Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética

São Paulo 2011

Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética

São Paulo 2011

Orientadora: Dra. Angela M. Vianna Morgante

FONSECA, ANA CAROLINA DOS SANTOS

Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

 Rearranjos cromossômicos equilibrados 2. Alterações cromossômicas submicroscópicas 3. Hibridação *in situ* fluorescente 4. Hibridação genômica em *microarray*

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética de Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo concedidos à orientadora (FAPESP CEPID 1998/14254-2) e à aluna (FAPESP 2009/03480-8).

À Deus Aos meus amigos Aos meus familiares Agradeço:

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Dra. Angela M. Vianna Morgante, pela orientação neste projeto, por todos os ensinamentos, pela amizade e confiança depositada em mim.

À Dra. Juliana F. Mazzeu, pelos primeiros ensinamentos, pela amizade e por toda ajuda que me ofereceu durante esses anos.

Às Dras. Ana Cristina Krepischi e Carla Rosenberg, pelos ensinamentos sobre a-CGH, pelos auxílios e colaboração neste estudo.

À Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pelos auxílios e ajuda ao longo desses anos.

Ao Prof. Paulo Otto, pelos auxílios e ensinamentos clínicos.

Às Dras. Simone Aparecida Siqueira da Fonseca e Sylvie Antonini, pela permissão da continuidade de seus trabalhos.

À Maraisa, por todo apoio, amizade e ajuda durante esses anos e pelo auxílio na edição deste trabalho.

Aos técnicos Fátima, Mara, Paulo e Lígia, pela ajuda e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana, Silvia, Sarita, Rafaella, Adriano, José, Larissa, Jacaré, Lilian, Teresa, Ana Carla, Rezinha, Karina, Daniela, Vitor e Daniel pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

À família dos pacientes, pela colaboração.

À minha família, pelo apoio ao longo dos anos.

Aos meus amigos queridos pela compreensão, atenção e incentivo dado a todo o momento.

À Deus por ter me dado força em todos os momentos da minha vida.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

As anomalias cromossômicas ocorrem em cerca de seis a cada mil recémnascidos. As mais comuns são as aneuploidias, porém as alterações cromossômicas estruturais representam cerca de 40% das alterações cromossômicas em recém-nascidos (Jacobs e Hassold, 1986).

As alterações cromossômicas, em sua maioria, constituem eventos esporádicos e, devido aos desequilíbrios de dose, o efeito fenotípico impede sua transmissão para a geração seguinte. Os rearranjos estruturais, entretanto, são predominantemente equilibrados e seus portadores geralmente não apresentam sinais ou sintomas clínicos. Esses rearranjos equilibrados podem, assim, ser transmitidos por seus portadores que, no entanto, possuem riscos reprodutivos aumentados; a segregação meiótica dos cromossomos participantes dos rearranjos e de seus homólogos normais pode levar à produção de gametas com o rearranjo estrutural em estado não equilibrado, resultando em abortos espontâneos ou progênie com quadros clínicos. Estudos em casais com histórico de abortamento de repetição mostram que, em 3 a 6% daqueles que tiveram dois ou mais abortos consecutivos, um dos membros era portador de rearranjo equilibrado (Franssen et al., 2006).

I.1 Técnicas de estudo cromossômico

Em 1956, Tjio e Levan mostraram que o número de cromossomos da espécie humana é 46. A partir desse momento foi possível associar anomalias cromossômicas específicas a doenças. Nos anos 70, foram desenvolvidos protocolos de coloração que produziam um padrão de bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos (Caspersson et al., 1970; Drets e Shaw, 1971; Dutrillaux e Lejeune, 1971), totalmente reprodutível, permitindo a identificação de todos os pares de cromossomos, que eram anteriormente classificados apenas de acordo com o tamanho e a posição dos centrômeros. Alterações estruturais, como translocações, inversões, deleções e duplicações, passaram a ser identificadas com maior precisão.

Apesar dos avanços trazidos para a identificação dos cromossomos, as técnicas de bandamento aplicada a cromossomo metafásicos/prometafásicos permitem a detecção de alterações cromossômicas que afetem no mínimo 5 a 10 Mb. Mas o nível de resolução pode ser menor, dependendo do padrão de bandas do segmento afetado. O

desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas à citogenética trouxe maior precisão na caracterização dos rearranjos cromossômicos do que a que permite o bandamento.

