36.33p36.22) with variable phenotype. *Am J Med Genet A* 139(2):136-140.
- Toffolatti L, Cardazzo B, Nobile C, Danieli GA, Gualandi F, Muntoni F, Abbs S, Zanetti P, Angelini C, Ferlini A, Fanin M, Patarnello T (2002) Investigating the Mechanism of Chromosomal Deletion: Characterization of 39 Deletion Breakpoints in Introns 47 and 48 of the Human Dystrophin Gene. *Genomics* 80(5):523-530.
- Torisu H, Yamamoto T, Fujiwaki T, Kadota M, Oshimura M, Kurosawa K, Akaboshi S, Oka A (2004) Girl with monosomy 1p36 and Angelman syndrome due to unbalanced der(1) transmission of a maternal translocation t(1;15)(p36.3.3;q13.1). *Am J Med Genet* 131A:94-98.

- Valdovinos MG (2007) Brief review of current research in FXS: Implications for treatment with psychotropic medication. *Res Dev Disabil* 28(6):539-545.
- Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP (2005) Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet* 67:47–52.
- Varela MC, Simões-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, De Castro CIE, Koiffmann CP (2006) A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader–Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur J Med Genet* 49(4):298-305.
- Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ (2000) Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by De novo telomere addition. *Am J Hum Genet* 67:610-22.
- Walz K, Paylor R, Yan J, Bi W, Luspki JR (2006) Rai1 duplication causes physical and behavioral phenotypes in a mouse model of dup(17)(p11.2p11.2). *J Clin Invest* 116:3035-3041.
- Wargowski D, Sekhon G, Laxova R, Thompson K, Kent C (1991) Terminal deletions of band 1p36: emergence of two overlapping phenotypes. *Am J Hum Genet Suppl* 49:278.
- Webb T, Whittington J, Clarke D, Boer H, Butler J, Holland A (2002) A study of the influence of different genotypes on the physical and behavioral phenotypes of children and adults ascertained clinically as having PWS. *Clin Genet* 62:273–281.
- Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B, Jasin M (2006) Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair* 5:1065-1074.
- Weksberg R, Stachon AC, Squire JA, Moldovan L, Bayani J, Meyn S, Chow E, Bassett AS (2007) Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome. *Hum Genet* 120:837-845.
- Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18:114-124.
- Wilkie AO, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR (1990) A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalasaemia is stabilized by the addition of telomeric repeats (TTAGGG)_n. *Nature* 346:868–871.

- 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.
- Wu Y, 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(2):313-321.
- 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.
- 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(17):2145-2152.
- Zenker M, Rittinger O, Grosse K-P, Speicher MR, Kraus J, Rauch A, Trautmann U (2002) Monosomy 1p36-a recently delineated, clinically recognizable syndrome. *Clin Dysmorphol* 11:43-48.
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* 5:94-98.
- Zhang X, Zhu J, Yang G-Y, Wang Q-J, Qian L, Chen Y-M, Chen F, Tao Y, Hu H-S, Wang T, Luo Z-G (2007) Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nature Cell Biol* 9:743-754.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela II: “SALSA MLPA P147 1p36 probemix”.

Localização cromossômica	MV35*	Sondas	Sítio de ligação	Tamanho (nt)
1p36.33	0.9	HES4 4691-L4069	ATTAACGAGA-GCCTCGCTCA	148
1p36.33	0.9	G1P2 4689-L4452	AGCGAACTCA-TCTTTGCCAG	196
1p36.33	1.0	AGRN 4687-L4065	CCTCATCTGT-GACAACCAGG	229
1p36.33	1.18	TNFRSF4 2269-L1761	CGGCCAGCAA-TAGCTCGGAC	130
1p36.33	1.18	TNFRSF18 2270-L4450	GGTTTCTCAC-TGTGTTCCCT	310
1p36.33	1.20	CAB45 2271-L2327	GTCTTCCTAG-GCAAGGACCT	136
1p36.33	1.26	SCNN1D 4692-L4070	TGACGAAGCT-GTGATTCACA	202
1p36.33	1.32	DVL1 4688-L4066	GACGAGGAGG-AGACGCCGTA	265
1p36.33	1.8	GNB1 2890-L2511	AAGATCGGAA-GATGAGTGAG	178
1p36.33	2.0	GABRD 4690-L4068	GCGACTACGT-GGGCTCCAAC	160
1p36.33	2.2	SKI 2891-L2359	CGAGAAGAAG-ATGAAAGAGG	436
1p36.32	2.4	PEX10 4678-L4057	TGGCTGGAGT-GGAGGAAGGA	301
1p36.32	2.48	FLJ10782 (PANK4) 1122-L0680	ATTCAACGGT-ACAGCACAAA	247
1p36.32	2.54	TNFRSF14 4693-L4071	ATACCCTCAT-TCACGGGGAG	346
1p36.32	2.96	ARPM2 4694-L4072	ACGTGGAGAG-ACTCTGGAAG	190
1p36.32	3.3	PRDM16 4703-L4081	GGACGTGGAA-GTGTCGCCCC	472
1p36.32	3.6	TP73 1682-L1262	GACCCGGGTG-TCAGGAAAGA	328
1p36.32	3.8	DFFB 4696-L4074	CACATTGTCT-GCCATAAGAA	319
1p36.32	4.7	SHREW1 4704-L4082	ATAGCCATGT-TTCAGCTCGC	214
1p36.31	5.9	NPHP4 4700-L4078	ATGAACGACT-GGCACAGGAT	283
1p36.31	6.2	ICMT 4698-L4076	GCTATGCCCT-GACAGTGTGG	238
1p36.31-23	7.2	CAMTA14695-L4073	TGAGCTGGCT-GGCCAGTTAT	364
1p36.23	7.9	TNFRSF9 2185-L1683	TCCTCAACTT-TGAGAGGACA	400
1p36.23	8.0	PARK7 2189-L2365	AGCAGCGAAC-TGCGACGATC	454
1p36.23	8.3	DNB5 4697-L4075	ACGGGGTGAT-GTACTTCTCC	391
1p36.22	10.2	KIF1B 4680-L4059	CAGTGAAGGT-GGCTGTCCGG	463
1p36.22	10.2	KIF1B 4682-L4451	TGGGGTCCTT-TTGCAGGCCC	222
1p36.22	11.2	FRAP1 4679-L4058	CAACGCAAGT-TGAGCTGCTC	274
1p36.22	11.8	MTHFR 4684-L4062	ACTTCCCACT-GGACAACTGC	427
1p36.22	11.8	MTHFR 4683-L4061	CGAAGCCAGA-GGAAACAGCA	409
1p36.22	11.9	PLOD 4685-L4063	ATGGCAGCGA-GTACCAGTCT	337
1p36.22	12.2	TNFRSF1B 0553-L0122	CTCAGAGAAT-ACTATGACCA	166
1p36.21	13.8	RIZ1 3423-L4457	CATTGGGCGA-CGGCGCAGGG	379
1p36.22	13.8	PRMD2 4702-L4080	GACCTTCCTT-CCACTCTTAC	355
1p36.22	15.6	CASP9 2880-L2347	TCGAGAAGAT-TGTGAACATC	184
1p36.12	22.7	EPHA8 3279-L2346	GTACCAGGTT-TGCAACGTCA	445

* Posição no “MapView build 35”, NCBI. Distância relativa da seqüência detectada pela sonda ao telômero de 1p.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela III: “SALSA MLPA KIT P036-E1 HUMAN TELOMERE-3”.

Localização cromossômica	Sondas	Tamanho (nt)	MV36*
1p	TNFRSF4 2269-L01761	130	01-001.14
2p	ACPI 2274-L08758	137	02-000.25
3p	CHL1 1721-L01329	144	03-000.34
4p	FLJ20265 2005-L02047	151	04-000.50
5p	PDCD6 1723-L01327	158	05-000.37
6p	IRF4 1724-L02048	165	06-000.34
7p	CENTA1 2275-L02049	172	07-000.93
8p	FBXO25 2397-L01845	179	08-000.40
9p	DMRT1 1727-L02050	186	09-000.84
10p	KIAA0934 2277-L01768	194	10-000.48
11p	RIC-8 3315-L02733	202	11-000.20
12p	SLC6A12 2276-L01767	208	12-000.17
“13p”	PSPC1 2399-L01847	218	13-019.24 (Acrocêntrico)
“14p”	HEI10 1732-L01318	226	19.9 (Acrocêntrico)
“15p”	MKRN3 7291-L08858	234	15-021.36 (Acrocêntrico)
16p	POLR3K 1734-L01316	242	16-000.04
17p	RPH3AL 1735-L01315	250	17-000.17
18p	USP14 1736-L02051	258	18-000.19
19p	CDC34 1737-L01313	266	19-000.49
20p	SOX12 2396-L01844	274	20-000.26
“21p”	RBM11 1739-L01311	282	21-014.51 (Acrocêntrico)
“22p”	BID 1740-L01310	290	22-016.61 (Acrocêntrico)
X/Yp	SHOX 1148-L01331	298	X/Y-000.52 (região PAR)
1q	KIAA1720 2392-L02149	306	01-247.08 (0.2 Mb do telômero)
2q	CAPN10 1742-L01308	314	02-241.18 (1.6 Mb do telômero)
3q	BDH 2013-L02052	322	03-198.76 (0.7 Mb do telômero)
4q	TRIML2 12050-L11446	330	04-189.26 (2.0 Mb do telômero)
5q	GNB2L1 3319-L02737	338	05-180.60 (0.2 Mb do telômero)
6q	PSMB1 1746-L01304	346	06-170.69 (0.5 Mb do telômero)
7q	VIPR2 1747-L01303	354	07-158.60 (0.3 Mb do telômero)
8q	KIAA0150 1748-L01302	362	08-144.69 (1.6 Mb do telômero)
9q	EHMT1 8205-L08170	370	09-139.83 (0.2 Mb do telômero)
10q	PAO 9142-L09953	378	10-135.05 (0.2 Mb do telômero)
11q	KIAA0056 1751-L01299	386	11-133.60 (1.2 Mb do telômero)
12q	ZNF10 2687-L02154	394	12-132.24 (0.2 Mb do telômero)
13q	F7 1753-L01297	402	13-112.82 (1.3 Mb do telômero)
14q	MTA1 2778-L02201	410	14-105.00 (1.3 Mb do telômero)
15q	ALDH1A3 1755-L01295	418	15-099.26 (1.0 Mb do telômero)
16q	GAS11 / GAS8 3201-L02669	426	16-088.63 (0.2 Mb do telômero)
17q	TBCD 1757-L01293	434	17-078.45 (0.5 Mb do telômero)
18q	FLJ21172 1758-L01292	442	18-075.90 (0.2 Mb do telômero)
19q	BC-2 9143-L10626	450	19-063.75 (0.9 Mb do telômero)
20q	OPRL1 2688-L02884	458	20-062.19 (0.2 Mb do telômero)
21q	HMT1 2586-L02059	466	21-046.89 (0.1 Mb do telômero)
22q	RABL2B 1762-L08761	474	22-049.55 (0.1 Mb do telômero)
X/Yq	SYBL1 1763-L02150	482	X/Y-154.78 (região PAR; 0.1 Mb do tel.)

*Posição no “MapView build 36”, NCBI.
PAR, pseudoautosomal region.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela IV: “SALSA MLPA kit P064 Mental Retardation-1”.

