Mapowanie w wysokiej rozdzielczości relacji genotyp-fenotyp w zespole Cri du Chat przy użyciu porównawczej hybrydyzacji genomowej z macierzą

Xiaoxiao Zhang, 1 Antoine Snijders, 1,2 Richarda Segravesa, 1 Xiuqing Zhang, 3 Anicie Niebuhr, 4 Donno Albertson, 1,2 Huanming Yang, 5 Joe Gray, 1 Erika Niebuhra, 4 Lars Bolund, 3,5 i Dan Pinkel

₁Kompleksowe Centrum Onkologii i Zakładu Medycyny Laboratoryjnej oraz₂Instytut Badań nad Rakiem, Uniwersytet Kalifornijski w San Francisco, San Francisco;₃Instytut Genetyki Człowieka, Uniwersytet w Aarhus, Aarhus, Dania;₄Instytut Biochemii Medycznej i Genetyki, Uniwersytet Kopenhaski, Kopenhaga; oraz₅Pekiński Instytut Genomiki, Chińska Akademia Nauk, Pekin

Zastosowaliśmy macierzową porównawczą hybrydyzację genomową, aby zmapować zmiany liczby kopii DNA u 94 pacjentów z zespołem cri du chat, którzy zostali dokładnie zbadani pod kątem obecności charakterystycznego płaczu, opóźnienia mowy, dysmorfologii twarzy i poziomu upośledzenia umysłowego (MR). Większość badanych miała proste delecje obejmujące 5p (67 terminalnych i 12 śródmiąższowych). Korelacje genotyp-fenotyp zlokalizowały region związany z płaczem do 1,5 Mb w dystalnym 5p15.31, pomiedzy sztucznymi chromosomami bakteryjnymi (BAC) zawierającymi markery D5S2054orazD5S676;opóźnienie mowy do 3,2 Mb w 5p15.32-15.33, między chromosomami BAC zawierającymiD5S417oraz D55635;a region związany z dysmorfologia twarzy do 2,4 Mb w 5p15.2-15.31, między BAC zawierającymi D55208oraz D552887. Wyniki te pokrywają się i udoskonalają wyniki zgłoszone w poprzednich publikacjach. MR zależało w przybliżeniu od wielkości i lokalizacji delecji 5p, ale było wiele przypadków, w których opóźnienie było nieproporcjonalnie poważne, biorąc pod uwagę delecję 5p. We wszystkich 15 z tych przypadków, około dwóch trzecich pacjentów z ciężkim opóźnieniem, stwierdzono, oprócz delecji 5p, aberracje liczby kopii. Ograniczenie rozważań do pacjentów z tylko delecjami 5p wyjaśniło wpływ takich delecji i zasugerowało obecność trzech regionów, MRI–III, o różnym wpływie na opóźnienie. Delecje obejmujące MRI, obszar 1,2 Mb nakładający się na wcześniej zdefiniowany region krytyczny cri du chat, ale nie obejmujący MRII i MRIII, spowodowały umiarkowany poziom opóźnienia. Delecje ograniczone do MRII, zlokalizowane tuż obok MRI, powodowały łagodniejszy poziom opóźnienia, podczas gdy delecje ograniczone do jeszcze bardziej proksymalnego MRIII nie powodowały dostrzegalnego fenotypu. Jednak MR zwiększył się, gdy delecje, które obejmowały MRI, rozszerzyły się stopniowo na MRII i MRIII, a MR stał się głębszy, gdy wszystkie trzy regiony zostały usunięte.

Wstęp

Delecje na chromosomie 5p prowadzą do różnych wad rozwojowych, przy czym większość przypadków jest klasyfikowana jako zespół cri du chat (MIM 123450) (Niebuhr 1978*a*). Te delecje mogą być terminalne lub śródmiąższowe i czasami występują w kontekście złożonego cytogenetycznie kariotypu (Sreekantaiah i wsp. 1999). Zespół Cri du Chat ma kilka elementów fenotypowych, w tym charakterystyczny płacz, który nadaje zespołowi nazwę, dysmorfologię twarzy, opóźnienie mowy i opóźnienie umysłowe (MR). Kilka wcześniejszych badań powiązało zasięg usuniętego segmentu w 5p z fenotypem (Overhauser i wsp. 1994; Church i wsp. 1997; Marinescu i wsp. 1999*a*; Mainardi i in. 2001). Jednak badania te przyniosły nieco niespójne wyniki i sub-

Otrzymano 23 września 2004 r.; przyjęty do publikacji listopad 22, 2004; opublikowana elektronicznie 4 stycznia 2005 r.

Adres do korespondencji i przedruki: dr Daniel Pinkel, University of California San Francisco, Box 0808, San Francisco, CA 94143. Email: pinkel@cc.ucsf.edu

2005 przez Amerykańskie Towarzystwo Genetyki Człowieka. Wszelkie prawa zastrzeżone.
0002-9297/2005/7602-0018 15,00 USD

kontrowersje dotyczące związku MR z usuniętym regionem. Różnice w wynikach są prawdopodobnie spowodowane kombinacją czynników, w tym niespójną oceną fenotypu przez wielu obserwatorów, brakiem uwzględnienia zależności od wieku znaczenia niektórych cech fenotypowych oraz ograniczeniami technik analitycznych stosowanych do oceny genotypu (Wilkins i wsp. 1983; Church i wsp. 1995; Marinescu i wsp. 1999*a*; Johnson i in. 2000). W niniejszym opracowaniu zajmujemy się wszystkimi tymi potencjalnymi problemami.

Wcześniejsze analizy genotypowe wykorzystywały konwencjonalną cytogenetykę, FISH, markery polimorficzne, a ostatnio także porównawczą hybrydyzację genomową opartą na chromosomach (CGH) (Marinescu i wsp. 1999*b*; Levy i in. 2002) wykrywanie i określanie charakteru aberracji. Konwencjonalna analiza cytogenetyczna zapewnia przegląd całego genomu, ale ma ograniczoną rozdzielczość. W związku z tym granice aberracji mogą być niedokładnie ustalone, małe usunięcia mogą zostać przeoczone, a złożone aberracje niewłaściwie zidentyfikowane. FISH i markery polimorficzne umożliwiają dokładną ocenę aberracji i mapowanie aberracji w stosunku do sekwencji genomu, ale wymagają znacznego wysiłku, ponieważ sondy muszą być oceniane indywidualnie lub w małych grupach. Tak więc badania dużej liczby loci i próbek są bardzo pracochłonne. Chociaż chromosom CGH jest w stanie przeszukiwać cały genom pod kątem zmian liczby kopii DNA w pojedynczej hybrydyzacji, jego rozdzielczość jest ograniczona do~5–10 Mb, a wyników nie można mapować bezpośrednio na sekwencję genomu.

Ostatnio wraz z innymi opracowaliśmy metody wykonywania CGH na mikromacierzach (Solinas-Toldo i wsp. 1997; Pinkel i wsp. 1998; Pollack i wsp. 1999; Snijders i wsp. 2001; Fiegler i wsp. 2003). Nasze macierze wykorzystują elementy macierzy wykonane z klonów genomowych o dużej wstawce, takich jak BACS i PACS, i mają wystarczającą precyzję pomiaru, aby umożliwić niezawodne wykrywanie aberracji pojedynczej kopii wpływających na poszczególne klony. Lokalizacja każdego klonu w sekwencji genomu jest określana przy użyciu znacznika sekwencji, takiego jak STS lub sekwencja końcowa. Rozdzielczość uzyskana z taką macierzą jest określona przez odstępy genomowe między klonami i długość klonu. Rozdzielenie ułamka długości BAC można uzyskać przy użyciu nakładających się klonów (Albertson i wsp. 2000).

W niniejszym badaniu zastosowaliśmy macierzowa CGH do analizy genomowego DNA 94 pacjentów, u których większość, za pomocą konwencjonalnej cytogenetyki i FISH, wykazała delecję w 5p. Te okazy zostały wybrane ze zbioru przypadków z delecjami 5p, które zostały poddane szczegółowej ocenie fenotypowej ze spójnymi kryteriami (Niebuhr 1978b; niepublikowanych wyników autorów), przed naszą analizą. Oceny przeprowadzono w różnym wieku dla większości pacjentów, tak aby fenotyp można było ustalić na etapie rozwoju, w którym jest najlepiej oceniany. Podzbiory tych przypadków zostały uwzględnione we wcześniejszych badaniach korelacji genotyp-fenotyp z efektem delecji 5p (Overhauser i wsp. 1990, 1994; Church i wsp. 1995, 1997). Nasze wyniki pokazują wartość macierzy CGH w ocenie tych pacjentów i pozwalają nam wyjaśnić i udoskonalić korelacje genotyp-fenotyp dla MR, opóźnienia mowy, dysmorfologii twarzy i płaczu w zespole cri du chat.

Metody

Pacjenci z zespołem Cri du Chat

Badani zostali wybrani z grupy1150 pacjentów z delecjami 5p, którzy byli intensywnie badani przez jednego z nas (EN) w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat. Badani byli włączani, jeśli dostępne były szczegółowe dane kliniczne i genomowe DNA. Aby ułatwić dodatkowe badania, przeanalizowaliśmy tylko te osoby, którym wcześniejsze badania dostarczyły wiedzy o rodzicielskim pochodzeniu aberracyjnego chromosomu i hybrydach komórek somatycznych z nieprawidłowym chromosomem 5 i dla których dostępny był rodzinny genomowy DNA. W przypadku większości przedmiotów wyniki zjazdu dostępne były analizy cytogenetyczne. Tabela 1 zawiera listę 94 kwalifikujących się osób i obejmuje ocenę fenotypową, konwencjonalną ocenę cytogenetyczną oraz wyniki macierzy. (Tabela A1 w dodatku A [tylko online] zawiera elektroniczną wersję tabeli 1; można ją otworzyć w programie Microsoft Excel w celu manipulacji danymi i wykreślania.) Numery pacjentów 1–69 odnoszą się do kolejnych (w momencie diagnozy) rodzin duńskich. Osoby z numerami -100 pochodzą z innych krajów — pacjenci 100–117 z Norwegii, pacjenci 201–256 z Anglii, pacjenci 300 z Czechosłowacji i pacjenci 402 z Australii — i zostali skierowani do bardziej szczegółowej oceny klinicznej i cytogenetycznej. Tak więc te przypadki reprezentują quasi-losową próbę osób z delecjami 5p.