Essas técnicas permitem a análise do genoma de forma global (*genome-wide*) ou alvo-dirigida, com diferentes graus de resolução (revisão em Speicher e Carter 2005; revisão em Feuk et al., 2006; Miller et al., 2010).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), baseada na detecção de sondas de DNA hibridadas a sequências complementares em cromossomos, foi um avanço importante para os estudos citogenéticos. Nesse método, a sonda e o DNA alvo na lâmina são desnaturados, seguindo-se a hibridação das sequências complementares. Para visualização em microscópio de fluorescência, as sondas são ligadas diretamente a um fluorocromo ou são marcadas com um heptano (biotina ou digoxigenina), já conjugado a um fluorocromo ou reconhecido por um anti-heptano ligado a um fluorocromo. As sondas de DNA podem ser clonadas a partir de um cromossomo inteiro, no caso das bibliotecas cromossômicas ou a partir de um segmento específico, podendo ser sondas para sequências únicas ou repetitivas, como as centroméricas. No estudo de rearranjos cromossômicos equilibrados, a hibridação *in situ* fluorescente permite refinar a localização de pontos de quebra e identificar microdeleções ou duplicações nos cromossomos rearranjados.

Nas técnicas de *spectral karyotyping* (SKY) e multicolor FISH (m-FISH), a marcação específica de cada cromossomo é feita utilizando combinações de fluorocromos. Em um único experimento pode-se analisar todos os cromossomos humanos, o que é particularmente vantajoso na identificação de material cromossômico de origem desconhecida, como no caso de cromossomos marcadores supranumerários e rearranjos cromossômicos complexos, como aqueles que ocorrem nos cânceres.

O nível mais alto de resolução para análise cromossômica baseada na técnica de FISH é atingido quando são usadas fibras de cromatina, como alvos para a hibridação. Nesse método *(fibre-FISH)*, as proteínas e histonas são removidas da cromatina que, assim, fica altamente distendida (Speicher e Carter, 2005). Constitui ferramenta especialmente útil para mapear sequências em regiões específicas do genoma, já que permite medir os espaços e sobreposições entre as sondas. Assim a resolução da técnica de FISH vai daquela na sua aplicação em preparações metafásicas/prometafásicas (resolução de 100 kb - 5 Mb), passando pela utilização em núcleos interfásicos (50 kb - 2 Mb) até o nível de fibras de cromatina (1 kb - 500 kb) (Speicher e Carter 2005).

Nos últimos anos, a hibridação genômica em *microarrays* tornou-se uma ferramenta efetiva para a detecção de perdas e ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos (Miller et al., 2010). A resolução do *microarray* é determinada pelo tamanho e pela distância entre as sondas, em sua cobertura parcial ou total do genoma. Na técnica de hibridação genômica comparativa baseada em *microarray* de DNA (a-CGH), o DNA controle e o DNA teste, marcados com fluorocromos diferentes, competem pela hibridação a sondas fixadas e organizadas na superfície de uma lâmina; perdas e ganhos de segmentos são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos. Os primeiros *arrays* utilizavam sondas clonadas em BACs (cromossomos artificiais de bactérias), porém plataformas mais recentes têm oligonucleotídeos como alvos de hibridação. Esses *oligoarrays* permitem maior flexibilidade na confecção de sondas, maior cobertura genômica e resolução superior aos *arrays* de BAC.

Outro tipo de *microarray* tem sondas de SNP, que permitem não somente a avaliação de desequilíbrios cromossômicos, mas a genotipagem. Nessa abordagem, a amostra de um único paciente é hibridizada ao *array* e alterações no número de cópias são detectadas pela comparação com hibridações de controles realizados separadamente (Speicher e Carter, 2005). Além de perdas e ganhos de segmentos, os *arrays* de SNP têm a vantagem de detectar perdas de heterozigose e permitir a determinação da origem parental de rearranjos esporádicos (Miller et al., 2010).