Síndromes	Localização	Sondas	Tamanho (nt)
Monossomia 1p36	1p36	TNFRSF18 3050-L01762	382
Monossomia 1p36	1p36.33	TNFRSF4 2269-L1761	130
Monossomia 1p36	1p36.33	SCNN1D 6778-L06730	136
Monossomia 1p36	1p36.33	GNB1 2890-L07968	178
Monossomia 1p36	1p36	SKI 2891-L02359	436
Monossomia 1p36	1p36.33	FLJ10782 (Pank4) 1122-L00680	247
Monossomia 1p36	1p36	TP73 1682-L02331	337
Sotos	5q35.3	NSD1, exon 4 2589-L11228	142
Sotos	5q35.3	NSD1, exon 12 2594-L02065	445
Sotos	5q35.3	NSD1, exon 17 1303-L00855	211
Saethre-Chotzen	7p21	TWIST 1969-L02364	319
--	7p21.2	TWISTNB 2146-L01642	202
Williams	7q11.23	FZD9 1330-L00881	256
Williams	7q11.23	STX1A 1332-L00883	292
Williams	7q11.23	ELN, exon 1 close to startcodon 1333-L00876	310
Williams	7q11.23	LIMK1 1337-L02333	391
Williams	7q11.23	CYLN2 1561-L01133	229
Williams	7q11.23	CYLN2 1339-L00885	418
PWS/AS	15q11.2	MKRN3 2020-L01539	172
PWS/AS	15q11.2	NDN 2024-L01542	220
PWS/AS	15q12	UBE3A 4620-L00863	160
PWS/AS	15q12	UBE3A 9669-L00864	400
PWS/AS	15q12	GABRB3 2038-L02330	409
Miller-Dieker	17p13.3	HIC1 1444-L02367	364
Miller-Dieker	17p13.3	HIC1 1435-L00945	184
Miller-Dieker	17p13.3	METT10D (MGC3329) 1924-L08393	427
Miller-Dieker	17p13.3	PAFAH1B1 1443-L08394	238
Miller-Dieker	17p13.3	PAFAH1B1 1925-L01477	283
Miller-Dieker/ Canavan disease	17p13.3	ASPA 1325-L07456	265
Miller-Dieker	17p13.3	TRPV1 1472-L00946	148
Alagille	20p12.2	JAG1 1697-L02329	346
Alagille	20p12.2	JAG1 3072-L02472	472
Smith-Magenis	17p11.2	TAC1 / TNFRSF13B 1448-L00932	166
Smith-Magenis	17p11.2	LRRC48 1452-L00936	274
Smith-Magenis	17p11.2	LLGL1 1453-L00937	301
Smith-Magenis	17p11.2	PRPSAP2 1454-L00938	328
Smith-Magenis	17p11.2	MFAP4 1455-L00939	355
Digeorge	22q11.21	CLTCL1 5462-L05809	190
Digeorge	22q11.21	CDC45L 5463-L05808	463
Digeorge	22q11.21	CLDN5 1218-L06270	196
Digeorge	22q11.21	ARVCF 5465-L06731	154
Digeorge	22q11.21	FLJ14360 (KLHL22) 3069-L05815	454
Digeorge	22q11.21	SNAP29 1235-L00773	373

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela V: Marcadores de microssatélites mapeados em 1p36.

Marcador	Mb*	Seqüência	Anneling	Produto PCR	Nível heterozigose
D1S243	2.1	F'CACACAGGCTCACATGCC R' GCTCCAGCGTCATGGACT	57°C	142-170 pb	87,4
D1S171	2.5	F'GTTTCCAGGCTGCAGGAAGAC R'CCCACATGTACACATGCACA	62°C	~243 pb	87
D1S468	3.5	F'AATTAACCGTTTTGGTCCT R'GCGACACACACTTCCC	57°C	~185 pb	76
D1S2845	4.3	F'CCAAAGGGTGCTTCTC R'GTGGCATTCCAACCTC	57°C	171-223 pb	84,2
D1S2660	4.7	F'CACACATGCACATGCAC R'AGTGACACCAGCAGGG	62°C	253-261 pb	79

*A distância em Mb do telômero de 1p, Ensembl (www.ensembl.org).

A seqüência dos oligonucleotídeos, as temperaturas de *annealing*, os tamanhos dos fragmentos e grau de heterozigose foram obtidas do banco de dados GDB (“The Genome Database”, www.gdb.org/gdb).

Tabela VI: Clones do contígua distal de 1p36 utilizados como sondas em experimentos de FISH.

Clones	Localização*	Clones	Localização*
RP11-5407	1p36.33 chr1:801,394-988,152	RP11-740P5	1p36.32 chr1:2,674,081-2,794,108
RP11-465B22	1p36.33 chr1:986,126-1,117,131	RP4-703E10	1p36.32~31 chr1:5,189,627-5,308,620
RP5-902P8	1p36.33 chr1:1,115,132-1,227,290	CTD-2338G21	1p36.31 chr1:5,306,621-5,326,386
RP1-283E3	1p36.33 chr1:1,609,516-1,720,123	RP1-58B11	1p36.31 chr1:5,457,266-5,479,785
RP3-484O5	1p36.33 chr1:2,012,199-2,059,766	RP11-49J3	1p36.31 chr1:5,866,139-5,966,440
RP11-181G12	1p36.33 chr1:2,062,347-2,242,269	RP11-58A11	1p36.31 chr1:6,485,456-6,587,996
RP4-713A8 [†]	1p36.33 chr1:2,240,270-2,263,787	RP1-126A5	1p36.31 chr1:6,571,374-6,683,531
RP4-740C4 [†]	1p36.33~32 chr1:2,261,788-2,368,113	RP11-242F24	1p36.31 chr1:6,689,444-6,761,263
RP11-361M21 [†]	1p36.32 chr1:2,366,114-2,370,109	RP11-312B8	1p36.31 chr1:6,759,263-6,963,656
RP3-395M20 [†]	1p36.32 chr1:2,368,110-2,522,845	RP11-334N17	1p36.31 chr1:6,961,657-7,023,161
RP4-755G5 [†]	1p36.32 chr1:2,522,760-2,546,655	RP3-505B13	1p36.23 chr1:7,146,893-7,259,359
RP13-436F16 [†]	1p36.32 chr1:2,544,656-2,624,080	RP3-467L1	1p36.23 chr1:7,705,429-7,868,155

*Com base no *browser* genômico UCSC (reunião genômica de Março de 2006).

[†]Clones utilizados também em experimentos de FISH interfásico.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela VII: Clones de outras regiões genômicas utilizados como sondas em experimentos de FISH.

Clones	Localização*	Clones	Localização*
RP11-120E1	9q34.3 chr9:138,072,497-138,123,791	RP11-107G24	1q44 chr1:245,278,398-245,341,820
RP11-442G23	9q34.3 chr9:138,735,803-138,946,311	RP11-488L18	1q44 chr1:245,339,815-245,463,482
RP11-229P13	9q34.3 chr9:138,944,312-139,103,010	RP11-433K2	1q44 chr1:245,461,483-245,673,908
RP11-48C7	9q34.3 chr9:139,459,573-139,634,567	RP11-978I15	1q44 chr1:245,671,986-245,857,452
RP13-467E5	9q34.3 chr9:139,633,668-139,799,808	RP11-656O22	1q44 chr1:245,855,453-245,927,806
RP11-713C19	4q35.2 chr4:189,051,560-189,277,198	WI2-2118C23	1q44 chr1:246,932,402-246,974,833
RP11-1141D18	4q35.2 chr4:189,390,935-189,553,757	GS-160-H23	1q44 chr1:247,115,289-247,115,443
RP11-45F23	4q35.2 chr4:190,520,006-190,668,423		

*Com base no *browser* genômico UCSC (reunião genômica de Março de 2006).

Tabela VIII: Marcadores de STS utilizados para refinamento dos pontos de quebra por “STS marker walking”.

Marcadores	Seqüência dos primers (5'→3')	Tamanho produtos de PCR (pb)	Localização*
Caso 1p139			
181G12.1F	CCAGGGCACATTGTCAGATA	242	2227204-2227445
181G12.1R	CGTTGGCCTCTTTCATCTTC		
181G12.2F	CCCACTCTGTTCTCGTAGCC	220	2233974-2234193
181G12.2R	GGTGGAGTAGACAGGGCAGT		
181G12.4F	AGCTGGGCAAGGTAAGTGTGT	210	2235212-2235421
181G12.4R	GGGATCACAGAATGGGACAG		
181G12.5F	CCTCCCTGTTCTGCTCAGTT	195	2236727-2236920
181G12.5R	TGTCTCATGGTCTCCTGTGG		
181G12.5R(2)	CCACAGGAGACCATGAGACA	376	2236902-2237277
181G12.13R	ACAGGAGAGAGGACACGCAT		
181G12.13R(2)	ATGCGTGTCTCTCTCTCTGT	276	2237258-2237533
181G12.14R	ACTCAGCCCCAGCTCTCTCT		
181G12.14R(2)	AGAGAGAGCTGGGGCTGAGT	306	2237514-2237819
181G12.15R	TGCTGGACACTCCTTCTCCT		
181G12.15R(2)	AGGAGAAGGAGTGTCCAGCA	329	2237800-2238128
181G12.6F(2)	TGAGTAAGCCAGGAGTCGCT		
181G12.6F	AGCGACTCCTGGCTTACTCA	177	2238109-2238285
181G12.11R	CTCTCCCTCTTCGCTCCTG		
181G12.6F	AGCGACTCCTGGCTTACTCA	208	2238109-2238316
181G12.6R	ACCCACCTGACCTGTGTCTC		
181G12.11R(2)	CAGGAGCGAAGAGGGAGAG	134	2238267-2238400
181G12.12R	CAGGACACCCTCCAGACCAT		
181G12.12R(2)	ATGGTCTGGAGGGTGTCTCTG	214	2238381-2238594
181G12.8F(2)	AGCGAAGATGACACCGAAAG		
181G12.8F	CTTTCGGTGTCTCTCTCTGCT	235	2238575-2238809
181G12.8R	TCTGGCAAGCTCACAAACAC		
181G12.9F	CCTTTGGGACCACATCTGTGC	239	2239154-2239392
181G12.9R	CCAGAACCAGTCCCTGAGTG		
181G12.10F	AGTCTGAGGGGAGGGTCACT	169	2239713-2239881
181G12.10R	TCTGTGGAGACAGCCTTGTG		
181G12.7F	AAAAGTCAGCCTCGATGGAC	199	2240300-2240498
181G12.7R	TGGGTTTCCAGTGTGTTGAG		
181G12.3F	GAGGTTCGGTGTAGTTGTGG	180	2257643-2257868