Cechy fenotypowe zostały ocenione przez jednego obserwatora (EN), tak aby kryteria klasyfikacji były stosowane jednolicie. Ponieważ aspekty fenotypu mogą się zmieniać podczas rozwoju, większość pacjentów oceniano w wieku <5 lat i ponownie w wieku15 lat. Obecność lub brak cechy fenotypowej oznaczono odpowiednio "Y" lub "N" w tabeli 1. Brak danych oznaczono literą "ND". Ponieważ cechy fenotypowe mogą zależeć od wieku, obecność "Y" dla każdej grupy wiekowej klasyfikowała badanego jako pozytywne dla tej cechy fenotypowej. Na przykład płacz i dysmorfologia twarzy są najbardziej wyraźne, gdy pacjenci są młodzi, więc utrata tych fenotypów w starszej grupie nie została uznana za znaczącą. Kilku pacjentów nie wykazywało określonego fenotypu w jednym przedziale wiekowym (nieobecność oznaczona jako "N"), a dane nie były dostępne w drugim, co powodowało niepewność co do ich statusu fenotypowego. Takie przypadki zostały wyłączone z ustaleń dotyczących związku tej cechy z genotypem. Tak więc pacjenci 18, 45, 56, 112, i 117 nie wykorzystano do określenia regionu płaczu, a pacjentów 56 i 112 nie wykorzystano do określenia regionu genomowego związanego z dysmorfologią twarzy. Do ustalenia regionu opóźnienia mowy nie brano udziału pacjentów z najpoważniejszymi wadami psychicznymi, ponieważ ich zdolność mówienia mogła być upośledzona z innych powodów. Tak więc pacjent 45 nie został wykorzystany do zlokalizowania komponentu mowy fenotypu.

Oceny rozwoju psychomotorycznego określające nasilenie MR były oparte na osobistych obserwacjach (według EN), informacjach pisemnych, testach psychologicznych, informacjach o wynikach w szkole itp. MR jest trudna do oceny u małych dzieci, więc tylko pacjenci z danymi w wieku1Do korelacji MR z delecją wykorzystano 5 lat. Tak więc pacjenci 22, 225 i 231 zostali wykluczeni z tej analizy. Stopień MR wskazywany był za pomocą skali numerycznej, która wahała się od 0 (bez zmian) do 7 (w dużym stopniu



między klonami 48 i 49. Strzałka wskazuje klon 39, który wykazywał stosunki pośrednie między normalnymi a usuniętymi u osobników (panel B); delecja obejmowała klon 39, ale nie obejmowała regionu potwierdza tę duplikację, podobnie jak pewne zamrożenie sekwencji ludzkiego genomu. B, Delecja śródmiąższowa, pacjent 114. Klon 39 (strzałka) również w tym przypadku pokazuje stosunek pośredni. sekwencji. Słupki błędów, które w większości przypadków mają taką samą wielkość jak kropki na rysunku, wskazują SD pomiarów w miejscach powtórzeń dla każdego klonu. Granica delecji występuje wokół klonów 51 i 52. Log2stosunek na klonie 39,-0,4, jest zgodne z delecją od czterech do trzech kopii sekwencji w tym klonie, co sugeruje, że jest ona zduplikowana w ludzkim genomie. Analiza FISH 5p. zaczynając od telomeru po lewej stronie. Pozycje klonów na mapie są pokazane w tabeli 3. Dane są znormalizowane tak, że log2stosunekp0 dla części genomu, które zawierają dwie kopie każdej C.Analiza całego genomu pacjenta 45. Górny panel pokazuje dane dla całego genomu, z klonami wykreślonymi w porządku genomowym. Wykrywane są dwa małe regiony z delecją, z których każdy różniących się od 0 albo wskazują na polimorfizm liczby kopii między genomem testowym i referencyjnym (Albertson i Pinkel 2003; Iafrate i wsp. 2004; Sebat i wsp. 2004) albo niewielkie dodatkowe obejmuje kilka przylegających do siebie klonów. Dolne panele pokazują szczegółowe dane, wykreślone według pozycji sekwencji, dla chromosomów 5 i 6, które zawierały delecje. Ta macierz nie Analiza tablicowa CGH pacjentów z zespołem cri du chat.4,Kasowanie terminala, pacjent 27. Dziennik:mierzonego stosunku wykreśla się w zależności od kolejności klonów na chromosomie zawierała pełnego zestawu klonów 5p wymienionego w tabeli 3, tak że delecja 5p obejmuje mniej klonów niż w analizie o wysokiej rozdzielczości. Sporadyczne pojedyncze klony o proporcjach aberracje, szum. Rysunek 1

∢

dotknięty). Ogólne kryteria dla każdej klasyfikacji są wymienione w tabeli 2. Niepewność tych ocen jest szacowana na zakres od -0,5 na dolnym końcu skali do -1,0 na górnym końcu.

Tablice. — Tablice do analizy 5p w wysokiej rozdzielczości zawierały elementy wytworzone z klonów BAC, P1 i PAC, które zostały wyselekcjonowane za pomocą genetycznie zmapowanych markerów STS (Hudson i wsp. 1995; Peterson i wsp. 1999), a także zmienną liczbę klonów zlokalizowanych na inne chromosomy, które zostały użyte do normalizacji i do wykrywania innych aberracji. Lokalizacje wszystkich klonów są oparte na zamrożeniu ludzkiego genomu przez Uniwersytet Kalifornijski w Santa Cruz (UCSC) z lipca 2003 roku. Gęstość zasięgu w 5p była najwyższa w regionach wcześniej zdefiniowanych jako ważne w zespole cri du chat. 55 klonów, które obejmowały wszystkie aberracje 5p stwierdzone u tych pacjentów, wymieniono w tabeli 3. (Tabela A2 w dodatku A [tylko online] zawiera elektroniczna wersję tej tabeli; można ją otworzyć w programie Microsoft Excel w celu manipulacji danymi i wykreślania .) Po ukończeniu sekwencji genomu byliśmy w stanie dokładnie odwzorować większość klonów. Jednak pozycje sekwencji kilku musiały być interpolowane na podstawie informacji z mapy genetycznej. Wszystkich pacjentów analizowano na macierzach, które zawierały 55 klonów w 5p oraz dodatkowe 100-300 klonów w innych lokalizacjach. Trzydziestu siedmiu pacjentów zostało również przeanalizowanych na różnych wersjach tablic, które zawierały: ~1750–2000 klonów rozmieszczonych w całym genomie (Snijders i wsp. 2001), aby ustalić, czy wystąpiły aberracje dotyczące innych chromosomów. Niektóre z tych większych macierzy nie zawierały pełnego zestawu klonów 5p.

DNA dla elementów macierzy izolowano z klonów i amplifikowano przez PCR łącznik-adapter. Produkty PCR zawieszono w 20% dimetylosulfotlenku w wodzie o stężeniu~0,8 mg/ml (Snijders et al. 2001) i zostały naniesione na szkiełka powlekane chromem za pomocą zbudowanej na zamówienie drukarki wykorzystującej szpilki do drukowania z rurką kapilarną (materiał niepublikowany autorów). Dla każdego klonu wydrukowano trzykrotne sąsiednie plamki. W przypadku mniejszych tablic wydrukowano dwa zestawy trzech egzemplarzy w szeroko oddzielonych miejscach tablicy.

Hybrydyzacja i analiza macierzy CGH. —Całe genomowe DNA wyizolowano z krwi obwodowej pacjentów i osobników kontrolnych przy użyciu standardowych technik. DNA znakowano za pomocą translacji nick (1mg) (Pinkel i wsp. 1998) lub losowe wydłużenie startera (0,5mg) (Snijders i wsp. 2001). Do znakowania zastosowano fluorochromy bezpośrednio sprzężone z dCTP. Niektóre pomiary wykorzystywały fluoresceinę i czerwień teksańską (lub Alexa 594), podczas gdy inne wykorzystywały Cy3 i Cy5 do oznaczenia odpowiednio genomu testowego i referencyjnego.

Oznaczone testowe i referencyjne genomowe DNA wraz z 50mg DNA Cot-1, dołączonego w celu zahamowania hybrydyzacji powtarzających się sekwencji, wytrącono etanolem i ponownie zawieszono w mieszaninie hybrydyzacyjnej do ostatecznej mieszaniny 50% formamidu/10% siarczanu dekstranu/2# SSC/1%-4% (v/v) SDS do całkowitej objętości~50ml. Mieszanina hybrydyzacyjna została podgrzana do 70 °C w celu denaturacji DNA, a temperatura została obniżona do 37 °C przez ~1 godz., aby umożliwić reasocjację powtarzających się sekwencji. W celu hybrydyzacji wokół matrycy utworzono niską barierę wykonaną z cementu kauczukowego. Mieszanina hybrydyzacyjna została następnie nałożona na macierz i macierz została umieszczona w szczelnie zamkniętej komorze, która pozostawiała górną powierzchnię płynu wolną. Hybrydyzacja przebiegała przez 16-48 godzin na wolno kołyszącym się stole w temperaturze 37 C (Pinkel i wsp. 1998). Po hybrydyzacji macierze szybko przemyto strumieniem buforu PN (0,1 M fosforan sodu; 0,1% nonidet P40; pH 8) w celu usunięcia większości roztworu hybrydyzacyjnego; następnie zanurzono je w 50% formamidzie/2# SSC w 45°C na 15 min, po czym przeprowadzono końcowe płukanie w buforze PN o temperaturze pokojowej przez 15 min. Po przemyciu macierzy roztwór 90% glicerolu i 10% buforu fosforanowego, pH 9, zawierający 1mM barwnika DNA DAPI (4, 6-diamidyno-2fenyloindol) nałożono na każdą macierz i dodano szkiełko nakrywkowe. DAPI zabarwił plamki w macierzy, czyniąc je widocznymi niezależnie od sygnałów hybrydyzacji.