A hibridação em microarrays aumentou o poder de resolução da análise cromossômica global do nível de megabase para kilobase; consequentemente desequilíbrios cromossômicos não detectáveis pelas técnicas de bandamento passaram a ser descritos. Por exemplo, a aplicação de a-CGH no estudo de pacientes com deficiência mental ou malformações congênitas mostra que desequilíbrios submicroscópicos estão presentes em 15 a 20% dos casos (Rosenberg et al., 2006; Miller et al., 2010). Recentemente, com base em uma extensa revisão na literatura, o *International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium* recomendou a aplicação inicial do *microarray* no estudo de pacientes com malformações congênitas múltiplas, autismo, atraso de desenvolvimento ou deficiência mental de causas genéticas desconhecidas (Miller et al., 2010). O custo da técnica seria compensado pela elevada taxa de detecção de desequilíbrios submicroscópicos (entre 15 a 20% em comparação aos 3% detectados com o bandamento G). O estudo preconizou que o uso do

bandamento G deve limitar-se ao estudo de pacientes com síndromes cromossômicas conhecidas, histórico de rearranjos cromossômico na família ou de abortos de repetição.

Na análise de rearranjos cromossômicos equilibrados, a aplicação de a-CGH tem permitido não somente detectar alterações submicroscópicas nos pontos de quebra, mas também alterações distantes a ele inclusive em cromossomos que não participam diretamente do rearranjo (Gribble et al., 2005; Sismani et al., 2008), essa uma vantagem em relação à técnica alvo-específica de FISH. Entretanto, deve-se considerar que a hibridação genômica em *array* não revela, na maioria das vezes, o tipo do rearranjo cromossômico que deu origem à perda ou ao ganho de segmentos.

Uma modificação no protocolo de a-CGH permite estudar especificamente os pontos de quebra dos rearranjos cromossômicos (Fiegler et al., 2003). A técnica de *array painting* utiliza *flow sorting* para isolar os cromossomos derivativos e posteriormente esse material é hibridado ao *array*. No caso de translocações equilibradas, ao marcar os cromossomos derivativos com fluorocromos diferentes, sequências proximais e distais ao ponto de quebra de cada cromossomo serão marcadas com cores diferentes. Essa estratégia permite identificar os segmentos que contêm os pontos de quebra, com base na razão entre as intensidades dos sinais dos fluorocromos.

Recentemente, o sequenciamento de próxima geração foi aplicado ao estudo de rearranjos equilibrados (Kloosterman et al., 2011; Talkowski et al., 2011). O uso das novas tecnologias permite identificar e sequenciar múltiplos pontos de quebra simultaneamente. As análises revelaram grande complexidade com a identificação de novos pontos de quebra e de perdas e ganhos de segmentos. Talkowski et al. (2011) admitem que, futuramente, com uma melhor relação custo-benefício, os rearranjos cromossômicos e as variações estruturais serão mapeados e sequenciados, em larga escala, no nível de resolução de pares de base.

I.2 Mecanismos de formação de rearranjos cromossômicos

A recombinação homóloga não alélica (*Non Allelic Homologous Recombination* - NAHR) e a junção de extremidades não homólogas (*Non-Homologous End Joining* - NHEJ) são os mecanismos classicamente considerados na formação de rearranjos cromossômicos. Nos últimos anos, o uso de novas ferramentas para a caracterização molecular dos pontos de quebra e junção dos rearranjos cromossômicos vem revelando sua complexidade e vários mecanismos têm sido propostos para explicar a formação

desses rearranjos, baseados em erros na duplicação do DNA, como o *Fork Stalling and Template Switching* - FoSTeS (Lee et al., 2007).

Ocorrendo mais de uma quebra de dupla fita de DNA em uma célula, o reparo por NHEJ pode unir extremidades que não estavam contíguas, originando rearranjos estruturais. Inicialmente as extremidades quebradas emparelham com base na homologia de alguns poucos pares bases e sua junção ocorre após adição ou perda de alguns pares de base, tornando as fitas compatíveis (Figura 1; revisão em Gu et al., 2008).