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

181G12.3R	CTCTCCTTGCTCTCCCTTGA		
713A8.1F	CAGGACCCACGTAAGACACA	171	2247561-2247731
713A8.1R	CTCTGCCCCGTTCTCTCAAAG		
713A8.2F	GGCTTCTCTGTGCCTCCTTA	164	2251371-2251534
713A8.2R	GCAATGTGTCCGTTCTCTGA		
713A8.3F	AGGCTCACTGTCTTCCCAGA	226	2241586-2241765
713A8.3R	CCTCCTGCCCAATCTTTCTA		
Caso 1p143			
740C4.1F	GCTGGTAAAGCTGCCAAGAC	233	2264548-2264780
740C4.1R	GGATCAGGAGCAAGATGAGG		
740C4.2F	GAGACTAGGGGCTCTGACCA	242	2279656-2279897
740C4.2R	CCCCATTGTGAGTACGTGTG		
740C4.3F	GCTCTCAATTCCGCTAGTGC	206	2305097-2305302
740C4.3R	GCAACGTCTCAGTGTGAGGA		
740C4.4F	CGCACTCATTAGTCCATTG	205	2326651-2326855
740C4.4R	CATTTCCCTAACCCCAACCT		
740C4.20F	ATCTCCACCTGTGCTCATC	437	2331960-2332396
740C4.20R	GGACAGGAAGAGCATGGGTA		
740C4.20R(2)	TACCCATGCTCTTCCCTGTCC	284	2332377-2332660
740C4.21R	ACTTGGGAGGCTGAGACAGA		
740C4.21R(2)	TCTGTCTCAGCCTCCCAAGT	489	2332641-2333129
740C4.22R	TCAATGAAGCAGCACCTGTC		
740C4.22R(2)	GACAGGTGCTGCTTCATTGA	238	2333110-2333347
740C4.23R	CAAGTGCTTCAAGCCTCCCT		
740C4.23R(2)	AGGGAGGCTTGAAGCACTTG	554	2333328-2333881
740C4.24R	GTCGTGCCGTATCAGTTCT		
740C4.24R(2)	AGAAGTATGACGGCACGAC	423	2333862-2334284
740C4.25R	AGACCAAGCGAAAGCCT		
740C4.25R(2)	AGGCTTTCGCTTGGGICT	208	2334267-2334474
740C4.26R	CTTTTCGCGCAGGATTACTG		
740C4.26R(2)	CAGTAATCCTGCGGAAAAG	439	2334455-2334893
740C4.7F(2)	ATGTACCAGGCATCTCCTGC		
740C4.7F	GCAGGAGATGCCTGGTACAT	194	2334874-2335067
740C4.7R	AGAGGTGAGGCAAGGAACTG		
740C4.7R(2)	CAGTTCCTTGCCTCACCTCT	176	2335048-2335223
740C4.18R	GAGGTTTGGTAGCCAGAGGG		
740C4.7R(2)	CAGTTCCTTGCCTCACCTCT	270	2335048-2335317
740C4.27R	AAGGTGCTCAACCCAATCAG		
740C4.7R(2)	CAGTTCCTTGCCTCACCTCT	381	2335048-2335428
740C4.19R	AGAGCGGCATCTCAAACCTGT		
740C4.7R(2)	CAGTTCCTTGCCTCACCTCT	419	2335048-2335466
740C4.13F(2)	TCCTCAGAATCAGACGTGGA		
740C4.18R(2)	CCCTCTGGCTACCAAACCTC	225	2335204-2335428
740C4.19R	AGAGCGGCATCTCAAACCTGT		
740C4.18R(2)	CCCTCTGGCTACCAAACCTC	263	2335204-2335466
740C4.13F(2)	TCCTCAGAATCAGACGTGGA		
740C4.27R(2)	CTGATTGGGTTGAGCACCTT	131	2335298-2335428
740C4.19R	AGAGCGGCATCTCAAACCTGT		
740C4.19R(2)	ACAGTTTGGAGATGCCGCTCT	266	2335409-2335674
740C4.13R	GAACAGCAGACACTGGGACA		
740C4.13F	TCCACGTCTGATTCTGAGGA	228	2335447-2335674
740C4.13R	GAACAGCAGACACTGGGACA		
740C4.14F	GATTAGGCGGTGAGTTTTGC	154	2335916-2336069
740C4.14R	GGAAGGACATGGAGACCTGA		
740C4.15F	CGCCTTACATCCTTCTGGAG	203	2336725-2336927
740C4.15R	GTGTGAGAGCCCCCTGTAAA		
740C4.16F	GTCTGGGGTCTGGTCACAGT	210	2337042-2337251
740C4.16R	AACTGGGTTTAGCGGAGGAG		
740C4.17F	CAGCCACAAACCAGGAGAAC	250	2337738-23379870
740C4.17R	TTCATCCACCAGCACTTCCT		

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

740C4.8F	AGAGTGCAGAGGGTTGGTGT	230	2338059-2338288
740C4.8R	TCCTGTCTAGCTCCCTCAA		
740C4.9F	TAATTGTCCAGAGGGGATCG	237	2340705-2340941
740C4.9R	GCAAGAAGAGCCAGTGAGGT		
740C4.10F	ATGCTGTGTTGTTCTGGTGC	405	2342175-2342579
740C4.10R	CTCCTTGGGCTTCTCAACAG		
740C4.11F	CAGCTTTCTGTTCTCCCTGG	183	2347293-2347475
740C4.11R	GAAAGGCTCTGATGGGTGAC		
740C4.12F	GCCCCTCTGTGACATCTTTC	155	2348805-2348959
740C4.12R	TCTGACATCCTCCCATCCTC		
740C4.5F	AGCATGGCTCTGTGTGTTTG	202	2350562-2350763
740C4.5R	ACTCTCAGGCCAGCTCCTTT		
740C4.6F	GCTGGGCAGTCTCTTTGAC	193	2364173-2364365
740C4.6R	CCCCACACCAGTCAACTCTT		
Caso 1p142			
242F24.1F	GGAAAGAAGGGGAACCTTTCG	225	6689558-6689782
242F24.1R	AGGCACAACGGAAGAATGAC		
242F24.2F	AATCCCAAGAACGTCACAGG	244	6705389-6705632
242F24.2R	TGCATGAGCAGTTCCTACCA		
242F24.6F	TTAAGACGCAAGGGCAGAGT	174	6713377-6713550
242F24.6R	AGGCAGAACCATGAGGATTG		
242F24.3F	CGGTCACATGGCAAATGTAG	227	6722407-6722633
242F24.3R	TAAAGGAAGGGGTGGTAGGG		
242F24.7F	AGAGTTGGCAGCAGAAGAGG	183	6726304-6726486
242F24.7R	TGGTGCATAGGAGGAAGGAC		
242F24.7R(2)	GTCCTTCCTCCTATGCACCA	244	6726467-6726710
242F24.22R	CTGGGAGGGAGGAACTTCT		
242F24.22R(2)	AGAAGTTTCCTCCCTCCAG	603	6726691-6727293
242F24.23R	GGATCACTTAAGCCTGGGAA		
242F24.23R(2)	TTCCCAGGCTTAAGTGATCC	494	6727274-6727767
242F24.24R	GACACCCGCCAGACTAACAT		
242F24.24R(2)	ATGTTAGTCTGGCGGGTGTG	471	6727748-6728218
242F24.25R	CCTCCCACAGTGTGAGATT		
242F24.25R(2)	AATCTCAGCACTGTGGGAGG	573	6728199-6728771
242F24.8R	CAGGTCTCGCTTTGTACCT		
242F24.8F	TGAGCCCAGGAGTCTGAGAT	218	6728554-6728771
242F24.8R	CAGGTCTCGCTTTGTACCT		
242F24.8F	TGAGCCCAGGAGTCTGAGAT	540	6728554-6729093
242F24.12R	ATGCTGAAGGTGCAGGAACT		
242F24.12F	TGCTAAGGTAGGGCAGCATT	237	6728857-6729093
242F24.12R	ATGCTGAAGGTGCAGGAACT		
242F24.12F	TGCTAAGGTAGGGCAGCATT	456	6728857-6729312
242F24.19R	GTTACCCTGGCAAGCAGCTA		
242F24.13F	GAGGCACACACTTTGGGATT	238	6729258-6729495
242F24.13R	GCACACAGCTCAGACAGCTC		
242F24.19R(2)	TAGCTGCTTGCCAGGGTAAC	203	6729293-6729495
242F24.13R	GCACACAGCTCAGACAGCTC		
242F24.19R(2)	TAGCTGCTTGCCAGGGTAAC	234	6729293-6729526
242F24.20R	CCTCTCCTGGGTTGACTCTG		
242F24.13R(2)	GAGCTGTCTGAGCTGTGTGC	198	6729476-6729673
242F24.18R	CAAGGCTTCAACAGTCAGCA		
242F24.13R(2)	GAGCTGTCTGAGCTGTGTGC	518	6729476-6729993
242F24.14F(2)	ACTCCTGGGACATGGAGATG		
242F24.20R(2)	CAGAGTCAACCCAGGAGAGG	167	6729507-6729673
242F24.18R	CAAGGCTTCAACAGTCAGCA		
242F24.20R(2)	CAGAGTCAACCCAGGAGAGG	487	6729507-6729993
242F24.14F(2)	ACTCCTGGGACATGGAGATG		
242F24.18R(2)	TGCTGACTGTTGAAGCCTTG	148	6729654-6729801
242F24.21R	TTTTCCAACAGCTGAGAG		
242F24.18R(2)	TGCTGACTGTTGAAGCCTTG	340	6729654-6729993

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

242F24.14F(2)	ACTCCTGGGACATGGAGATG		
242F24.21R(2)	CTCTCAGCTGGTTGGGAAAA	212	6729782-6729993
242F24.14F(2)	ACTCCTGGGACATGGAGATG		
242F24.21R(2)	CTCTCAGCTGGTTGGGAAAA	428	6729782-6730209
242F24.14R	CACCACCACCCAGCTAATTT		
242F24.14F	CATCTCCATGTCCCAGGAGT	236	6729974-6730209
242F24.14R	CACCACCACCCAGCTAATTT		
242F24.14F	CATCTCCATGTCCCAGGAGT	682	6729974-6730655
242F24.9R	CTAGGTTAGGCACGGGACAA		
242F24.9F	GGGAGTTAAGCCCTGGAAAC	191	6730465-6730655
242F24.9R	CTAGGTTAGGCACGGGACAA		
242F24.15F	TTCCTCTGCTGCTCTATGATCA	434	6731098-6731531
242F24.15R	TGTCTTACATGGCAGCAGGA		
242F24.16F	TCTTCCCTCTCTGCCCTTTT	334	6731762-6732095
242F24.16R	AGGGGAAGAACGAGAAGAGG		
242F24.17F	CACCTCAACCTTCCCTCTGA	203	6732590-6732792
242F24.17R	AGAAAGACAGCCAGGTGAGG		
242F24.10F	GGGAGTTAAGCCCTGGAAAC	242	6733271-6733512
242F24.10R	GACAGCAAGCCCCTCTATGA		
242F24.11F	CACGAGCATGTGTGACAGTG	239	6735403-6735641
242F24.11R	CACGAGCATGTGTGACAGTG		
242F24.4F	ACACCCGATTTTTCTCCTC	166	6735876-6736041
242F24.4R	CCGTTTCATGGGTTTCTGACT		
242F24.5F	TGTCTCCAGTGCAGGAATTG	221	6753779-6753999
242F24.5R	GGCACTTCTGCCTTTTCAAG		
Caso 1p140			
436F16.1F	CTGAACAGAGCTTCCCTTGG	225	2549413-2549637
436F16.1R	GTGAAGCAGAAGTGGGTGCT		
436F16.2F	GCACTGACCCTTTACCCAGA	249	2561109-2561357
436F16.2R	AGATAGACCCCCTGCCTCTC		
436F16.3F	AAGGGGGCTGATTTCACTCT	250	2569575-2569824
436F16.3R	GTTTCCAGGCACCAAACAAC		
436F16.14F	TCTGGAACAGGACCCCACTA	150	2571782-2571931
436F16.14R	CACCTGAAGGTGCGAAGTGCT		
436F16.13F	CCCCAGGTAAGCATCAGAAA	211	2572368-2572578
436F16.13R	CTGGGATTGGAGAATGCTGT		
436F16.7F	TGAGAACCCTGACATCGTGGA	242	2573951-2574192
436F16.7R	CCTTTGGTTGTGGGTGCT		
436F16.15F	GCCCAGATGAGAATCAGACG	232	2575751-2575982
436F16.15R	CCATTCCTTGCGGTCAGATA		
436F16.17F	GCTCTCACAACCCAGGTTA	157	2576862-2577018
436F16.17R	CAGGCTTTTGGATGCTCA		
436F16.18F	CAACCACAGGTGAACATCAGAG	208	2578517-2578724
436F16.18R	TGGGGGTACTGGTACTGCTC		
436F16.8F	ACCCATACGCCCAGATGA	164	2579916-2580079
436F16.8R	GGTGCTGCTCCAGACCAT		
436F16.9F	CCACACGCACAGGTGAGA	210	2590193-2590402
436F16.9R	GGGATATGGGGTGCTCTTC		
436F16.4F	CATAGCCCAAGGTGAGCATC	210	2593045-2593254
436F16.4R	TGGAGTTCTGGGTGCTGTTT		
436F16.19F	GTTTGCGGCAACACTGACAC	386	2594715-2595100
436F16.19R	GTGGTTGTGTGTGATGCTCC		
436F16.19F	GTTTGCGGCAACACTGACAC	482	2594715-2595196
436F16.29R	GGACAGATGCTCACCTCGAG		
436F16.26F	ATCACATGGCATCCTCACAC	239	2599093-2599331
436F16.26R	AATCAGATGCTCACTGGGG		
436F16.10F	CCACACGCACAGGTGAGA	211	2600148-2600358
436F16.10R	GAGGGTATGGTTGCTGTTCC		
436F16.27F	GTGAGCATCTGATGGTTTGC	268	2603090-2603357
436F16.27R	TGCTGCTCCACAATGTCA		