Macierze zostały zobrazowane w niestandardowym systemie obrazowania CCD (Pinkel et al. 1998; niepublikowane dane autorów). Otrzymaliśmy obrazy DAPI plus Cy3 i Cy5 lub obrazy fluoresceinowe i teksańskoczerwone, w zależności od tego, która para barwników została użyta do oznaczenia genomu testowego i referencyjnego. Cała macierz była zawarta w jednym obrazie CCD. Do większości analiz wykorzystano oprogramowanie do analizy obrazu UCSF SPOT (Jain i wsp. 2002). Program ten określił położenie plamek tablicy za pomocą obrazu DAPI i obliczył intensywność testu i odniesienia każdego piksela w każdym miejscu, po odjęciu lokalnego tła. Stosujemy stosunek całkowitej (odjętej od tła) intensywności testu do całkowitej (odjętej od tła) intensywności referencyjnej jako miarę względnej liczby kopii dla każdego miejsca i uśredniamy stosunki powtórzeń. Nie dokonano żadnych korekt obliczeniowych (np. korekcji cieniowania, normalizacji najniższej, normalizacji zależnej przestrzennie i normalizacji specyficznej dla klonu) ani w obrazach, ani w danych proporcji. Kryteria jakości, w tym korelacja sygnałów testowych i referencyjnych w miejscu, zostały zastosowane do rozpoznania sygnałów problematycznych. Ogólnie plamy z korelacją/!0,8 zostały odrzucone. Klony z SD1Z analizy usunięto 0,2 dla powtórzeń. W większości przypadków SD powtórzonych miejsc wynosiło !0,02. Odrzucono również pomiary klonów z tylko jednym z powtórzeń, które przetrwały kontrolę jakości. Zastosowano ogólny współczynnik normalizacji, tak aby mediana log₂stosunki lub mediana liniowego stosunku elementów tablicy w dwóch kopiach na komórkę ustawiono odpowiednio na 0 lub 1.

Podsumowanie danych pierwotnych dla 94 osób z zespołem Cri du Chat

		Phenotyp		PAN		Bgod: (Mb/klo	ZINA on nr.b)
PATIENT	Płakać.	Dysmorfologia twarzy	Opóźnienie mowy	LEVEL	CKONWENCJONALNECYTOGENETYKAa	Proksymalnad	dystalna
1	T/T	T/T	Y	5	46,XY,del(5)(p14.3)*	20,837/39	
3	T/T	T/T	Y	6,5	46,XY,del(5)(p13.3)*	30,726/51	
4	T/T	T/T	Y	6	46,XY,der(5)t(5;22)(p14.2;p13)p	30.022/44	
5	T/T	T/T	Y	5,5	46,XY,del(5)(p14.3)*	17.500/37	
6	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	23.276/41	
8	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p14.1)*	25,841/42	
9	T/T	T/T	Y	7	45,XX,dic(5;13)(p13.3;p12)*	31.942/45	
10	T/T	T/T	Y	5,5	46,XX,del(5)(p14.2)*	21.797/40	
11	ND/Y	T/T	Y	5,5	46,XX,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
12	ND/Y	T/T	Y	5,5	46,XX,del(5)(p14.3)*	18,336/38	
13	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p13.3)*	33.428/49	
14	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p13.3)*	30.022/44	
15	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.3)*	20,837/39	
16	T/T	tak/nie	Y	6,5	46,XX,der(5)t(5;8)(p14.1;p22)*	31,751/46	
17	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	25,841/42	
18	ND/N	tak/nie	N	6	46,XY,del(5)(p14.1p15.31)*IN	30.022/44	8.021/15
20	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	31,751/46	
21	T/T	T/T	Y	5,5	46,XX,del(5)(p14.3)*	18,336/38	
22	T/ND	T/ND	Y	NAmi	46,XX,dodaj(5)(p14.3)*	21.797/40	
23	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
24	T/T	tak/nie	Y	7	46,XX,dodaj(5)(p14.1)mat	21.797/40	
25	T/T	tak/nie	Y	7	46,XX,dodaj(5)(p14.2)*	18,336/38	
26	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p14.1)*	31,751/46	
27	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p13.3)*	33.428/49	
28	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.3)*	20,837/39	
30	T/T	T/T	Y	5,5	46,XX,del(5)(p14.3)*	20,837/39	
31	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p13.3)*	31.942/45	
35	T/ND	T/ND	Y	6,5	45,XY,der(5)t(5;14)(p14.2;q12),-14,mat	23.276/41	
36	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
37	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
38	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p15.1)*	18,336/38	
39	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
40	T/T	T/T	Y	5	46,XY,del(5)(p15.1)*	16.684/33	
42	T/T	T/ND	Y	3	46,XX,del(5)(p15.2)*	11.035/28	
44	T/T	T/ND	Y	3	46,XX,del(5)(p15.2)*	11.035/28	1.207/1
45	ND/N	N/N	Y	7	46,XY,der(14)t(5;14)(q11;p13) del(5)(p14.3p15.31)*	17.500/37	14.929/30
48	tak/nie	tak/nie	Y	6,5	46,XY,dodaj(5)(p14.2)*	16.684/33	
49	T/T	T/T	N	5	46,XX,der(5) ins(15;5)(q22;p14.3p15.31)mat	26.794/43	5,945/12
50	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	31.942/45	
51	N/N	N/N	N	0	46,XX,del(5)(p13.3p14.1)mat	31.942/45	18,336/38
52	T/T	T/T	Y	6,5	46,XY,del(5)(p13.3)*	31,751/46	
54	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p15.1)*	16.684/33	
55	T/T	T/T	Y	5,5	46,XX,der(5)t(5;13)(p14.3;p12)mat	20,837/39	
56	ND/N	ND/N	ND	6	46,XY,der(5)t(5;7)(p14.1p21)? del(5)(p14.1p15.1)?del(7)*	26.794/43	8.021/15
58	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
59	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.3)*	23.276/41	
60	T/T	T/T	Y	5	46,XY,del(5)(p14.2)*	20,837/39	
63	T/T	T/T	Y	5	46,XX,rec(5)del(5)(p14.2) inv(5)(p14.1p15.1)mat	21.797/40	
66	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p14.2)*	23.276/41	
68	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p14.1)*	25,841/42	
101	T/T	T/ND	Y	2,5	46,XX,del(5)(p15.2)*	11.035/28	
102	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.2p15.33)*	23.276/41	3.174/4
104	T/T	T/T	Y	6,5	46,XY,del(5)(p13.3)*	32.162/48	
105	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.3)*	17.224/36	
107	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p13.3)*	33.428/49	
109	T/T	T/T	Y	5,5	mos 46,XX,del(5)(p14.1)/del(5)(p15.2)*	25,841/42	
110	T/T	T/T	Y	6,5	46,XX,del(5)(p13.3)*	30,726/51	
111	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p14.1)*	25,841/42	
112	ND/N	ND/N	Ν	1	46,XX,del(5)(p14.2p15.2)*	23.276/41	11.435/27
113	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.1)*	23.276/41	
114	N/N	N/N	Ν	2	46,XY,del(5)(p14.2p15.2)*	23.276/41	11.360/26
115	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p15.2)*	11.035/28	
117	ND/N	N/N	Ŷ	3.5	46,XY,del(5)(p15.31)*	9.288/18	
201	T/T	tak/nie	Ŷ	7	46.XY.dodai(5)(p14.3)*	17.224/36	
202	T/T	T/ND	Y	2,5	46,XY,del(5)(p15.2)*	11.435/27	

(nieprzerwany)

Tabela 1 (ciąg dalszy)