FIGURA 1. Formação de rearranjos cromossômicos por junção de extremidades não homólogas (NHEJ): Após detecção da quebra pelo mecanismo de reparo (1), as extremidades quebradas das duplas fitas de DNA emparelham por homologia de alguns poucos pares de base (2). A adição ou perda de poucos pares de base (3) tornam as fitas compatíveis, ocorrendo a junção (4), que deixa "cicatriz" indicativa de NHEJ como o mecanismo gerador do rearranjo. (Adaptada de Gu et al., 2008.)

Os rearranjos estruturais podem ainda se originar por recombinação homóloga, quando são utilizadas sequências homólogas não alélicas, como substrato para a recombinação (NAHR; Figura 2). Esse é o mecanismo que origina a maioria dos rearranjos cromossômicos estruturais recorrentes, como a duplicação do cromossomo 17, que causa a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 1A (CMT1A; MIM 601097), e a deleção do cromossomo 7, que resulta na síndrome Williams-Beuren (WBS; MIM 194050). Em geral, a recombinação ocorre entre repetições de poucas cópias (*Low Copy*)

Repeats - LCR), que têm entre 10 e 500 kb de extensão e compartilham mais de 95% de identidade; representam de 5% a 10% do genoma humano. Apesar de mais raramente, elementos repetitivos (*Short Interspersed Nuclear Elements*, SINE; *Long Interspersed Nuclear Elements*, LINE) também podem ser substratos para a recombinação homóloga não alélica (revisão em Shaw e Lupski, 2004).



FIGURA 2. Formação de rearranjos cromossômicos por recombinação homóloga não alélica (NAHR): Emparelhamento seguido de recombinação entre *Low Copy Repeats* (LCR; setas laranjas e roxas), que estão orientadas na mesma direção e compartilham alta homologia, resultando em cromossomos com duplicação e deleção. As linhas escuras representam a dupla fita do DNA. (Adaptada de Bailey e Eichler et al., 2006).

O estudo dos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos pode fornecer informações sobre o mecanismo de reparo que contribuiu para sua formação. Como a maioria dos trabalhos focaram rearranjos cromossômicos recorrentes, grande parte do conhecimento nessa área baseia-se no estudo dos mecanismos associados a esse tipo de rearranjo.

No caso das translocações Robertsonianas, o emparelhamento de sequências repetitivas pericentroméricas, que teriam homologia em cromossomos acrocêntricos, facilitariam a transferência de braços cromossômicos pela troca entre sequências emparelhadas em disposição invertida ou por recombinação em U. Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos contêm múltiplas cópias de DNA satélite e genes de RNA ribossômico 18S e 28S, sendo algumas sequências únicas para cada cromossomo e outras, compartilhadas entre acrocêntricos. O *clustering* de pontos de quebra das translocações Robertsonianas recorrentes rob(13q14q) e rob(14q21q) sugere um mecanismo específico de formação desse tipo rearranjo. Em 97% dessas translocações o ponto de quebra no cromossomo 14 ocorre nas mesmas sequências satélites. Nos cromossomos 13 e 21, o ponto de quebra ocorre em sequências satélites e em genes de

RNA ribossômico. Sequências compartilhadas pelos cromossomos 13, 14 e 21, estando no cromossomo 14 em orientação oposta às sequências nos cromossomo 13 e 21, facilitariam a ocorrência de translocações rob(13q14q) e rob(14q21q) em relação à rob(13q21q) (revisão em Shaffer e Lupski, 2000).

O mecanismo de recombinação homóloga não alélica também foi proposto para a formação da translocação recíproca recorrente t(4;8)(p16;p23). Ambos os pontos quebra ocorrem em *clusters* de genes receptores olfativos, sugerindo que a recombinação entre esses lócus em 4p16 e 8p23 seja responsável pela formação do rearranjo (Giglio et al., 2001). Assim como as translocações Robertsonianas recorrentes, a t(4;8)(p16;p23) forma-se preferencialmente na gametogênese materna (Page et al., 1997; Giglio et al., 2002).