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

436F16.27R(2)	TGACATTGTGGAGCAGCA	619	2603340-2603958
436F16.28R	CTGCTCCGTGTGTTTCAGATG		
436F16.30F	GAGCAGCTGATATCCTGGAA	229	2605021-2605249
436F16.30R	TGGGTA CTGCTCCAGACCA		
436F16.20F	ATCTGATGGTCTGGAGCAGT	421	2605225-2605645
436F16.20R	CTGCTGCAAACCATCAGATG		
436F16.21F	ATGGAATGGCATCCTCACCT	148	2605918-2606065
436F16.21R	TCACCTGGGGTTTTTGGT		
436F16.22F	GGTGAGCAGCTGATATCCTG	245	2608911-2609155
436F16.22R	TCAACTGTGGGTGTGGGTAA		
436F16.11F	GGTGAACATCCGACATTGTG	193	2609754-2609946
436F16.11R	TGGGTGCTACTCCAGACCAT		
436F16.23F	CATCTGAACTCACGGAGCAG	155	2610926-2611080
436F16.23R	CTGAGGGTGGGGTTTCTGTT		
436F16.16F	GAGCATTTGACCTCCAGAG	310	2611607-2611916
436F16.16R	GTCAGTGTGCTCCAGGATG		
436F16.5F	CATGTGATGGTCTGGAGCAG	265	2615097-2615361
436F16.5R	GGTGCTGTTACGTGCTGTGA		
436F16.12F	AGCAGCACCCACACCAAC	159	2619171-2619329
436F16.12R	CAGCCCGTCAGAGGCTAA		
436F16.6F	AACAGAACCCCACTCTTCCA	232	2623066-2623297
436F16.6R	GATGCTCACGTGTGGGTAGA		
Caso 1p141			
436F16.1F	CTGAACAGAGCTTCCCTTGG	225	2549413-2549637
436F16.1R	GTGAAGCAGAAGTGGGTGCT		
436F16.2F	GCACTGACCCTTTACCCAGA	249	2561109-2561357
436F16.2R	AGATAGACCCCTGCCTCTC		
436F16.3F	AAGGGGGCTGATTTCACTCT	250	2569575-2569824
436F16.3R	GTTTCCAGGCACCAAACAAC		
436F16.14F	TCTGGAACAGGACCCCACTA	150	2571782-2571931
436F16.14R	CACCTGAAGGTGGAAGTGCT		
436F16.13F	CCCCAGGTAAGCATCAGAAA	211	2572368-2572578
436F16.13R	CTGGGATTGGAGAATGCTGT		
436F16.7F	TGAGAACCTGACATCGTGGA	242	2573951-2574192
436F16.7R	CCTTTGGTTGTGGGTGCT		
436F16.15F	GCCCAGATGAGAATCAGACG	232	2575751-2575982
436F16.15R	CCATTCCTTGCGGTCAGATA		
436F16.15F	GCCCAGATGAGAATCAGACG	424	2575751-2576174
436F16.24R	GCTGTCTGATCCTCACTCGC		
436F16.15R(2)	TATCTGACCGCAAGGAATGG	212	2575963-2576174
436F16.24R	GCTGTCTGATCCTCACTCGC		
436F16.24R(2)	GCGAGTGAGGATCAGACAGC	437	2576155-2576591
436F16.25R	TTGTGAGAGCTGTTGCAGGC		
436F16.25R(2)	GCCTGCAACAGCTCTCACAA	310	2576572-2576881
436F16.17F(2)	TAACCTGGGGTTGTGAGAGC		
436F16.25R(2)	GCCTGCAACAGCTCTCACAA	447	2576572-2577018
436F16.17R	CAGGCTTTTGGATGCTCA		
436F16.17F	GCTCTCACAAACCCAGGTTA	157	2576862-2577018
436F16.17R	CAGGCTTTTGGATGCTCA		
436F16.18F	CAACCACAGGTGAACATCAGAG	208	2578517-2578724
436F16.18R	TGGGGGTA CTGGTACTGCTC		
436F16.8F	ACCCATACGCCAGATGA	164	2579916-2580079
436F16.8R	GGTGCTGCTCCAGACCAT		
436F16.9F	CCACACGCACAGGTGAGA	210	2590193-2590402
436F16.9R	GGGATATGGGGTGCTCTTC		
436F16.4F	CATAGCCCAAGGTGAGCATC	210	2593045-2593254
436F16.4R	TGGAGTTCTGGGTGCTGTTT		
436F16.19F	GTTTGCGGCAACACTGACAC	386	2594715-2595100
436F16.19R	GTGGTTGTGTGTGATGCTCC		
436F16.10F	CCACACGCACAGGTGAGA	211	2600148-2600358

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

436F16.10R	GAGGGTATGGTTGCTGTTCC		
436F16.20F	ATCTGATGGTCTGGAGCAGT	421	2605225-2605645
436F16.20R	CTGCTGCAAACCATCAGATG		
436F16.21F	ATGGAATGGCATCCTCACCT	148	2605918-2606065
436F16.21R	TCACCTGGGGTTTTTGGT		
436F16.22F	GGTGAGCAGCTGATATCCTG	245	2608911-2609155
436F16.22R	TCAACTGTGGGTGTGGGTAA		
436F16.11F	GGTGAACATCCGACATTGTG	193	2609754-2609946
436F16.11R	TGGGTGCTACTCCAGACCAT		
436F16.23F	CATCTGAACTCACGGAGCAG	155	2610926-2611080
436F16.23R	CTGAGGGTGGGGTTTCTGTT		
436F16.16F	GAGCATTTGACCTCCCAGAG	310	2611607-2611916
436F16.16R	GTCAGTGTGCTCCAGATG		
436F16.5F	CATGTGATGGTCTGGAGCAG	265	2615097-2615361
436F16.5R	GGTGCTGTTACGTGCTGTGA		
436F16.12F	AGCAGCACCCACACCAAC	159	2619171-2619329
436F16.12R	CAGCCCGTCAGAGGCTAA		
436F16.6F	AACAGAACCCCACTCTTCCA	232	2623066-2623297
436F16.6R	GATGCTCACGTGTGGGTAGA		
Caso 1p05			
3534A6.1F	AAGGCAAGGAGAGGTGGATT	150	5332117-5332266
3534A6.1R	GGTCTTCAGTGGGGAACAGA		
3534A6.2F	GGAGAGGCTGTGTCAAGGAG	511	5334369-5334879
3534A6.2R	ATCTGCTGCTTGGGACAGAC		
2298C19.1F	CAGAACCAGACAGTGCCCTT	581	5385529-5386109
2298C19.1R	CAACATCACTTGAGCCCTCA		
2298C19.2F	AGTGACCAACCAAAGGGACA	199	5393921-5394119
2298C19.2R	AACTCCACCCCAACACAATC		
2298C19.3F	GTGTCTTCCCCTTCTCCACA	215	5408421-5408635
2298C19.3R	TCTATTTCTGGGCTGGGTTG		
2298C19.4F	ACACCGGAAGCATCATCTCT	242	5424347-5424588
2298C19.4R	CTGTTCTCTCCAGCTCCAC		
2298C19.5F	TCTGCAAGCTCCCAGGTTAT	164	5438533-5438696
2298C19.5R	ATGTGCTCAGGTCCTTTGCT		
2298C19.6F	CACAAGTGGAGTCCCCTGTT	178	5446884-5447061
2298C19.6R	TGGATGGGCCTCAGTAATTC		
2298C19.8F	AAACCTCCTCTCCGCTTAG	241	5447788-5448028
2298C19.8R	CTGGCACTGCTTTGGTGATA		
2298C19.9F	CCTTGCTGTCAAAGTGGTTG	150	5448532-5448681
2298C19.9R	TCACTCCCTGGGTCTTGAGT		
2298C19.10F	AGGATTGTCTCACCTGTGG	231	5449295-5449525
2298C19.10R	GAAGGCAAAGGGACTAGGG		
2298C19.11F	TGCTTCAGTTGAGCCATGAG	218	5451774-5451991
2298C19.11R	AGTTCATGATGCCCAAGTC		
2298C19.11R(2)	GACTTGGGGCATCATGAACT	363	5451972-5452334
2298C19.13R	AGAAGACTCAGCAAGCCAGC		
2298C19.13R(2)	GCTGGCTTGCTGAGTCTTCT	377	5452315-5452691
2298C19.14F(2)	CAAAGCCCAGAGGTAGGTG		
2298C19.14F	CACCTACCTCTGGGCTTTTG	242	5452672-5452913
2298C19.14R	TCATCTGCCATTGCTCTCTG		
2298C19.14R(2)	AGAGAGCAATGGCAGATGA	211	5452895-5453105
2298C19.21R	TGTCTTGGGAAAGTGTGTGC		
2298C19.14R(2)	AGAGAGCAATGGCAGATGA	281	5452895-5453175
2298C19.15R	TCTAGGGGAACTAGGAGGGC		
2298C19.21R(2)	GCACACACTTTCCAAGACA	90	5453086-5453175
2298C19.15R	TCTAGGGGAACTAGGAGGGC		
2298C19.21R(2)	GCACACACTTTCCAAGACA	456	5453086-5453541
2298C19.16R	CTACCCACCTGTGTCTCTGT		
2298C19.15R(2)	GCCCTCCTAGTTCCCCTAGA	386	5453156-5453541
2298C19.16R	CTACCCACCTGTGTCTCTGT		

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

2298C19.16R(2)	ACAGGACACAGGTGGGGTAG	300	5453522-5453821
2298C19.17R	AACAGCACCAGGAGGAAATG		
2298C19.17R(2)	CATTTCTCTCTGGTGCTGTT	193	5453802-5453994
2298C19.18R	GTGTGCGTGCATGTTTGTA		
2298C19.18R(2)	TTACAAACATGCACGCACAC	378	5453975-5454352
2298C19.19R	CAGAGCCCACAAAACCATTT		
2298C19.19R(2)	AAATGGTTTTGTGGGCTCTG	456	5454333-5454788
2298C19.20R	AAATGAAACGAAGCGGACAC		
2298C19.20R(2)	GTGTCCGCTTCGTTTCATTT	174	5454769-5454942
2298C19.12F(2)	GGACAACCTCAACGGAACGT		
2298C19.12F	ACGTTCCGTTGAAGTTGTCC	250	5454923-5455172
2298C19.12R	GTGCCAAGGCTAAAAGCAAG		
2298C19.7F	TACCTCACTTTGGGGTCAGC	372	5457328-5457699
2298C19.7R	CTAAGGCTGGAATGTGGGAA		
58B11.1F	ACTATGGCAAAGCCACTGCT	180	5460276-5460455
58B11.1R	TCACTGTCCGGGTTAAGGAC		
58B11.2F	TCACTGGGAGGGGTAACAAG	212	5464992-5465203
58B11.2R	ATGCTCCCAGTTGTCCATTC		

*Posição nucleotídica no browser UCSC In-Silico PCR (reunião genômica de Março de 2006).

Os marcadores de STS foram identificados com o nome do clone em que estão inseridos sem fazer referência a biblioteca genômica pertencentes. A numeração segue a ordem de síntese no decorrer das análises.

Tabela IX: Enzimas de restrição utilizadas nas reações de TOPO[®] Walker.