		Phenotyp		PAN		Bgodz (Mb/klor	INA n nr.b)
PATIENT	Płakać:	Dysmorfologia twarzyc	Opóźnienie mowy	LEVEL	CKONWENCJONALNECYTOGENETYKA a	Proksymalnad	dystalna
203	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p13.3)*	30.022/44	
205	T/T	T/T	Y	5	46,XY,del(5)(p14.2)*	21.797/40	
206	T/T	T/ND	Y	7	46,XX,dodaj(5)(p14.3)pat	18,336/38	
209	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p13.3)*	31,751/46	
210	T/T	T/T	Y	7	46,XX,del(5)(p14.1)pat	25,841/42	
212	T/T	T/T	Y	6,5	46,XY,del(5)(p14.1)*	30.022/44	
213	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.2)*	20,837/39	
214	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.2)*	17.224/36	
215	T/T	tak/nie	Y	7	46,XX,der(5)t(4;5)(q32;p14.3)*	14.929/30	
216	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.2)*	20,837/39	
218	T/T	T/T	Y	6,5	46,XX,dodaj(5)(p14.3)pat	17.500/37f	
219	T/T	T/T	Y	6,5	46,XY,del(5)(p14.1)*	25,841/42	1.207/1
221	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.2)*	18,336/38	
222	T/T	T/T	Y	6	46,XY,del(5)(p14.1)*	26.794/43	
223	T/T	T/T	Y	6	46,XX,del(5)(p13.3)*	33.428/49	
225	T/ND	T/ND	Y	4 g	46,XY,del(5)(p14.3p15.31)*	21.797/40	3.174/4
228	T/T	T/T	Y	6	46,XY,add(5)(p15.2)pat	11.035/28	
229	T/T	T/T	Y	7	45,XX,dic(5;22)(p13.2 p12)*	33.428/49	
231	T/ND	T/ND	Y	3,5g	46,XX,del(5)(p15.1)*	15.679/31	
232	T/T	T/T	Y	6,5	46,XX,del(5)(p13.3)*	31.942/45	
250	T/T	T/T	Y	5	46,XX,del(5)(p14.1)*	26.794/43	
251	T/T	T/T	Y	6,5	46,XX,del(5)(p13.3)*	30.022/44	
252	N/N	N/N	N	5	46,XY,del(5)(p15.1p15.31)*	15,872/32	6.365/13
253	T/T	T/T	Y	5	46,XY,r(5)(14,3q35,3)*	20,837/39	
254	T/T	T/T	Y	5	46,XY,del(5)(p14.3)*	20,837/39	
255	T/T	T/T	Y	6,5	46,XY,dodaj(5)(p14.2)*	20,837/39	
256	T/T	T/T	Y	5,5	46,XX,del(5)(p13.3)*	30.022/44	
300	T/T	T/T	Y	5	46,XY,del(5)(p14.1)*	25,841/42	
402	T/T	T/ND	Y	3	46,XY,del(5)(p15.2)*	11.035/28	

NOTE.—Ypobecny fenotyp. Npbrak fenotypu. NDpniezdeterminowany.

"Gwiazdka (*) wskazuje przypadki de novo (łącznie 83; 78% ze strony ojca, 22% ze strony matki). Pozostałe 11 przypadków to przypadki rodzinne.

Numer klonu pochodzi z tabeli 3.

cObecność lub nieobecność w wieku >5 lat/obecność lub nieobecność w wieku pacjenta15 lat.

«Nieusunięty klon na granicy usunięcia 5p. Jeśli występuje delecja śródmiąższowa, wskazane są proksymalne i dystalne granice delecji. Klony graniczne mogą mieć podwyższoną liczbę kopii, ponieważ na granicach delecji występują pewne duplikacje (tabela 4).

miPacjent nie żyje; Poziom MR niedostępny (NA).

^rGłośna próbka. Wielokrotne hybrydyzacje wskazują, że granica może być klonem 36 lub 37.

_gOcena pacjentów 225 i 231 była w wieku odpowiednio 3,5 i 3 lata.

Wyniki

Macierzowe pomiary CGH

Reprezentatywne profile liczby kopii dla chromosomu 5 i skan całego genomu pokazano na rycinie 1. Idealnie byłoby, gdyby delecje i przyrosty pojedynczej kopii w jednorodnej próbce miały log2proporcje odpowiednio -1,0 i -0,58. W praktyce współczynniki skreśleń mieściły się w przedziale -1 do -0,7, z odchyleniami od ideału przypuszczalnie z powodu niecałkowitego tłumienia sygnałów z bardzo powtarzających się sekwencji, hybrydyzacji krzyżowej, niedoskonałej definicji poziomów tła, itp. Z tą prawie ilościową relacją stosunku do liczby kopii i poziomów szumu (wskazane na rys. 1) delecje można było wykryć z bardzo dużą niezawodnością za pomocą prostego progu ustawionego na log2stosunek równy -0,4. W większości przypadków precyzja wystarczająca do ustalenia jednego lub obu usunięć granice odstępu między dwoma klonami macierzy uzyskano w pojedynczej hybrydyzacji. Jeśli początkowy pomiar zawierał zbyt dużo szumu, aby zidentyfikować klony flankujące granicę delecji, pomiar był powtarzany. Nie przeprowadzono pomiarów z odwróceniem barwnika, ponieważ nie dostarczyły one więcej informacji niż rehybrydyzacja. Czasami okazywało się, że ponowne oczyszczanie DNA próbki poprawiło jakość danych, co wskazuje, że nieznane zanieczyszczenia w niektórych próbkach wpłynęły na zdolność do spójnego znakowania lub hybrydyzacji genomowego DNA.

Tabela 1 podsumowuje dane dotyczące delecji, konwencjonalną analizę cytogenetyczną i charakterystykę fenotypową dla 94 pacjentów. Pacjenci są wymienieni w kolejności numerycznej, odpowiadającej poprzedniej numeracji (Niebuhr 1978*a*; niepublikowane materiały autorów). Delecje u 82 osób były nieuleczalne, podczas gdy u 12 usunięcia były śródmiąższowe, łącznie 106 granic delecji

Tabela	2
--------	---

Klasyfikacja MR

PAN		Рн	ENOTYP
LEVEL	DESKRYPCJA(ILORAZ INTELIGENCJI)	Dorosły	Dziecko
0	Normalna	Brak MR	Brak MR
1	Granica (!70)	Uczęszcza do standardowej szkoły przez wiele lat; wymaga niewielkiego/poważnego wsparcia	Normalne etapy rozwoju; drobny opóźnienie widoczne w pierwszych latach szkolnych
2	Bardzo łagodny (!65)	Uczęszcza do standardowej szkoły przez kilka lat; wymaga duże wsparcie; ma proste czytanie, pisanie i matematykę	Normalne etapy rozwoju w pierwszych latach życie; niewielkie opóźnienie widoczne w wieku 2-3 lat
3	Łagodny (!50)	Rozumie wszystko, łącznie z długimi zdaniami; ma bardzo prostą umiejętność czytania, pisania i	Kamienie milowe w rozwoju opóźniły się o kilka miesięcy; opóźnienie oczywiste od 1 do 2 lat
4	Umiarkowane (!35)	matematyki Rozumie prawie wszystko; wykorzystuje małe zdania i mnóstwo znaków	Kamienie milowe rozwoju opóźniły się o kilka miesięcy; opóźnienie oczywiste od 1 roku życia
5	Ciężkie (!20)	Rozumie proste, codzienne zdania i pojedyncze słowa; używa zdań składających się z 2–3 słów i wielu znaków; spacery	Kamienie miłowe w rozwoju zostały opóźnione o kilka miesięcy do 1 roku; MR oczywiste przed ukończeniem 1 roku życia
6	Bardzo ciężki (!10)	Rozumie kilka słów; zwykle idzie chwiejnie, jeśli jest obsługiwany; nie ma języka lub zawiera tylko kilka słów Pokazuje	Kamienie milowe rozwoju opóźnione o kilka lat; MR obvi- y przed ukończeniem 6 miesięcy Nie można
7	Głęboki	niewielką odpowiedź lub brak odpowiedzi; może siedzieć i stać autokefaliczny; chodzenie jest rzadkie	siedzieć samodzielnie w wieku 5 lat

na 5p. Jak omówiono bardziej szczegółowo poniżej, 15 osób miało aberracje liczby kopii oprócz delecji 5p. Trzy z tych aberracji były duplikacjami sekwencji 5p sąsiadujących z granicą delecji, podczas gdy inne aberracje dotyczyły regionów genomu innych niż 5p, jak pokazano w tabeli 4.

Na podstawie naszych pomiarów znaleziono dwa wskazania interesujących cech sekwencji DNA. Po pierwsze, wykryto znaczący klaster punktów przerwania. Wszystkie ze 106 granic delecji stwierdzonych u tych pacjentów wystąpiły w obrębie dystalnej~33 Mb chromosomu, co daje średnią gęstość około trzech granic na megazasadę. Spośród 94 przypadków 9 miało granice dystalne lub proksymalne w~Region o wielkości 0,5 Mb klonów 26, 27 i 28 w 5p15.2, co daje gestość~18 granic na megabazę. Ponadto, jeśli klony w tym regionie są uporządkowane, jak wskazano w zamrożeniu sekwencji z lipca 2003, wówczas granice delecji wydają się złożone, z oscylacjami w stosunku sąsiednich klonów na granicach. Zmiana kolejności klonów upraszcza widoczną strukturę granicy delecji we wszystkich przypadkach. W tabeli 3 wymieniamy klony w naszej zmienionej kolejności, ale wskazujemy pozycje sekwencji w oparciu o złożenie genom-sekwencja. Wyniki te sugerują, że w tym regionie mogą występować pewne motywy sekwencji, które ułatwiają tworzenie aberracji i komplikują prawidłowe składanie sekwencji genomu. Alternatywnie, jeśli złożenie sekwencji jest prawidłowe, wówczas klaster granic delecji w tym regionie ma powtarzalną złożoną strukturę liczby kopii, która odzwierciedla cechy sekwencji lokalnej.

Drugą cechą sekwencji, którą znaleźliśmy, był region duplikacji sekwencji na 5p w normalnym ludzkim genomie. Dane dla 58 przypadków (np. rys. 1*A*i 1*B*,) wskazane ten klon 39 miał log₂stosunek-0,4, pośrednią między oczekiwaną dla normalnego regionu a delecją, gdy otaczające klony zostały wyraźnie usunięte. Jednakże, jeśli delecja rozszerzyła się proksymalnie obejmując region klonów 51 i 52, wtedy stosunek w klonie 39 spadł do wartości oczekiwanej. Sugeruje to, że znaczna część sekwencji klonu 39 została zduplikowana w 5p pomiędzy klonami 51 i 52, tak że delecje obejmujące tylko klon 39 oznaczałyby zmianę z czterech kopii do trzech (logarytm₂[3/4]-0,4). Analiza FISH z tym BAC jako sondą potwierdziła to przypuszczenie, z odkryciem dwóch blisko oddalonych od siebie sygnałów na 5p. Niektóre zamrażanie (czerwiec 2002, listopad 2002 i kwiecień 2003) sekwencji ludzkiego genomu wykazało obecność tej duplikacji, lokalizując marker w tym BAC zarówno przy 20,791 Mb, jak i 34,070 Mb (kwiecień 2003). Wykorzystane przez nas zamrożenie z lipca 2003 r. nie wskazuje na duplikację. Duże duplikacje tego typu występują często w genomie (Lupski i wsp. 1996; Eichler 2001). W tym zestawie próbek nie stwierdzono polimorfizmu w liczbie kopii DNA (Albertson i Pinkel 2003; Iafrate i wsp. 2004; Sebat i wsp. 2004), który dotyczył klonu 39.