Já a translocação recíproca recorrente mais frequente, a t(11;22)(q23;q11), é um exemplo de rearranjo associado à formação de estruturas secundarias do DNA que criariam instabilidade genômica em loco específico (revisão em Kurahashi et al., 2010). Os pontos de quebra em 11q23 e 22q11 localizam-se em regiões ricas em AT, que formam estruturas palindrômicas denominadas, respectivamente, de PATRR11 e PATRR22 (*Palindromic AT-rich Repeats*, PATRR) (Kurahashi et al., 2000; Kurahashi et al., 2001a; Kurahashi et al., 2007). O estudo dos fragmentos de junção em t(11;22) localizou os pontos de quebras em ambos os cromossomos no centro das PATRR (Kurahashi et al., 2000). Pequenas regiões palindrômicas de DNA, como as PATRR, podem formar estruturas cruciformes de fita dupla que induziriam a instabilidade genômica, levando à quebra na dupla fita e formação das translocações (Kurahashi et al., 2004). A ausência de homologia e a presença de pequenas deleções nos pontos de quebra da t(11;22) sugerem que, após a quebra na dupla fita do DNA, o reparo é realizado via NHEJ (revisão em Shaffer e Lupski, 2000). A frequência relativamente alta da t(11;22) em espermatozóides de homens normais (Kurahashi et al., 2001b) e a origem paterna de t(11;22) esporádicas (Ohye et al., 2010) indicam que esse rearranjo se origina na espermatogênese.

Em geral, são desconhecidos os mecanismos de formação e as sequências participantes da maior parte dos rearranjos cromossômicos equilibrados não recorrentes. O aprimoramento das técnicas citogenéticas, em associação com a análise do DNA e o crescente conhecimento da sequência e da arquitetura do genoma humano tornaram factível a elucidação dos mecanismos de formação desses rearranjos cromossômicos.

Com o objetivo de caracterizar os rearranjos cromossômicos equilibrados assim como seus mecanismos geradores, Higgins et al. (2008) clonaram e sequenciaram 18 pontos de quebra de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados, presentes em indivíduos com malformações congênitas graves. Em apenas um caso foram encontradas, em ambos os pontos de quebra, sequências que, pela similaridade compartilhada, poderiam ter mediado a formação do rearranjo por NAHR. Nos pontos de quebra da maioria dos rearranjos foram detectadas duplicações, inserções e deleções de poucos pares de base, uma indicação de NHEJ como mecanismo gerador do rearranjo. O mecanismo de NHEJ também foi proposto no caso de translocações entre o cromossomo X e um autossomo, em que não havia homologia extensa entre os segmentos envolvidos e se detectaram pequenas deleções, duplicações e inserções nos pontos de quebra e junção (van Bakel et al., 1995; Vianna-Morgante et al., 2004).

Recentemente um novo mecanismo foi proposto para a formação de rearranjos cromossômicos. Lee et al. (2007) aplicaram oligoarrays e sequenciamento dos pontos de quebra para analisar duplicações não recorrentes, que incluíam o gene PLP1 (proteolipid protein 1), associadas à doença de Pelizaeus-Merzbacher, (PMD; MIM 312080). Apesar de terem identificado duplicações em tandem em 65% dos casos, os rearranjos eram mais complexos com segmentos duplicados interrompidos por segmentos intactos, triplicados ou deletados. O mecanismo de Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) foi proposto para explicar a complexidade desses rearranjos. Baseia-se na correção da duplicação do DNA, interrompida por lesões ou formação de estruturas secundárias; diante da interrupção da forquilha de duplicação, a fita lagging invade outras forquilhas próximas, até completar a duplicação da fita lagging na forquilha original. A mudança de forquilha exige a presença de microhomologias com os sítios invadidos para o priming da extremidade 3' reiniciar a replicação (Figura 3). FoSTeS aparece como explicação para outros rearranjos complexos, como deleções no cromossomo 17 associadas à síndrome de Smith-Magenis (MIM, 182290) (Gu et al., 2008) e duplicações que incluem o gene MECP2 (Carvalho et al., 2009), podendo ser um mecanismo frequente na origem de rearranjos estruturais.

I.3 Rearranjos cromossômicos equilibrados associados a sinais e sintomas clínicos

Apesar de a maioria dos portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados serem clinicamente normais, cerca de 7% dos rearranjos equilibrados esporádicos estão associados a alterações fenotípicas (Warburton, 1991). Estudos de indivíduos com deficiência mental e malformações congênitas evidenciaram que as translocações aparentemente equilibradas são mais freqüentes nesse grupo do que na população geral (Tharapel et al.,1977; Fryns e van den Berghe,1979).