Enzimas*	Sítios de restrição	Condições [†]
AlwN I	5'...CAGNNN [^] CTG...3' 3'...GTC [^] NNNGAC...5'	Neb 4 37°C
Apa I	5'...GGGCC [^] C...3' 3'...C [^] CCGGG...5'	Neb 4 BSA 25°C
Bgl I	5'...GCCNNNN [^] NGGC...3' 3'...CGGN [^] NNNNCCG...5'	Neb 3 37°C
Bstx I	5'...CCANNNN [^] NTGG...3' 3'...GGTN [^] NNNNNACC...5'	Neb 3 55°C
Nsi I	5'...ATGCA [^] T...3' 3'...T [^] ACGTA...5'	Neb 3 37°C
Nsp I	5'...RCATG [^] Y...3' 3'...Y [^] GTACR...5'	Neb 2 BSA 37°C
Sac I	5'...GAGCT [^] C...3' 3'...C [^] TCGAG...5'	Neb 1 BSA 37°C

*Todas as enzimas de restrição foram obtidas da BioLabs.

[†]As condições utilizadas foram as mesmas sugeridas pelo fabricante.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela X: “Gene Specific *Primers*” (GSPs) utilizados nas reações de TOPO[®] Walker.

<i>Primers</i> GSPs	Sequência (5'→3')	Localização*
Caso 1p139		
181G12.8F(2)	AGCGAAGATGACACCGAAAG	2238575-238594
181G12.12R	CAGGACACCCTCCAGACCAT	2238381-238400
181G12.6R	ACCCACCTGACCTGTGTCTC	2238297-238316
181G12.11R	CTCTCCCTCTTCGCTCCTG	2238267-238286
Caso 1p143		
740C4.14F(2)	GCAAAACTCACCGCCTAATC	2335916-2335935
740C4.13R	GAACAGCAGACACTGGGACA	2335655-2335674
740C4.28R	CCCAGTGTGAATCCAAAGGA	2335479-2335498
740C4.13F(2)	TCCTCAGAAATCAGACGTGGA	2335447-2335466
740C4.19R	AGAGCGGCATCTCAAAGTGT	2335409-2335428
740C4.27R	AAGGTGCTCAACCCAATCAG	2335298-2335317
Caso 1p142		
242F24.29R	ACAGGGGAAGCTTTGAAAGG	6729995-6730014
242F24.14F(2)	ACTCCTGGGACATGGAGATG	6729974-6729993
242F24.28R	CTCTCCCCGGAAACTGTCTT	6729938-6729957
242F24.27R	ATCTTGTCTCAGCTCCATGC	6729909-6729928
242F24.26R	GGCTTGAGCAAGGGTAATGA	6729813-6729832
242F24.21R	TTTTCCAACCAGCTGAGAG	6729782-6729801
Caso 1p05		
2298C19.24R	GGCTGATGTTTCAGGTGGAGT	5453377-5453396
2298C19.23R	TCGGAGAACCCATTGGTAAG	5453328-5453347
2298C19.22R	AAAGCAGTGATGGGAAATGC	5453196-5453215
2298C19.15R	TCTAGGGGAACTAGGAGGGC	5453156-5453175
2298C19.21R	TGTCTTGGGAAAGTGTGTGC	5453086-5453105

*Com base no *browser* genômico UCSC (reunião genômica de Março de 2006).

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela XI: Montagem das reações de TOPO[®] Walker.

<i>Casos</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Primer Extension GSP1</i>	<i>PCR GSP2</i>	<i>Nested PCR GSP3</i>			
1p139	Sac I	181G12.8F(2)	181G12.12R 181G12.6R	181G12.12R 181G12.6R	181G12.6R 181G12.11R		181G12.11R
		181G12.12R	181G12.6R	181G12.11R			
1p143	Sac I Bstx I	740C4.14F(2)	740C4.13R 740C4.28R	740C4.28R 740C4.13F(2)	740C4.13F(2) 740C4.19R	740C4.19R 740C4.27R	740C4.27R
		740C4.13R	740C4.28R 740C4.13F(2)	740C4.13F(2) 740C4.19R	740C4.19R 740C4.27R	740C4.27R	
		740C4.28R	740C4.13F(2) 740C4.19R	740C4.19R 740C4.27R	740C4.27R		
1p142	NspI Nsi I AlwN I Bgl I	242F24.29R	242F24.14F(2) 242F24.28R	242F24.28R 242F24.27R	242F24.27R 242F24.26R	242F24.26R 242F24.21R	242F24.21R
		242F24.14F(2)	242F24.28R 242F24.27R	242F24.27R 242F24.26R	242F24.26R 242F24.21R	242F24.21R	
		242F24.28R	242F24.27R 242F24.26R	242F24.26R 242F24.21R	242F24.21R		
1p05	Nsi I Apa I	2298C19.24R	2298C19.23R 2298C19.22R	2298C19.22R 2298C19.15R	2298C19.15R 2298C19.21R	2298C19.21R	
		2298C19.23R	2298C19.22R 2298C19.15R	2298C19.15R 2298C19.21R	2298C19.21R		

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela XII: Oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências identificadas após os pontos de quebra das deleções.

<i>Primers</i>	<i>Seqüências (5'→3')</i>	<i>Localização original*</i>	<i>Status†</i>
Caso 1p139			
713A8.4F	TGCTACCTCTCCTTTCCCAG	2245951-2245970 Chr1-fita reversa	Prevista
713A8.5F	AAGACTGTGGAAATGGGGTG	2245723-2245742 Chr1-fita reversa	Observada
713A8.6F	CTCCAAGGCCATAAGCACAT	2245687-2245706 Chr1-fita reversa	Observada
713A8.7F	CCTCACTGTGTCGTCTCCAC	2245445-2245464 Chr1-fita reversa	Observada
Caso 1p143			
516D7.1F	TCTCCATCAAAACCCCACTC	189347633-189347652 Chr4-fita reversa	Prevista
516D7.2F	TGAGGACTGACTGGGCTTCT	189347567-189347586 Chr4-fita reversa	Observada
516D7.3F	AGTTGCCATGACTCTGAGGG	189347483-189347502 Chr4-fita reversa	Observada
Caso 1p05			
978I15.1F	CCACTCAGCCCTTGTTTCATT	245829471-245829490 Chr1-fita reversa	Prevista
978I15.2F	ACCGATGCGTTTCTGGTCTA	245829361-245829380 Chr1-fita reversa	Prevista
978I15.3F	AGCTGGCGAAGAGCTTACAA	245828967-245828986 Chr1-fita reversa	Observada

*Com base no browser genômico UCSC, reunião genômica de Março de 2006.

†Observação *in loco* das seqüências nas junções amplificadas por TOPO® Walker ou previstas com base nos dados do seqüenciamento.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Tabela XIII: Combinações de *primers* utilizados em reações de PCR para confirmar as junções dos pontos de quebra clonadas por TOPO[®] Walker.

<i>Primers Forward</i>	<i>Primers GSPs</i>	Tamanho esperados dos produtos de PCR (pb)*
Caso 1p139		
713A8.4F	181G12.11R	696
	181G12.6R	727
	181G12.12R	811
713A8.5F	181G12.11R	468
	181G12.6R	499
	181G12.12R	583
713A8.6F	181G12.8F(2)	777
	181G12.11R	432
	181G12.6R	463
713A8.7F	181G12.12R	547
	181G12.8F(2)	741
	181G12.11R	190
713A8.7F	181G12.6R	221
	181G12.12R	305
	181G12.8F(2)	499
713A8.7F	181G12.8R	714
	Caso 1p143	
	516D7.1F	740C4.18R
740C4.27R		444
740C4.19R		555
516D7.2F	740C4.13R	801
	740C4.28R	625
	740C4.18R	284
516D7.2F	740C4.27R	378
	740C4.19R	489
	740C4.13R	735
516D7.3F	740C4.28R	559
	740C4.18R	200
	740C4.27R	294
516D7.3F	740C4.19R	405
	740C4.13R	651
	740C4.28R	475
Caso 1p05		
978I15.1F	2298C19.21R	905
	2298C19.21R	795
	2298C19.15R	975
978I15.2F	2298C19.21R	401
	2298C19.15R	471
	2298C19.22R	511
978I15.3F	2298C19.23R	643
	2298C19.24R	692
	2298C19.24R	692

*O tamanho dos produtos específicos de PCR foi estimado de acordo com a distância calculada entre os *primers* da seqüência intacta de 1p36 que antecede os pontos de quebra com os *primers* das seqüências observadas ou previstas após os pontos de quebra de cada deleção.

Anexo I – Tabelas Material e Métodos

Anexo II – Figuras Material e Métodos

Legenda das Figuras

Figura 8: Análise de MLPA com o software “MegaBACE Fragment Profiler” utilizando o kit específico da monossomia 1p36 (“SALSA MLPA P147 1p36 probemix”). Os tamanhos específicos em pares de bases dos fragmentos de cada sonda amplificada por PCR são dados no eixo X e as intensidades fluorescentes dos picos são dadas no eixo Y. **(A)** DNA controle **(B)** DNA teste. A análise comparativa da reação controle *vs* teste, revelou diminuição de ~50% dos picos fluorescentes dos produtos de amplificação das sondas indicadas pelas setas pretas e aumento dos picos fluorescentes dos produtos de amplificação das sondas indicadas pelas setas vermelhas.

Figura 9: Validação da análise de MLPA com a planilha da NGRL desenvolvida especificamente para o kit da monossomia 1p36 SALSA P147. As sondas específicas de 1p36 estão representadas em verde no eixo X e ordenadas no sentido do telômero (esquerda) ao centrômero (direita). As sondas em azul são controles internos da reação de MLPA. A média obtida do quociente de dosagem de cada produto de amplificação é dada no eixo Y (“Mean DQ”). O DQ normal de um genoma diplóide (2n) tem um valor ao redor de 1 (~ 0.85-1.15). Portanto, um DQ reduzido pela metade (~0.35-0.65) indica redução do número de cópias para “n”, enquanto um DQ aumentado uma vez e meio (~1.35-1.65) indica ganho do número de cópias para “3n”, e assim sucessivamente. No gráfico, a média dos DQs de cada sonda é indicada pelos valores dentro das caixas azuis e verdes. **(A)** DNA controle **(B)** DNA teste. A planilha confirmou deleção em 11/36 sondas de 1p36 (DQ = 0.45/HES4; DQ= 0,51/GIP2, SCNN1D; DQ = 0.48/AGRN, TNFRSF4, TNFRSF18, CAB45, DVL1, GNB1 e SKI; DQ = 0.49/GABRD, setas azuis), um segmento adjacente proximal triplicado (DQ = 1.95/PEX10, seta vermelha) e outro seguinte duplicado (DQ = 1.47/FLJ10782, seta vermelha).