Zależność MR od skreśleń

Rysunek 2*A*pokazuje związek delecji w 5p ze stanem MR pacjentów, przy czym pacjenci uporządkowani według rosnącego stopnia opóźnienia. Związek wydaje się złożony i nieco kłopotliwy. Widoczny jest wyraźny wzrost nasilenia opóźnienia z nie-

Tabela 3

Klony tablicy do analizy 5p

	Mark	ER	P	POZYCJA		
CSAMOTNY				Sekwencja	Genetyczny	
NUMBRA	Symbol	Nazwa	Cytogenetyczne _a	(Mb)a	(cm)♭	CSAMOTNYNAME
1	D5S1981	AFMa217zh1	5p15,33	1.207	1	CTC-326E20
2	D5S2005	AFMB002xc1	5p15,33	1,395	0	RP11-94J21
3	D5S1970	AFMa183wh5	5p15,33	2,497	5	CTB-116F8
4	D5S417	AFM205wh8	5p15,33	3.174	6	RP11-20B3
5	D5S1980	AFMA217yh1	5p15,33	3.449	7	RP11-82M24
6	D5S675	AFM336tc1	5p15,33	3,998	9	RP11-103L11
7	D5S1906	WI-2725	5p15,33	4.258		CTB-27O23
8	D5S405	AFM154xa3	5p15,33	3,995	9	RP11-227M19
9	D5S406	AFM154xq3	5p15,32	5.047	12	RP11-58A5
10	D5S1921	WI-2897	5p15,32	5.200		CTC-263B18
11	D5S464	AFM112xe3	5p15.32	5.890	15	CTC-248O4
12	D5S2054	AFMB355wb1	5p15.32	5.945		RP11-53K22
13	D55635	AFM276vb9	5p15.32/15.31	6.365	16	RP11-36H5
14	D55676	AFM347va9	5p15.31	7,492	18	RP11-46023
15	D5518	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	5p15.31	8.021		CTB-16G3
16	D551957	AFMa124wq5	5p1531	8 550	20	CTB-2719
17	D55708	//////24//95	5p15,51	9.039	20	DPA-89643
18	D5574		5p15,51 5p15 31	9 288	21	DPA-67167
10	D55630	4EM268zd9	5p15,51 5p15 31	9.614	21	DPA-255H3
20	D55759	ΔFM2002α3	5p15,51 5p15 31/15 2	10 100	21	DPA-1398C5
20	D551850	W/16722	5p15.51/15.2	10.100		DPA-110/E2
21	D5572	W10722	5p15.2	10.320		DPA-13/962
22	<i>DJJZJ</i> mi	AEMOADya11	5p15.2 5p15.2	10.304	22	DD11 1/5D1
23	DEC2100	AFIVI042XaTT W/17220	5p15.2	10.403	25	
24	DJJ2400	ALMOLEVLO	5p15.2	10.732		DFA-941C2
25	D55452	AFINIZSSXD9	5p15.2	10.746		RP11-72C10
20	D55117	4514-240-60	5p15.2	11.360	25	DPB-70G7
27	D552887	AFMAZ4UXI9	5p15.2	11.435	25	KP11-29N3
20	D554/8f	AFMIT/9X010	5p15.2	11.035	24	CTC-305H11
29	D552081	AFINI347185	5p15.2	13.530	20	CIC-305H17
30	D551991	AFMa282Wa5	5p15.2/15.1	14.929	29	RP11-5N8
21	D551989	AFIVIAZ4/WCI	5p15.1	15.679	20	RP11-135IV113
5Z	D551954	AFINIAT 14X19	5p15.1	15,872	30	RP11-261B20
22	D551963	AFINIAT4UVUT	5p15.1	16,684	31	RP11-269U14
34	D55416	AFM205WhTU	5p15.1	16,723	31	RP11-260E18
35	D5S2114	AFMa090yh5	5p15.1	16.949	32	CTB-28D11
36	D55486	AFM206zc1	5p15.1	17,224	34	CTB-33B3
3/	D5S2096	AFM105xg1	5p15.1	17.500	35	RP11-88L18
38		WI-4804	5p15.1/14,3	18,336		CTB-34B4
39	<i>D5S2419</i> _g	WI-10830	5p14.3	20.837		CTC-253L1
40	D5S411	AFM193xe11	5p14.3	21.797	39	CTB-55P22
41	D5S1868	WI-9400	5p14.3/14,2	23,276	40	CTB-115E13
42	D5S648	AFM292yg5	5p14.1	25.841	42	CTB-100A5
43	D55627	AFM21/ye1	5p14.1	26,794	43	CTC-296N5
44	D5S661/D5s2061	AFMC011xb1	5p14/13	30.022	44	CTB-161H9
45	<i>D5S477</i> f	AFM177xb4	5p13.3	31,942	49	
46	D5S1993	AFMa286ya9	5p13.3	31,751	48	CTB-13021
47	D5S1986	AFMA238za9	5p13.3	31,776	49	RP11-5N11
48	D5S1996	AFM297wa5	5p13.3	32,162	51	RP11-67P13
49	D5S651	AFM302wd5	5p13.3	33.428	51	CTC-221E3
50	D5S2062	AFM277yh9	5p13.3	33.806	55	RP11-94E6
51	D5S395f	AFM284vc1	5p13.3	30,726		CTB-62F24
52	D5S1506	GATA63c02	5p13.3	33.873		CTB-38G24
53	D5S395	AFM063yb6	5p13.2	35.843	57	RP11-85N3
54	D5S2025	AFMb297za5	5p13.2	36,018	57	CTB-107L17
55	D5S1994	AFMa286ze9	5p13.2	36,465	56	CTB-18O17

Note.—Elektroniczna wersja tej tabeli (tabela A2) jest dostępna w dodatku A (tylko online).

^aPozycja jest oparta na sekwencji UCSC z lipca 2003 roku.

^bPozycja jest oparta na opartej na STS mapie ludzkiego genomu (Hudson i wsp. 1995).

Interpolacja między*D5S676*oraz*D5S1957*.

dInterpolacja między*D5S208*oraz*D5S630.*

miInterpolacja między *D5S1850* oraz*afm042xa11*.

Pozycja opiera się na zamówieniu poprzez usunięcie danych. Kolejność nie zgadza się z sekwencją genomu.

_oNasze dane wskazują, że ta sekwencja jest zduplikowana w genomie. Zamrożenie z lipca 2003 nie pokazuje duplikacji; Kwiecień 2003 wskazuje drugi egzemplarz znajdujący się w~34.070 Mb.

•	e aberracje
•	Dodatkow

Tabela 4

				UPPERBGODZINA		LowerBgodzina			
ATIENT	PAN Level	Cytogenetyczny Ppozycja	Сору Numbra	Zatrzymany klon ⁵	Pozycja (Mb) _c	Zatrzymany klon	Pozycja (Mb)ċ	Seczetter (Mb)	RprzewidzianyKaryotyp _a
6	6,5	8pter-21,3	m	pter	0	RP11-89M8	22,745	22,745	46, XX, der(5)t(5;8)(p14.1;p21)
4	7	13q32.2-ter	m	RP11-40H10	93,26	kter	113.042	19,782	46,XX,der(5)t(5;13)(p14.1;q32.2)
5	7	5q35,3-ter	m	RP11-125L2	173.496	kter	181.034	7,538	46,XX,der(5)t(5;5)(p14.2;q35.3)mat
35	6,5	14q11.2	-	RP11-152G22	19.227	RP11-68M15	21.467	2,24	45,XY,der(5)t(5;14)(p14.2;q11.2),-14,mat
5	7	6q25.2-6qter	-	GS-59B4	152.455	RP1-57H24	170.695	18.24	46,XY,der(14)t(5;14)(q11;p13) del(5)(p15.1p15.2)del(6)(q25.2)
81	6,5	5p15.11-5p14	m	RP11-261B20/32d	15,872	CTC-296N5/43	26,794	10.922	46,XY,del(5)(p14.3)dup(5)(p14.2p15.1)
04	6,5	5p13.3	4	CTB-13021/46	31,715	RP11-67P13/48	32,162	. 447	46,XY,del(5)(p13.3)dup(5)(~p13.3) _{mi} #2
201	7	5q35.1-ter	m	RP11-15F10	169.122	kter	181.034	11.912	46,XY,der(5)t(5;5)(p14.3q35.1)
206	7	20pter-12,2	m	pter	0	DuPontA-967A8	10.282	10.282	46,XX,der(5)t(5;20)(p14.3;p12.2)pat
210	7	1kw	m	RP11-194F13	238.741	kter	246,127	7,386	46,XX,der(5)t(1;5)(q43;p14.1)pat
215	7	4q31.1-ter	m	RP11-40D5	135.249	kter	191.731	56,482	46,XX,der(5)t(4;5)(q31.1;p14.3)
218	6,5	8pter-8p23,2	m	pter	0	RP11-112008	11	11	46,XX,der(5)t(5;8)(p14.3;p23.2)pat
228	9	8q23.1-ter	m	CTD-2013D21	110,377	kter	146.308	35,931	46,XY,der(5)t(5;8)(p15.2;q23.1)pat
251	6,5	5p13.3	m	CTB-115E13/41	23,276	RP11-94E6/50	33.806	10,53	46,XY,del(5)(p13.3)dup(5)(p13.3~14.1) ^{mi}
255	6,5	1 kw	m	RP11-210E169	229,578				46,XY,der(5)t(1;5)(q42~43;15,2)
:			·						

NorE. — Aberracje, które najwyraźniej rozciągają się na telomery, są wymienione jako pter lub qter. «Kariotyp jest korygowany na podstawie danych tablicowych. Wstępną ocenę przedstawiono w tabeli 1.

kKlonuj na górnej (najbliżej pter) lub dolnej (najbliżej qter) granicy aberracji, ale nie jest uwzględniana w aberracji. Pozycja jest oparta na sekwencji UCSC z lipca 2003 r.; szacowane są pozycje bez miejsc po przecinku.

mZdefiniowane przez dane tablicowe.

rZaszumione dane z powodu złej jakości DNA. Mogą występować inne aberracje. "Zysk obejmuje ten klon. W macierzy było za mało klonów, aby oszacować wielkość uzyskanego regionu.