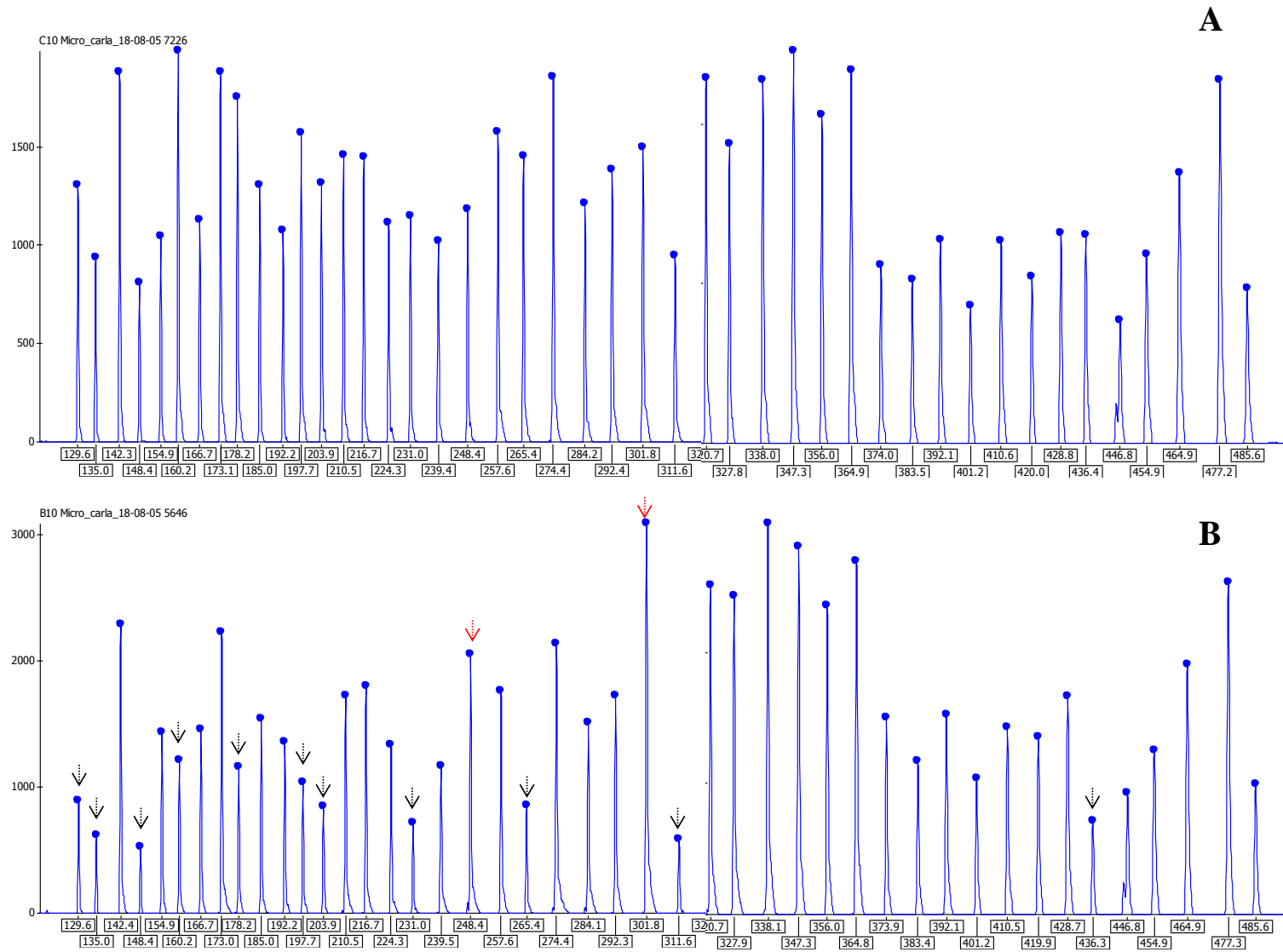
Figura 10: Contíguo distal de 1p36 (Heilstedt *et al.* 2003a). A seqüência genômica do segmento distal de 10.5 Mb de 1p36 está representada por linhas horizontais sólidas, começando das repetições teloméricas. O *tiling path* da região é dado abaixo da seqüência genômica junto do nome dos BACs ou PACs e números de acesso no GenBank. Os clones destacados em azul estão representados no *microarray* “SignatureChip®v.4”. As localizações de marcadores moleculares e microssatélites na região são dadas por pontos pretos na seqüência genômica.

Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 11: Mapas de restrição criados com enzimas que deixam uma extremidade 3' *overhang* e que apresentam sítios específicos ao redor das junções dos pontos de quebra das deleções 1p36.

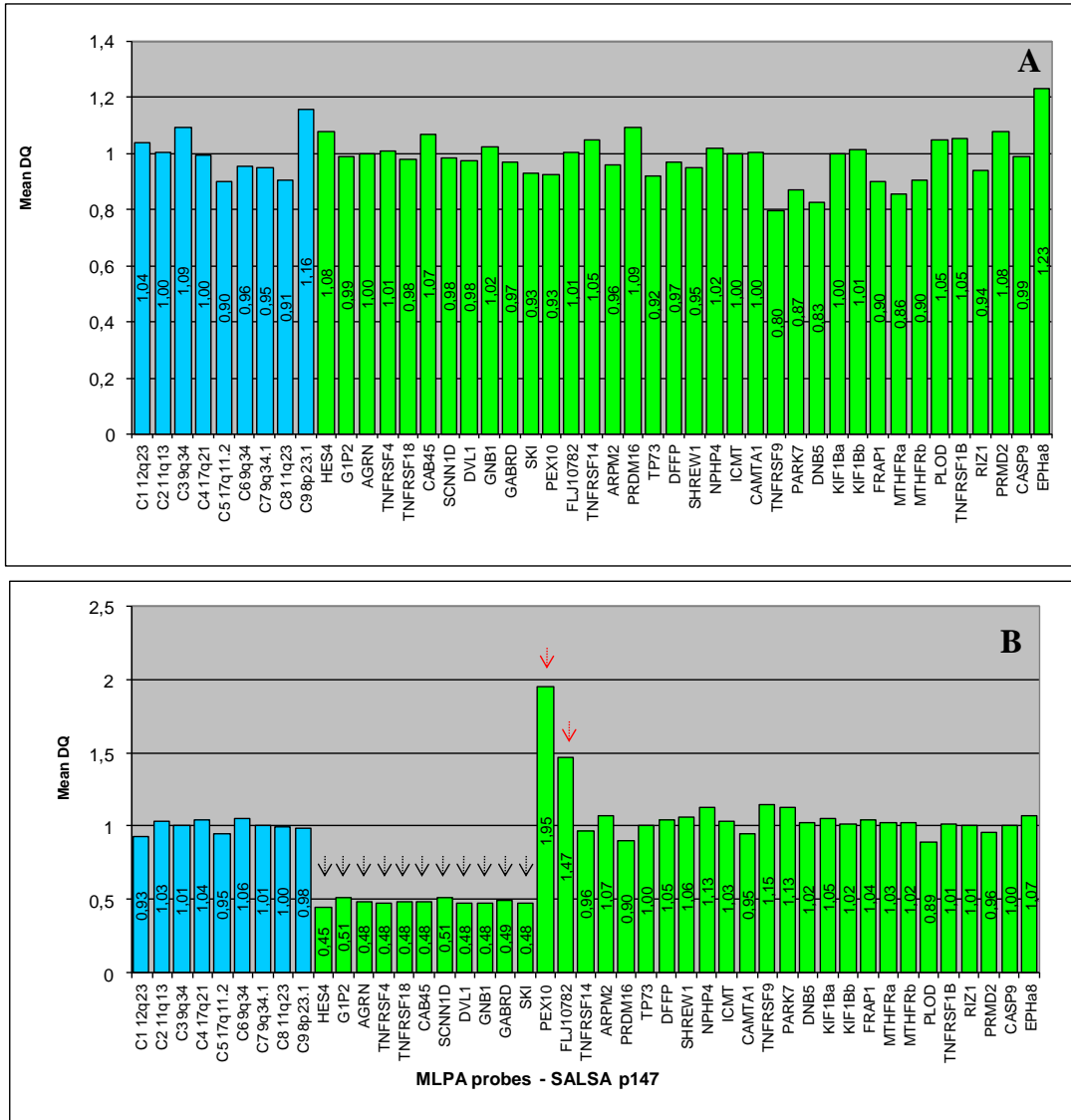
Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 8



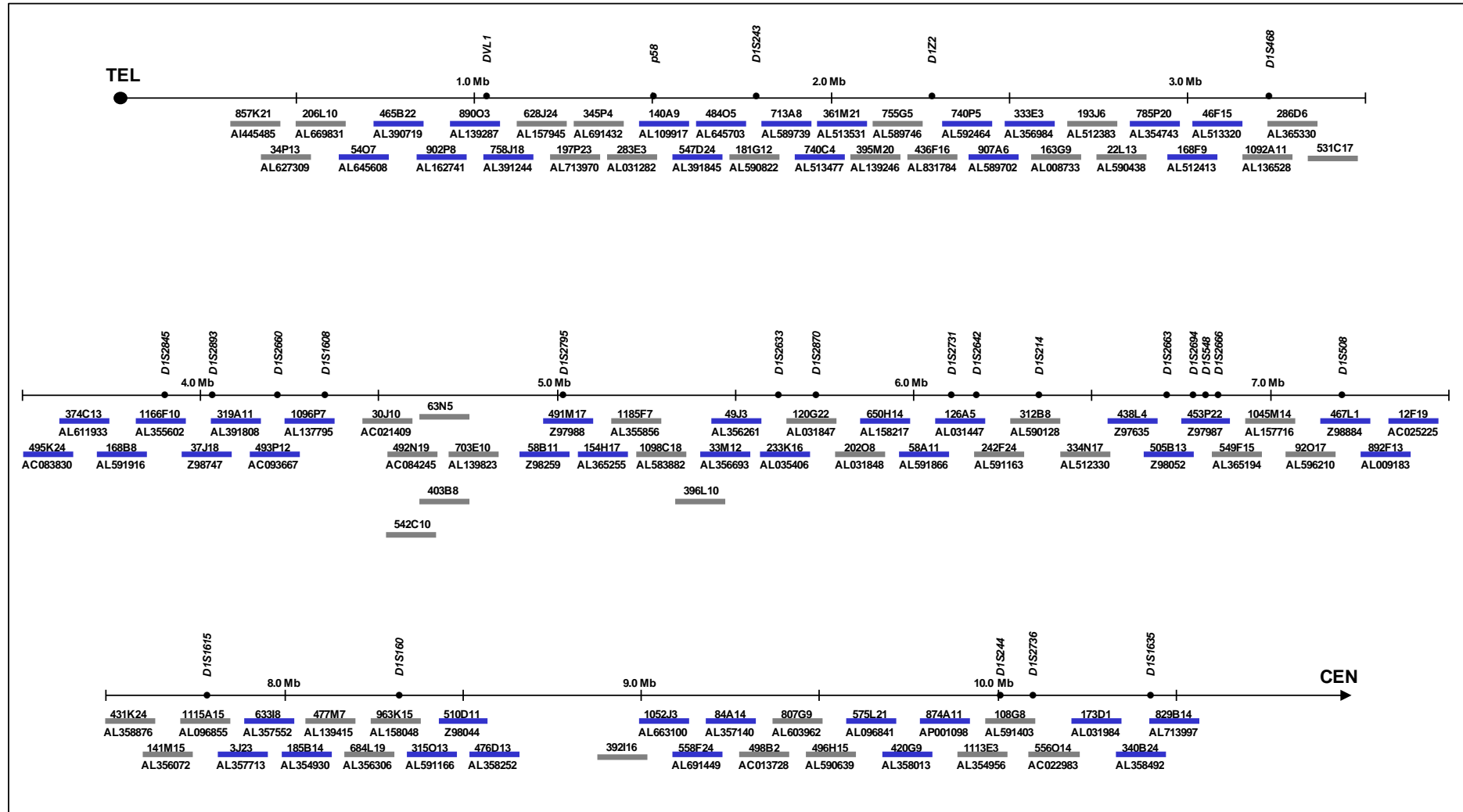
Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 9