Rysunek 2Zależność poziomu MR od delecji 5p. A, Dane od wszystkich 91 pacjentów, dla których dostępna była ocena opóźnienia. Sczerniałyczęści słupków wskazują region(y) chromosomów, które są zachowywane w każdym przypadku, wykreślone w funkcji fizycznej pozycji od 5pter.Centromer znajduje się tuż poniżej dolnej części wykresu. Zależność poziomu opóźnienia od delecji jest oczywista, ale istnieje wiele przypadków delecji,które wydają się zbyt małe dla ogólnego trendu. Dla poziomu MR -5 dane są wykreślane w kolejności od proksymalnej granicy usunięcia na każdympoziomie. Szacuje się, że niepewność przypisania do poziomu MR fenotypu opóźnienia u tych pacjentów z ciężkim i głębokim schorzeniem wynosi -0,5-1.*B*,Ten sam wykres dla pacjentów, u których wykryliśmy tylko delecje 5p. Należy zauważyć, że większość pacjentów z ciężkim opóźnieniem nie jest jużobecna, ponieważ mają dodatkowe aberracje (ryc. 2*A*). Zależność opóźnienia od delecji 5p jest znacznie bardziej spójna. Wskazano trzy regiony 5p —MRI, MRII i MRIII — o zróżnicowanym wpływie na opóźnienie. Regiony te zostały omówione w tekście.

MR Level

6

7

6.5

5.5

5

| 1-2 2.5-3.5

Ó

Α



Rysunek 3 Podsumowanie danych pacjentów, które lokalizują regiony 5p odpowiedzialne za płacz, dysmorfologię twarzy i cechy opóźnienia mowy fenotypu. Zaczernione części słupków wskazują zatrzymane regiony chromosomu. Zaznaczono zatrzymane klony na granicach (patrz tabela 3). "Y" wskazuje, że u pacjenta występowała cecha fenotypowa, a "N" oznacza jej brak. Zaczernione kwadraty wskazują, że odpowiednie informacje nie były dostępne dla tego pacjenta. Zakreślone litery wskazują tych pacjentów, którzy dostarczają najwięcej informacji na temat lokalizacji części chromosomu odpowiedzialnej za tę cechę. Zacieniowane "N" dla pacjenta 252 wskazuje, że delecja tego pacjenta powinna wytworzyć fenotyp przez nie.

powiększający się zakres usuwania, ale istnieją pewne znaczące wyjątki. Na przykład, niektórzy pacjenci z delecjami śródmiąższowymi w 5p są albo bez zmian, albo w minimalnym stopniu opóźnieni, podczas gdy inni z mniejszymi delecjami w tym samym regionie są głęboko opóźnieni.

Konwencjonalne analizy cytogenetyczne i analizy FISH zostały wcześniej przeprowadzone na tych podmiotach i wykazały, że aberracje chromosomowe u niektórych pacjentów były złożone, obejmując rearanżacje chromosomów oprócz chromosomu 5. Dlatego przeanalizowaliśmy 37 pacjentów, używając macierzy, które dostarczyły dane dotyczące całego genomu. Przypadki te obejmowały wszystkie te, których delecje 5p wydawały się zbyt małe, aby wyjaśnić ich poziom opóźnienia w porównaniu z ogólna tendencja (pokazana na rys. 2).A) plus w przybliżeniu równa liczba pasująca do trendu. Stwierdzono, że wszyscy pacjenci z ciężkim opóźnieniem i małymi delecjami 5p mieli dodatkowe zyski lub straty (np. pacjent 45 [pokazano na ryc. 1C]). Żadnych różnicowych efektów fenotypowych nie można było konkretnie przypisać żadnej z tych dodatkowych aberracji. Szczegółowe informacje o osobach z dodatkowymi aberracjami wymieniono w tabeli 4. Ponieważ do pomiarów wykorzystano macierze z ewoluującym składem klonów, dokładność, z jaką

granice dodatkowych aberracji są określone jako zmienne. Jednak jasne jest, że te aberracje zazwyczaj obejmują co najmniej kilka sąsiadujących elementów tablicy, co czyni je znacznie większymi pod względem zakresu niż polimorfizmy liczby kopii u osób zdrowych (Albertson i Pinkel 2003; Iafrate i wsp. 2004; Sebat i wsp. 2004). . Niektóre z tych złożonych przypadków obejmują dodatkowe aberracje dotyczące chromosomu 5, w tym kilka z duplikacjami materiału w pobliżu granicy delecji. Rysunek 2*B*pokazuje związek między delecją a poziomem MR dla wszystkich pacjentów z delecjami 5p i bez innych wykrytych aberracji. Związek między dotkliwością MR a rozmiarem i lokalizacją usunięcia jest teraz znacznie bardziej spójny.

Regiony chromosomalne wpływające na płacz, opóźnienie mowy i dysmorfologię twarzy

Regiony chromosomalne wpływające na płacz, mowę i rysy twarzy zostały wcześniej zmapowane do dystalnej części 5p (Overhauser i wsp. 1994; Gersh i wsp. 1995, 1997). Rysunek 3 pokazuje nasze dane dla podmiotów z granicami usunięcia, które dostarczają informacji na temat tych



Rysunek 4 Podsumowanie relacji genotyp-fenotyp na podstawie naszych danych i danych z poprzednich publikacji. Wskazane są pasma chromosomów względem mapy fizycznej z zamrożenia sekwencji ludzkiego genomu w lipcu 2003 roku.

relacje notyp-fenotyp. Klony na granicach są wskazane dla każdego przypadku. Region, który wpływa na charakterystyczny płacz, jest najwęższy zdefiniowany przez różnicę u pacjentów 49 i 252, z których obaj mają delecję śródmiąższową. U pacjenta 49, który ma krzyk, delecja zaczyna się w pobliżu klonu 12, podczas gdy u pacjenta 252, który nie ma krzyku, delecja może zachować sekwencje do klonu 14. W ten sposób zlokalizowany jest region chromosomalny odpowiedzialny za ten fenotyp w regionie 1,5 Mb między tymi klonami.

Region mający wpływ na charakterystyczne rysy twarzy jest najwęższy zdefiniowany przez pacjentów 117, 202 i 114. Pacjent 117 ma końcową delecję rozpoczynającą się między klonami 17 i 18 i nie ma fenotypu twarzy. Zatem ważny region musi leżeć w pobliżu klonu 17, ponieważ materiał może być zatrzymany aż do tej pozycji. Pacjent 202 ma większą delecję końcową, z granicą między klonami 26 i 27, i ma fenotyp. Definiuje to region o wielkości 2,4 Mb między klonami 17 i 27 jako region odpowiedzialny za rysy twarzy. Pacjent 114 popiera proksymalną granicę tego regionu. Pacjent 114 ma delecję śródmiąższową, z dalszą granicą między klonami 26 i 27, i nie ma fenotypu, co stawia krytyczne położenie dla tego fenotypu dystalnie do klonu 27. Zauważamy, że pacjent 252, który ma delecję obejmującą ten proponowany region krytyczny, jest niezgodny, ponieważ pacjent nie ma fenotypu.

Region chromosomalny odpowiedzialny za opóźnienie mowy najlepiej określają dane od pacjentów 102, 225 i 49, którzy mają delecję śródmiąższową. U pacjentów 102 i 225, którzy mają fenotyp, delecja jest proksymalna do klonu 4. U pacjenta 49, który nie ma fenotypu, dystalna część chromosomu może pozostać do klonu 13. Tak więc opóźnienie mowy jest spowodowane delecją w Region 3,2 MB między klonami 4 i 13.

Dyskusja

Ustalenie związku między genotypem a fenotypem pacjenta w zespołach rozwojowych jest pierwszym krokiem w kierunku odkrycia mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za objawy i stanowi podstawę klinicznego postępowania z chorobą u pacjentów. Liczne wcześniejsze badania aberracji chromosomowych, które prowadzą do zespołu cri du chat, ustaliły zarys tego związku, jak podsumowano na rycinie 4. Kilka regionów na chromosomie 5p, które oddzielnie wpływają na różne komponenty klasycznego fenotypu, zostały zdefiniowany, w tym jeden w 5p15.2, który ma silny wpływ na MR, określany jako "region krytyczny cri du chat" (CdCCR) i inne związane z charakterystycznym płaczem, opóźnieniem mowy i rysami twarzy. Jednak istnieją znaczne rozbieżności między różnymi badaniami, w tym kontrowersje dotyczące związku między MR a delecją. Nasze badanie, w którym wykorzystano macierzową CGH, aby zapewnić wydajną analizę zmian liczby kopii DNA w wysokiej rozdzielczości w grupie pacjentów, których fenotypy zostały dokładnie ocenione, dostarczyło dokładniejszych informacji na temat określonych aspektów fenotypu i wyjaśniło niektóre kontrowersyjne kwestie.