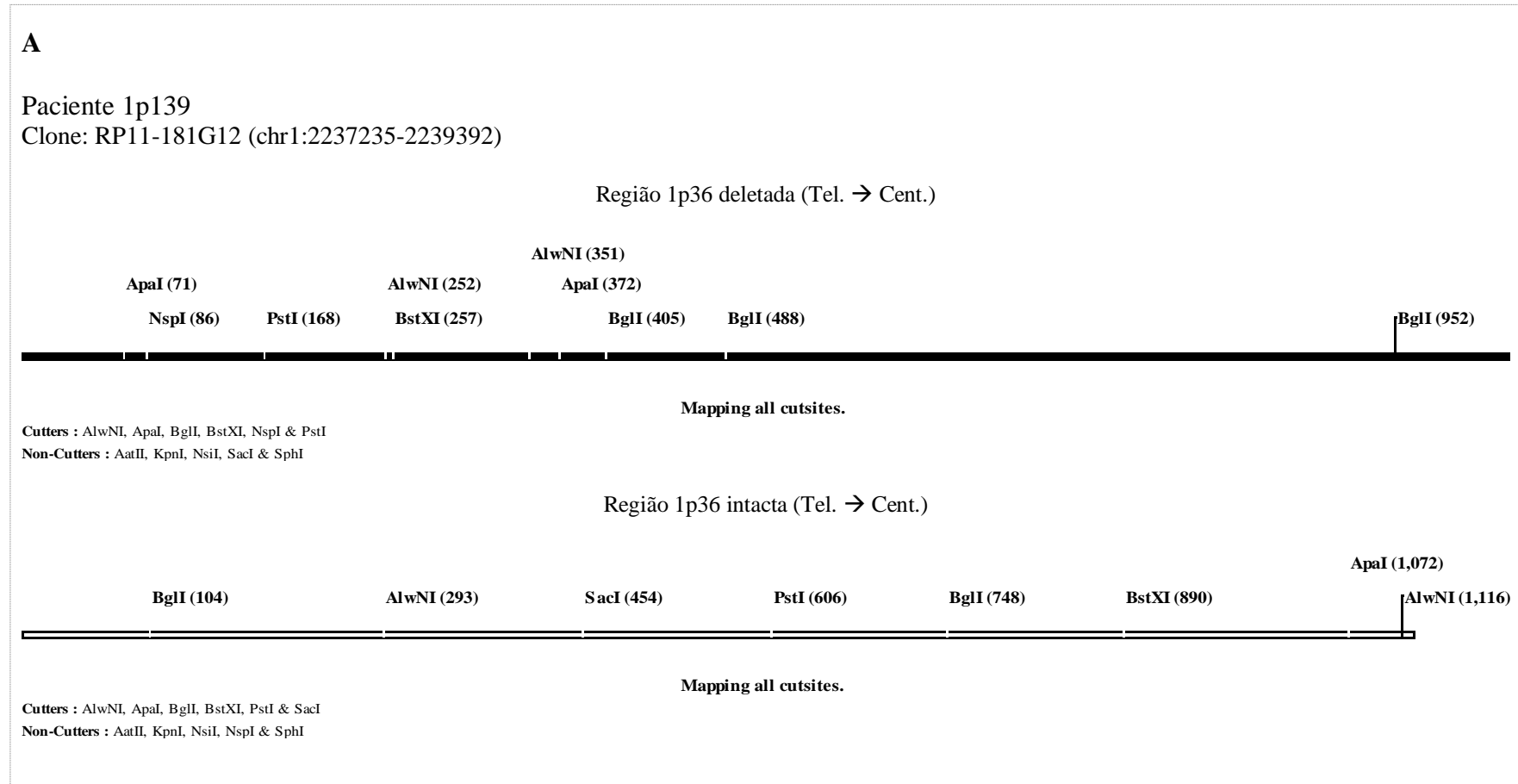
Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 10



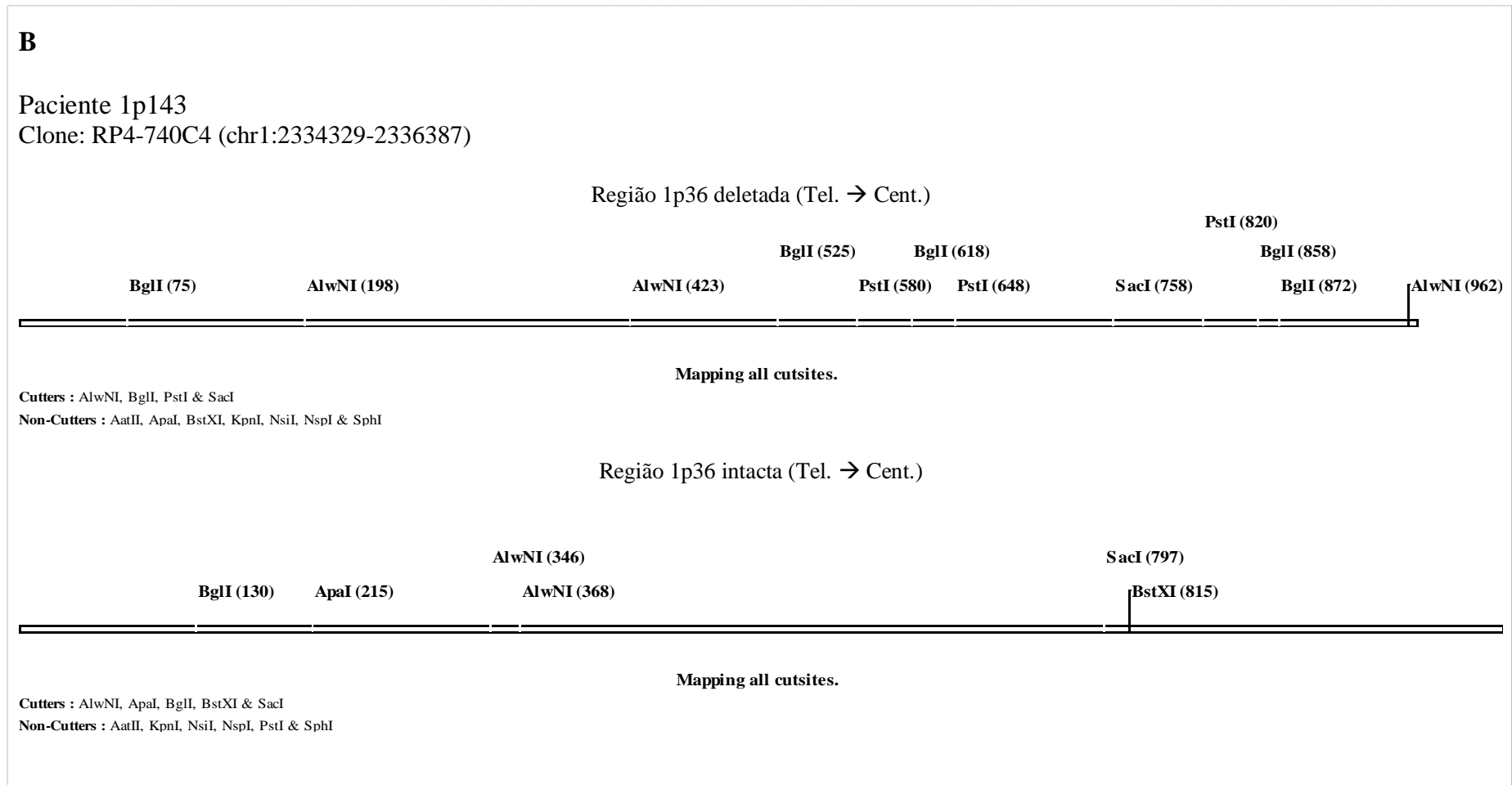
Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 11



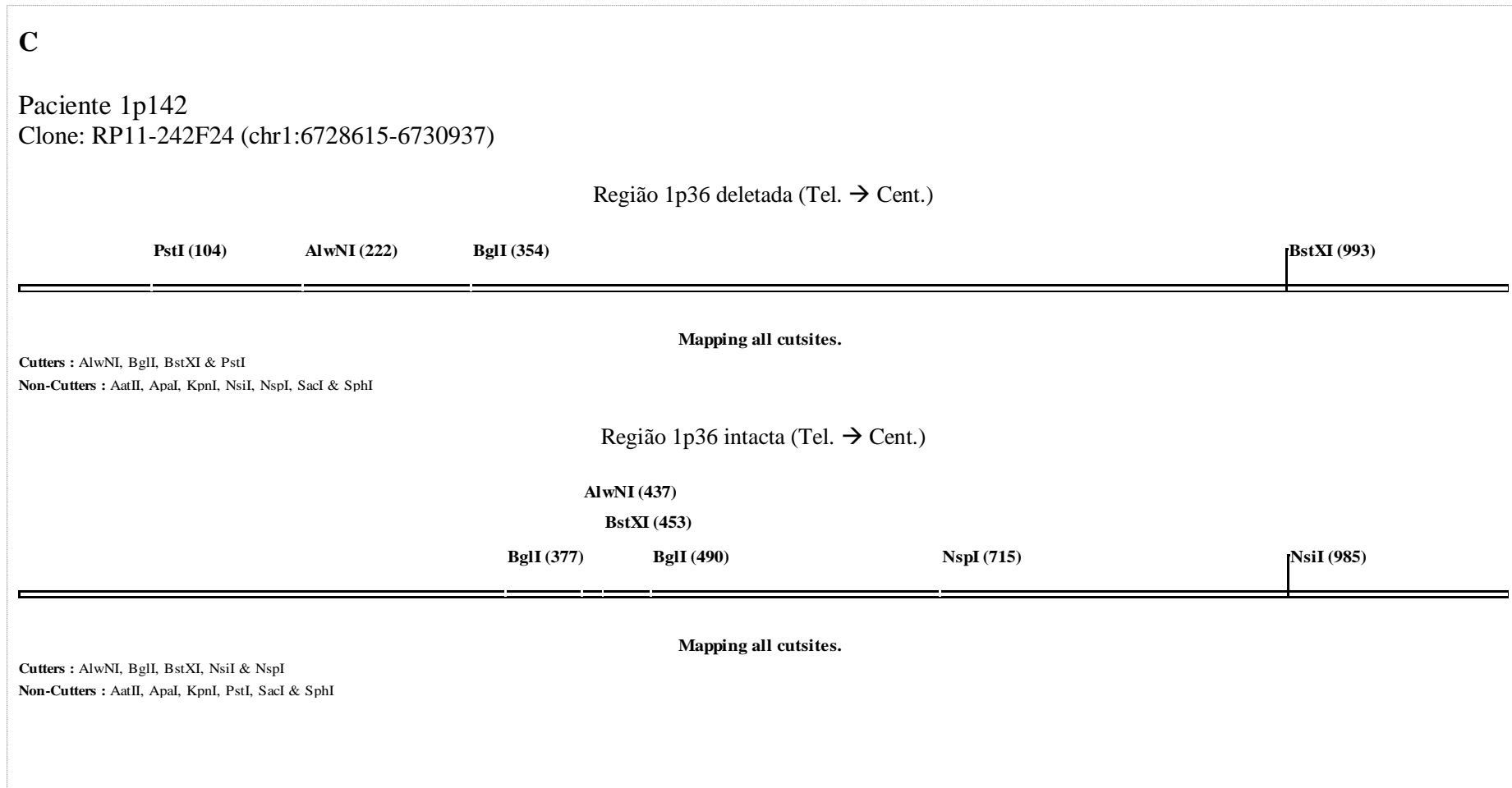
Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 11



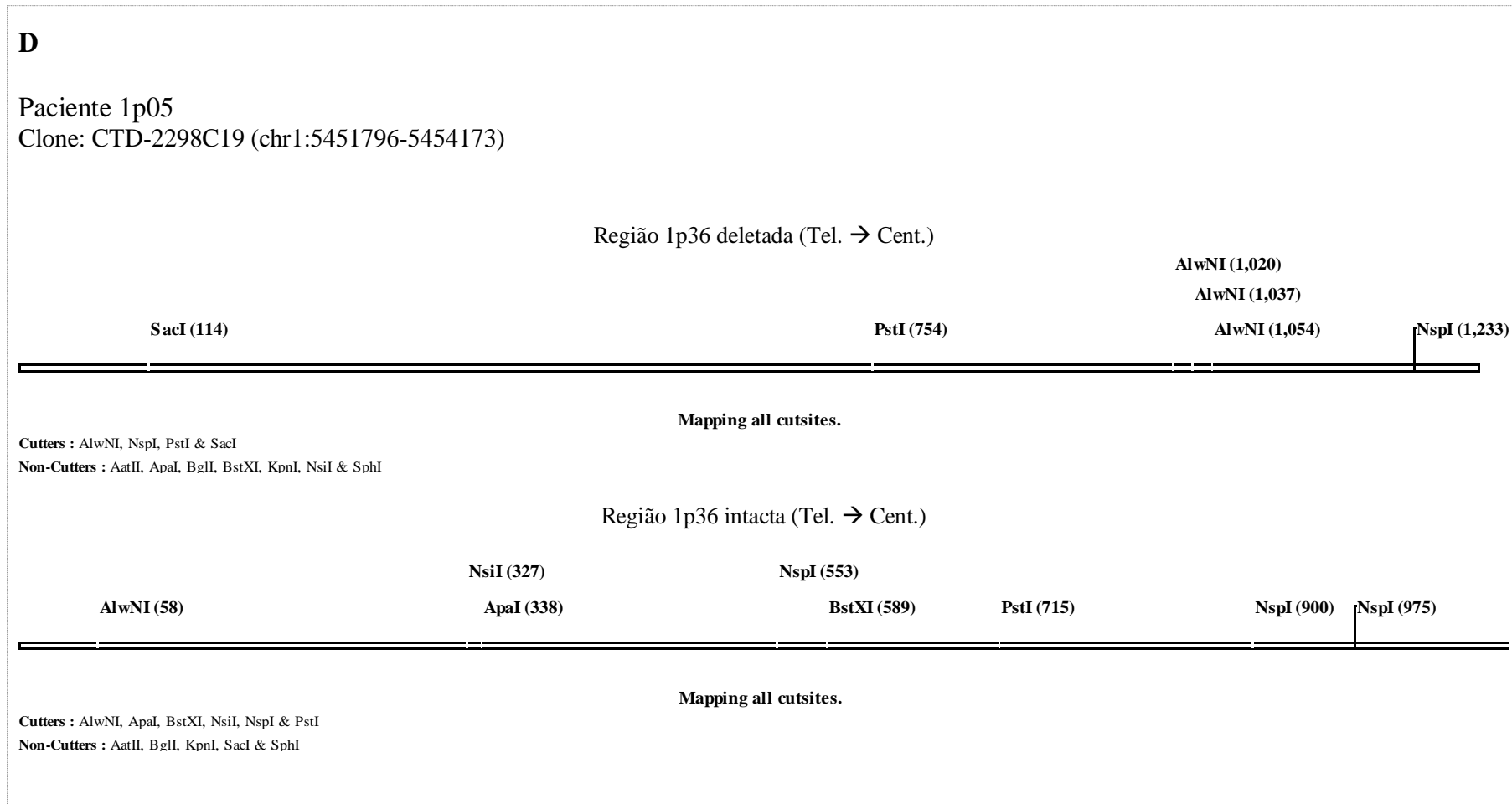
Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 11



Anexo II – Figuras Material e Métodos

Figura 11



Anexo III – Lista de Clones do Microarray



120 N. Pine St., Suite 242C
 Spokane, WA 99202
 509.474.6840 Office
 509.474.6839 Fax
 1.877.SigChip (744.2447)
www.signaturegenomics.com
info@signaturegenomics.com

Clone List
 1 of 3

Based on UCSC May 2004 Assembly of the Human Genome

SignatureChip®												
Chromosome	Band	Number of Clones				Chromosome	Band	Number of Clones				
		V1 - Apr '04	V2 - Oct '04	V3 - Oct '05	V4 - May '06			V1 - Apr '04	V2 - Oct '04	V3 - Oct '05	V4 - May '06	
1	1p36.33	8	8	8	8	5	5p15.33	3	3	3	16	
	1p36.32		17	17	17		5p15.32				6	
	1p36.31		9	9	9		5p15.2	3	3	3	3	
	1p36.23		9	9	9		5p15.1	3	3	3	3	
	1p36.22		12	12	12		5p13.2		6	6	6	
	1p36.21				3		5p13.1		3	3	3	
	1p32.1		3	3	3		5p12	3	3	3	3	
	1p12	3	3	3	3		5q11.1	3	3	3	3	
	1q21.1	3	3	3	3		5q22.1			2	3	
	1q41		6	6	6		5q22.2			3	3	
	1q42.12		3	3	3		5q22.3			3	3	
	1q44	3	3	6	24		5q35.2	3	3	3	3	
2	2p25.3	3	6	6	16	6	6p25.3	3	4	4	12	
	2p25.2				8		6p25.2				6	
	2p21	9	9	9	9		6p25.1				6	
	2p11.2	3	3	3	3		6p25.1				6	
	2q11.1	3	3	3	3		6p23		3	3	3	
	2q13	9	9	9	9		6p21.31		3	3	3	
	2q14.2		6	6	6		6p21.1			4	6	
	2q14.3		3	3	3		6p12.3			2	3	
	2q31.1		6	13	15		6p11.2	3	3	3	3	
	2q31.2		3	3	3		6q12	3	3	3	3	
	2q37.1	9	9	9	9		6q16.2			2	3	
	2q37.3	3	3	3	25		6q16.3			4	6	
3	3p26.3	3	3	3	8		6q21		3	3	3	
	3p26.2				9		6q23.3		3	3	3	
	3p26.1				9		6q27	3	3	3	20	
	3p21.31		9	9	9	7	7p22.3	3	3	3	11	
	3p11.2	3	3	3	3		7p22.2				9	
	3q11.2	3	3	3	3		7p22.1				6	
	3q21.3		3	3	3		7p21.1	9	9	9	9	
	3q22.3				6		7p14.1	6	6	6	6	
	3q23			2	6		7p13	3	3	3	3	
	3q24			5	6		7p11.1	3	3	3	2	
	3q25.1			1	3		7q11.21	3	6	3	3	
	3q26.31		3	3	3		7q11.22	5	5	7	8	
	3q28			7	9		7q11.23	6	6	9	16	
	3q29	3	3	17	29		7q21.3				9	12
4	4p16.3	9	9	9	20		7q36.2	3	3	3	6	
	4p16.2				5		7q36.3	6	6	6	16	
	4p12	3	3	3	3	8	8p23.3	3	5	5	11	
	4q12	3	3	3	3		8p23.2		2	3	20	
	4q25		3	9	9		8p23.1		3	3	3	
	4q31.1		3	3	3		8p22		6	6	6	
	4q35.1				10		8p21.3		3	3	3	
	4q35.2	3	3	3	14		8p11.21	3	3	3	3	
							8q11.21	3	3	3	3	

Anexo III – Lista de Clones do Microarray



120 N. Pine St., Suite 242C
 Spokane, WA 99202
 509.474.6840 Office
 509.474.6839 Fax
 1.877.SigChip (744.2447)
www.signaturegenomics.com
info@signaturegenomics.com

Clone List

2 of 3

Based on UCSC May 2004 Assembly of the Human Genome

SignatureChip®											
Chromosome	Band	Number of Clones				Chromosome	Band	Number of Clones			
		V1 - Apr '04	V2 - Oct '04	V3 - Oct '05	V4 - May '06			V1 - Apr '04	V2 - Oct '04	V3 - Oct '05	V4 - May '06
	8q12.1		3	3	3	12	12p13.33	3	3	3	15
	8q12.2		3	3	3		12p13.32				8
	8q12.3		3	3	3		12p13.1		3	3	3
	8q13.3			9	9		12p12.2		3	3	3
	8q23.3	6	6	6	6		12p11.21	3	3	3	3
	8q24.11	6	6	6	6		12q12	3	3	3	3
	8q24.12	3	3	3	3		12q24.11	3	3	3	3
	8q24.3	3	9	9	32		12q24.13	3	3	3	3
9	9p24.3	3	3	3	12		12q24.21	3	3	3	3
	9p24.2				15		12q24.32				8
	9p24.1				3		12q24.33	3	3	3	14
	9p22.2		3	3	3	13	13q12.11	3	3	3	3
	9p21.1		3	3	3		13q14.2	9	9	9	9
	9p13.2	3	3	3	3		13q32.2	3	3	3	3
	9q21.11	3	3	3	3		13q32.3	3	3	3	3
	9q22.32	6	6	6	6		13q33.1	3	3	3	3
	9q22.33	3	3	3	3		13q33.3				3
	9q34.13				3		13q34	3	3	3	23
	9q34.2				4	14	14q11.2	3	3	3	3
	9q34.3	3	3	3	13		14q13.3		3	3	3
10	10p15.3	4	4	4	18		14q24.3		3	3	3
	10p15.2				1		14q32.31				2
	10p15.1			1	7		14q32.32				11
	10p14	6	6	9	12		14q32.33	3	5	8	19
	10p13	3	3	3	3	15	15q11.2	5	5	5	5
	10p11.21	3	3	3	3		15q13.1	3	3	3	3
	10q11.21	3	3	3	3		15q22.31		3	3	3
	10q22.1		3	3	3		15q26.1			6	6
	10q24.2		3	3	3		15q26.2			4	15
	10q24.31		3	3	3		15q26.3	3	3	6	17
	10q24.32		6	6	6						
	10q26.2				3	16	16p13.3	12	12	12	30
	10q26.3	5	6	6	27		16p12.1	3	3	3	3
11	11p15.5	6	6	6	15		16q12.1	3	3	3	3
	11p15.4	3	3	3	8		16q21		3	3	3
	11p14.1	3	3	3	3		16q22.3		3	3	3
	11p13	15	15	15	11		16q24.1				8
	11p12	10	10	10	12		16q24.2				5
	11p11.2	18	18	17	18		16q24.3	3	3	3	7
	11p11.12				1	17	17p13.3	8	8	8	16
	11q12.1	3	3	3	3		17p13.2	3	3	3	10
	11q13.5		3	3	3		17p12	6	6	3	5
	11q23.1		3	3	3		17p11.2	9	9	9	20
	11q24.3				4		17q11.1	3	3	3	3
	11q25	3	3	5	17		17q11.2	6	6	6	17
							17q24.3			4	6
							17q25.1			2	3
							17q25.3	3	3	3	27

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)

ESTUDO: “Síndromes de Prader-Willi e Angelman: estudo dos mecanismos genéticos, diagnósticos diferenciais e de correlações com os fenótipos clínicos e comportamentais”.

Seu filho está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos realizando. Se concordar com as informações abaixo, por favor, assine o documento, pois só então daremos início à pesquisa.

Eu, portador do RG,
concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a), seja voluntário do estudo “**Síndromes de Prader-Willi e Angelman: estudo dos mecanismos genéticos, diagnósticos diferenciais e de correlações com os fenótipos clínicos e comportamentais**”, esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada () síndrome de Prader-Willi / () síndrome de Angelman e de seus diagnósticos diferenciais;
- II) Será feita a coleta de 10ml de sangue do(a) meu(minha) filho(a) e 10ml do meu sangue para que seja realizado o estudo;
- III) O material colhido está armazenado pelo tempo necessário para a identificação e caracterização do(s) gene(s) ou segmentos cromossômicos responsáveis pela doença genética na minha família;
- IV) A participação neste projeto não tem a finalidade de chegar a um tratamento para os problemas clínicos do meu(minha) filho(a);
- V) Não terei que fazer pagamentos pelos testes realizados para a pesquisa dos diagnósticos diferenciais;
- VI) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VII) A desistência de participar do projeto não irá interferir na realização de outros exames;
- VIII) Os resultados obtidos na pesquisa serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o do meu filho sejam mencionados;

Anexo IV

- IX) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa
- () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa

São Paulo, de de 200.....

Assinatura do Responsável

Pesquisador Responsável pelo Projeto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:.....NºAPTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **SÍNDROME DA MONOSSOMIA 1p36: INVESTIGAÇÃO DE DELEÇÕES EM 1p36 E DE SUAS CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO.**

PESQUISADOR: Dra Chong Ae Kim

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054

UNIDADE DO HCFMUSP: Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: Detectar a presença de perda ou alteração do material genético em amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita de Síndrome de Monossomia 1p36 para se firmar o diagnóstico de certeza dessa doença, entender a relação entre o material genético alterado e as características clínicas do paciente e realizar um aconselhamento genético e seguimento mais adequado.
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: será realizada uma entrevista com os familiares responsáveis para se coletar os dados de paciente e da família, bem como um exame físico. Também será colhida uma amostra de sangue de 10 ml (por uma punção venosa), cujo risco é considerado baixo, incluindo os pais.
3. desconfortos e riscos esperados: apenas os atinentes à coleta de uma amostra de sangue periférico, ou seja, de risco praticamente desprezível.
4. benefícios que poderão ser obtidos: fornecer o diagnóstico de certeza, nos casos positivos, o prognóstico e aconselhamento genético aos pais.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: manejo preventivo (diagnóstico pré-natal) e terapêutico mais adequados.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade das informações fornecidas e advindas dessa pesquisa.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)