Związek wielkości i lokalizacji delecji z MR był trudny do ustalenia; niektóre badania wykazały stopniowy wzrost nasilenia efektu wraz ze wzrostem wielkości delecji (Mainardi i wsp. 2001), podczas gdy inne nie wykazały takiego związku (Marinescu i wsp. 1999a). W naszym badaniu przeanalizowaliśmy grupę pacjentów, którzy byli oceniani pod kątem stanu MR w skali numerycznej - w spójny sposób przez jednego obserwatora (EN) – wiele lat przed naszymi pomiarami (Niebuhr 1978a,1978b; Overhauser i in. 1990; Kjaera i Niebuhra 1999). Ponieważ ocena opóźnienia może zależeć od wieku pacjenta, uwzględniliśmy tylko pacjentów, dla których ocena została przeprowadzona w wieku15 lat. Wszystkie analizy wykorzystywały DNA wyizolowane z krwi obwodowej, a nie z linii komórkowych transformowanych wirusem Epsteina-Barra, tak więc aberracje wywołane transformacją nie zaburzały naszych wyników.

Rysunek 2*A*pokazuje związek delecji na poziomie 5p z poziomem MR. Oczywiste jest, że pacjenci z poziomem MR ~3 mają mniejsze delecje niż te z poziomem MR 15, ale zależność opóźnienia od wielkości delecji wydaje się słaba. Na przykład dla poziomów MR15, zakresy delecji pokrywają się prawie całkowicie na różnych poziomach opóźnienia, tak że wielu pacjentów z MR na poziomie 5 ma delecje 5p podobne do pacjentów z MR na poziomie 7. Ponadto istnieją pewne uderzające pozorne niezgodności. Pacjenci 112 i 114 mają ~Delecje śródmiąższowe o wielkości 10 MB, przy poziomach MR 1–2, podczas gdy głęboko dotknięty pacjent 45 ma znacznie mniejszą delecję śródmiąższową w tym samym regionie.

Analizy cytogenetyczne wykazały wcześniej, że niektórzy pacjenci z zespołem cri du chat mają złożone rearanżacje chromosomów, z aberracjami liczby kopii obejmującymi inne regiony genomu. W związku z tym wykonaliśmy CGH dla całego genomu u 37 pacjentów, w tym u wszystkich tych, u których delecja 5p wydawała się zbyt mała, aby wyjaśnić ich poziom opóźnienia. Aberracje oprócz delecji 5p wykryto u 15 z tych pacjentów, jak widać w tabeli 4. Nasze wyniki wskazują, że większość (14/22) pacjentów głęboko opóźnionych ma aberracje oprócz delecji 5p. Jeśli ograniczy się uwagę do tych podmiotów, u których jedynymi wykrytymi przez nas aberracjami były delecje w 5p, dezależność opóźnienia od wielkości i lokalizacji usunięcia staje się znacznie wyraźniejsza. Rysunek 2*B*pokazuje, że dla poziomów opóźnienia13,5, opóźnienie wzrasta monotonicznie wraz ze wzrostem wielkości delecji. Niewielkie odstępstwa od tego ogólnego zachowania mogą być spowodowane modyfikacją czynników genetycznych u pacjentów, niepewnością w określeniu poziomu MR lub niewykrytymi małymi aberracjami w innym miejscu genomu. Zauważamy, że klarowność związku MR z delecją, jak pokazano na rycinie 2*B*potwierdza dokładność oceny fenotypowej pacjentów, ponieważ jest wysoce nieprawdopodobne, aby mogło to nastąpić przypadkowo. Brak pacjentów z granicami delecji bardziej proksymalnymi niż 33 Mb od 5pter może wskazywać, że takie delecje są śmiertelne podczas rozwoju.

Array CGH zapewnia pełniejszą ocenę genomu niż standardowa cytogenetyka. Ogólnie rzecz biorąc, stwierdzamy, że~16% naszych badanych miało złożone aberracje, nieco wieksze niż 12%-13% we wcześniejszych badaniach (Niebuhr 1978a; Mainardi i in. 2001). Wielu – ale nie wszyscy - z dodatkowymi aberracjami dawkowania wykrytymi przez CGH macierzową (np. pacjent 206) wykryto cytogenetycznie aberracje strukturalne dotyczące chromosomu 5 i innych chromosomów (tabela 1). Odwrotnie, niektórzy pacjenci z międzychromosomalną aberracją cytogenetyczną nie mieli zmian liczby kopii poza chromosomem 5p (np. pacjenci 4 i 49). W związku z tym wyższa rozdzielczość i skuteczność macierzy CGH ma istotne zalety w ocenie nieprawidłowości dawkowania w zespole cri du chat i powinna przynosić znaczne korzyści diagnostyczne, zwłaszcza w przypadku pacjentów o znacznym opóźnieniu w rozwoju, z których około dwie trzecie ma niewielkie delecje 5p i dodatkowe aberracje..

Zależność MR od delecji 5p, jak pokazano na rycinie 2*B*, sugeruje obecność trzech regionów chromosomalnych, które w różny sposób wpływają na ten fenotyp. Pierwszy, MRI, jest uwzględniony w delecjach wszystkich pacjentów z poziomem opóźnienia12.5. Wyniki dla pacjentów 117 i 56 wskazują, że MRI może być ograniczony do regionu 1,2 Mb między klonami 15 i 18 w 5p15.31, który znajduje się na dystalnym końcu CdCCR w 5p15.2, jak zdefiniowano w innym miejscu (Overhauser i in. 1994; Mainardi i wsp. 2001). Nie jest jasne, ile krytycznych genów może być zawartych w MRI, ale jego ograniczona wielkość sugeruje, że może to być bardzo mała liczba.

Pozostałe dwa regiony, MRII i MRIII, są zlokalizowane bezpośrednio proksymalnie do MRI, jak pokazano na rycinie 2.*B.* Delecje ograniczone do MRII mają łagodny wpływ, podczas gdy te dotyczące tylko MRIII (np. u pacjenta 51) nie dają dostrzegalnego fenotypu. Jednak pacjenci z delecjami obejmującymi MRI mają coraz większe opóźnienie, ponieważ delecja rozciąga się na MRII i MRIII. Wydaje się zatem, że szereg genów w obrębie MRII i MRIII przyczynia się do fenotypu, prawdopodobnie poprzez modyfikację wpływu genów w MRI.

Definiowanie tych granic jest oczywiście tematem

do pewnej niepewności i zależy od przyjętego modelu, w jaki sposób delecje wpływają na MR. Nasz model zasadniczo przypisuje dominującą rolę MRI, z dodatkowymi aberracjami w MRII i MRIII służącymi do dramatycznego zwiększenia nasilenia fenotypu. Dalszą granicę MRI wyznacza fakt, że delecja lub zatrzymanie genów dystalnych do klonu 15 nie ma znaczącego wpływu na poziom MR u naszych pacjentów. Jednak w naszym zestawie nie ma pacjentów z delecjami ograniczonymi do regionu dystalnego od MRI, więc nie można tego całkowicie potwierdzić. Brak delecji może wskazywać na brak stwierdzenia ze względu na brak fenotypu MR, ale można by oczekiwać, że takie osoby mają inne cechy zespołu cri du chat.

Wyznaczenie proksymalnej granicy rezonansu magnetycznego jest bardziej problematyczne. Powyżej wskazaliśmy wybór najmniejszego możliwego regionu zgodnego z danymi, wykorzystując granicę pacjenta 117. Jednak inni badani, którzy mają zarówno mniej ciężkie, jak i poważniejsze poziomy opóźnienia, mają nieco większe delecje, z granicami w region klastra punktu przerwania w pobliżu klonów 26-28. Zatem pacjent 117 może być nieco anomalny, tak że MRI może rozciągać się dystalnie o dodatkowe 2 Mb do klonu 28. Analiza dużej liczby dodatkowych przypadków z dobrze scharakteryzowanymi fenotypami będzie wymagana w celu lepszego zdefiniowania tego regionu.

Delecje ograniczone do MRII i MRIII prowadzą do łagodnie dotkniętych lub fenotypowo normalnych osobników. Jednak ich względnie normalne stany fenotypowe wydają się "kruche", ponieważ dodatkowe aberracje prowadzą do ciężkich fenotypów. Te dodatkowe aberracje mogą obejmować delecję MRI, jak omówiono powyżej, i/lub zyski lub straty w innym miejscu na chromosomie 5 (dla pacjentów 25, 48, 104, 201 i 251) lub na innych chromosomach (tabela 4). Na przykład, głęboko opóźniony pacjent 45 ma tylko niewielką delecję w MRII na 5p, co powinno powodować bardzo łagodne opóźnienie. Tak więc dodatkowa delecja na 6q (ryc. 1*C*) przypuszczalnie skutkuje bardzo ciężkim fenotypem MR. Zauważamy, że zyski w MRII i MRIII mogą wpływać na fenotyp. Pacjent 48, z poziomem MR 6,5, ma delecję MRI i część MRII, co jest zgodne z poziomami opóźnienia 4–5. Zatem jego duplikacja (na granicy delecji) części MRII i MRIII ma silne efekty.

Na kruchość normalnego fenotypu u osób z delecjami w MRIII wskazują również dane rodzinne. Na przykład delecja u pacjenta 51 występuje u matki i dziadka, a wszyscy trzej pozostają nienaruszeni. Istnieją jednak doniesienia, że rodzice bez delecji w MRIII mogą mieć chore dziecko, które odziedziczyło delecję (Hand i wsp. 2000; Johnson i wsp. 2000). Ta zmiana w fenotypie może wskazywać, że środowiskowe lub dziedziczne czynniki modyfikujące, które nie wpływają niekorzystnie na osoby z normalnymi genomami, mają znaczące konsekwencje dla osób z delecją MRIII. Glinalternatywnie, dzieci dotknięte chorobą mogą mieć dodatkowe aberracje, które nie zostały wykryte za pomocą technik zastosowanych w tych badaniach. CGH z matrycą pełnogenomową o wysokiej rozdzielczości może wykryć takie aberracje i wyjaśnić status genotypowy takich dzieci.

Nasze pomiary zapewniły również lepsza lokalizacje regionów na chromosomie 5p, które wpływają na charakterystyczny płacz, rysy twarzy i opóźnienie mowy. Dla regionu płaczu, usunięcie tylko jednego klonu wyróżniało pacjentów z fenotypem i bez fenotypu. To umieszcza możliwe ważne geny między dwoma klonami flankującymi (zawierającymi markery) D5S2054 oraz D5S676, odpowiednio) w tablicy. Zatem analiza tych dwóch przypadków o wyższej rozdzielczości pozwoliłaby na umieszczenie bardziej rygorystycznych limitów w obszarze krytycznym. Analiza bieżących przypadków w wyższej rozdzielczości nie poprawi w znacznym stopniu obszarów opóźnienia mowy lub twarzy, ponieważ zawierają one klony z wieloma macierzami. Porównanie naszych wyników dotyczących relacji genotypfenotyp z wynikami poprzednich publikacji przedstawiono na rycinie 4.

Podsumowując, zmapowaliśmy aberracje u 94 pacjentów z delecją 5p, używając macierzy CGH w celu lepszego zrozumienia związku między genotypem a fenotypem. Wykazaliśmy, że istnieją trzy regiony chromosomu, które mają zróżnicowany wpływ na poziom MR pacjentów. Delecje obejmujące wszystkie lub części tych trzech regionów, w połączeniu z innymi aberracjami w genomie, oddziałują, tworząc pełny fenotyp MR. Wreszcie, nasze dane o wysokiej rozdzielczości umożliwiły udoskonalenie lokalizacji genów zaangażowanych w typowy płacz, rysy twarzy i opóźnienie mowy w zespole cri du chat.

Podziękowanie

Praca ta była wspierana przez grant HD 17665 amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia Dziecka i Rozwoju Człowieka, Vysis Inc., duński STF Program on Comparative Genomics, Duńską Platformę Biologii Integracyjnej Duńskiego Funduszu Badań Podstawowych oraz Narodową Fundację Nauk Przyrodniczych Chiny.

Informacje o elektronicznej bazie danych

Adresy URL danych przedstawionych w niniejszym dokumencie są następujące:

Online Mendlowskie dziedziczenie w człowieku (OMIM), http://www . ncbi.nlm.nih.gov/Omim/ (dla zespołu cri du chat) UCSC Genome Bioinformatics, http://genome.cse.ucsc.edu/

Bibliografia

- Albertson DG, Pinkel D (2003) Mikromacierze genomowe u ludzi choroba genetyczna i rak. Hum Mol Genet 12 (Specyfikacja 2): R145–152
- Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Szary JW, Pinkel D (2000) Ilościowe

mapowanie struktury amplikonu przez identyfikację tablicy CGH *CYP24* jako kandydat na onkogen. Nat Genet 25:144–146

- Church DM, Bengtsson U, Nielsen KV, Wasmuth JJ, Niebuhr E (1995) Molekularna definicja delecji różnych segmentów dystalnego 5p, które skutkują odrębnymi cechami fenotypowymi. Am J Hum Genet 56:1162–1172
- Kościół DM, Yang J, Bocian M, Shiang R, Wasmuth JJ (1997) Mapa fizyczna i transkrypcyjna w wysokiej rozdzielczości regionu cri du chat ludzkiego chromosomu 5p. Genome Res 7:787– 801
- Eichler EE (2001) Ostatnie powielanie, akrecja domen i dynamiczna mutacja ludzkiego genomu. Trendy Genet 17: 661–669
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP (2003) Mikromacierze DNA do porównawczej hybrydyzacji genomowej opartej na amplifikacji DOP-PCR klonów BAC i PAC. Geny Chromosomy Rak 36:361–374
- Gersh M, Goodart SA, Pasztor LM, Harris DJ, Weiss L, Overhauser J (1995) Dowód na odrębny region powodujący koci płacz u pacjentów z delecją 5p. Am J Hum Genet 56: 1404–1410
- Gersh M, Grady D, Rojas K, Lovett M, Moyzis R, Overhauser J (1997) Opracowanie narzędzi diagnostycznych do analizy delecji 5p przy użyciu interfazy FISH. Cytogenet Komórka Genet 77: 246– 251
- Ręka JL, Michels VV, Marinello MJ, Ketterling RP, Jalal SM (2000) Odziedziczona śródmiąższowa delecja chromosomów 5p i 16q bez widocznego efektu fenotypowego: dalsze potwierdzenie. Diagnoza Prenacka 20:144–148
- Hudson TJ, Stein LD, Gerety SS, Ma J, Castle AB, Silva J, Slonim DK, Baptista R, Kruglyak L, Xu SH, Hu X, Colbert AME, Rosenberg C, Reeve-Daly MP, Rozen S, Hui L, Wu X, Vestergaard C, Wilson KM, Bae JS, Maitra S, Ganiatsas S, Evans CA, DeAngelis MM, Ingalls KA (1995) Mapa ludzkiego genomu oparta na STS. Science 270: 1945-1954
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Wykrywanie zmienności na dużą skalę w ludzkim genomie. Nat Genet 36:949–951
- Jain AN, Tokuyasu TA, Snijders AM, Segraves R, Albertson DG, Pinkel D (2002) W pełni automatyczna kwantyfikacja danych obrazu z mikromacierzy. Genom Rez 12:325–332
- Johnson EI, Marinescu RC, Punnett HH, Tenenholz B, ponad-Hauser J (2000) delecja 5p14 związana z małogłowiem i drgawkami. J Med Genet 37:125–127
- Kjaer I, Niebuhr E (1999) Badania podstawy czaszki w 23 pacjenci z zespołem cri-du-chat sugerują pole rozwojowe czaszki związane z tym stanem. Am J Med Genet 82:6–14
- Levy B, Dunn TM, Kern JH, Hirschhorn K, Kardon NB (2002) Nakreślenie fenotypu dup5q metodą molekularnej analizy cytogenetycznej u pacjenta z dup5q/del 5p (cri du chat). Am J Med Genet 108:192-197
- Lupski JR, Roth JR, Weinstock GM (1996) Chromosomalny duplikacje w bakteriach, muszkach owocowych i ludziach. Am J Hum Genet 58:21–27
- Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD (2001) Charakterystyka kliniczna i molekularna 80 pa-

pacjenci z delecją 5p: korelacja genotyp-fenotyp. J Med Genet 38:151–158

- Marinescu RC, Johnson EI, Dykens EM, Hodapp RM, Over-Hausera J (1999*a*) Brak związku między wielkością delecji a poziomem opóźnienia rozwojowego w zespole cri-duchat. Am J Med Genet 86:66–70
- Marinescu RC, Johnson EI, Grady D, Chen XN, Overhauser J (1999*b*) Analiza FISH delecji końcowych u pacjentów z rozpoznaniem zespołu cri-du-chat. Clin Genet 56:282–288
- Niebuhr E (1978*a*) Obserwacje cytologiczne u 35 osób z kariotypem 5p. Hum Genet 42:143–156
- — (1978*b*) Zespół cri du chat: epidemiologia, cytogenetyka i cechy kliniczne. Hum Genet 44:227–275
- Overhauser J, Huang X, Gersh M, Wilson W, McMahon J, Bengtsson U, Rojas K, Meyer M, Wasmuth JJ (1994) Mapowanie molekularne i fenotypowe krótkiego ramienia chromosomu 5: sublokalizacja regionu krytycznego dla zespołu cri-duchat. Hum Mol Genet 3:247–252
- Overhauser J, McMahon J, Oberlender S, Carlin ME, Niebuhr E, Wasmuth JJ, Lee-Chen J (1990) Rodzicielskie pochodzenie delecji chromosomu 5 w zespole cri-du-chat. Am J Med Genet 37:83–86
- Peterson ET, Sutherland R, Robinson DL, Chasteen L, Gersh M, Overhauser J, Deaven LL, Moyzis RK, Grady DL (1999) Zintegrowana mapa fizyczna krótkiego ramienia ludzkiego chromosomu 5. Genome Res 9: 1250-1267
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) Analiza wysokiej rozdzielczości zmienności liczby kopii DNA przy użyciu porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy. Nat Genet 20:207–211 Pollack JR,
- Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999) Analiza zmian liczby kopii DNA w całym genomie przy użyciu mikromacierzy cDNA. Nat Genet 23:41–46
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Na dużą skalę polimorfizm liczby kopii w ludzkim genomie. Nauka 305: 525–528
- Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brązowy N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG (2001) Montaż mikromacierzy dla genomu- szeroki pomiar liczby kopii DNA. Nat Genet 29:263–264
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997) Porównawcza hybrydyzacja genomowa oparta na macierzy: biochipy do przeszukiwania nierównowagi genomowej. Geny Chromosomy Rak 20:399– 407
- Sreekantaiah C, Kronn D, Marinescu RC, Goldin B, Overhauser J (1999) Charakterystyka złożonej rearanżacji chromosomowej u pacjenta z typowym kocim płaczem i bez innych klinicznych objawów zespołu cri-du-chat. Am J Med Genet 86:264–268
- Wilkins LE, Brown JA, Nance WE, Wolf B (1983) erogenność u 80 wychowywanych w domu dzieci z zespołem cri du chat. J Pediatr 102:528-533