FIGURA 3. Formação de rearranjo cromossômico por *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS): (1) Após o início da duplicação do DNA (linhas azul escuro e vermelho), lesões ou estruturas secundárias podem levar à parada da duplicação; a fita *lagging* (linha vermelha pontilhada) invade uma segunda forquilha de duplicação próxima (linhas sólidas, roxa e verde) via micro-homologia, (2) reiniciando-se a síntese de DNA (linha pontilhada verde). (3) Uma terceira forquilha (linhas sólidas, cinza e preta) pode ser invadida por essa fita *lagging*, continuando a duplicação (linha preta pontilhada). Uma série de eventos FoSTeS pode ocorrer até (4) a fita *lagging* original completar a duplicação. (Adaptada de Lee et al., 2007).

Diferentes mecanismos têm sido identificados ou sugeridos para explicar a associação entre rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e quadros clínicos. Uma das explicações mais óbvias é a interrupção de genes pelas quebras cromossômicas (Zatz et al., 1981; Bonaglia et al., 2001). Elementos reguladores também podem ser danificados pelas quebras (Leipoldt et al., 2007). A expressão de genes situados próximos aos pontos de quebra pode ser alterada devido a "efeito de posição"; nesse caso, o rearranjo não altera diretamente o gene ou sua região promotora, mas a mudança de posição pode separar o gene de um elemento regulador ou pode aproximá-lo da região reguladora de outro gene (Kleinjan e Heyningen, 1998). Recentemente a aplicação de *microarrays* de DNA ao estudo de rearranjos aparentemente equilibrados tem revelado a complexidade de muitos deles, que incluem microdeleções e duplicações próximas aos pontos de quebra ou neles próprios e que podem explicar os fenótipos alterados (Gribble et al., 2005; De Gregori et al., 2007; Sismani et al., 2008).

Assim, a caracterização dos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos equilibrados pode levar à identificação de genes candidatos a serem responsáveis pelos

quadros clínicos a eles associados. No entanto, é importante ressaltar que a associação entre fenótipo alterado e rearranjos equilibrados pode ser ao acaso e indivíduos clinicamente normais portadores de rearranjos aparentemente equilibrados podem ter genes interrompidos pelos pontos de quebra (Baptista et al., 2008).

• Interrupção de genes pelas quebras cromossômicas

As quebras cromossômicas podem interromper a estrutura de genes. A identificação do gene da distrofina foi um dos primeiros casos de mapeamento de um gene a partir de uma translocação. No início da década de 80 foram publicados vários trabalhos que descreveram mulheres afetadas por distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD), que eram portadoras de translocações recíprocas entre o cromossomo X e um autossomo (Zatz et al., 1981, Boyd et al., 1986). Em todos esses casos, o ponto de quebra no cromossomo X ocorreu na banda Xp21, o que sugeria que o gene mutado na DMD estava localizado nesse segmento e que tinha sido interrompido pelas quebras que originaram as translocações. Esses resultados juntamente com a detecção de deleções em afetados permitiram a clonagem do gene da distrofina (Koenig et al., 1987). A manifestação da DMD, que tem herança recessiva, nas mulheres foi resultado da inativação do cromossomo X normal. Em geral, esse padrão de inativação é observado em portadoras de translocações X- autossomo; o desvio da inativação casual decorre da seleção contrária às células que inativam o cromossomo X translocado, que não são equilibradas do ponto de vista funcional, pois apresentam dissomia parcial do cromossomo X e monossomia parcial do autossomo. O estudo de translocações Xautossomo levou à identificação de muitos outros genes no cromossomo X, relacionados a doenças.

O estudo de rearranjos equilibrados tem sido importante na identificação de genes candidatos a quadros de deficiência mental com herança ligada ao X, especialmente nos casos não sindrômicos, em que os estudos de ligação são dificultados (revisão em Vandeweyer et al., 2009). Zemni et al. (2000), por exemplo, verificaram que o gene *TM4SF2 (Transmembrane 4 Superfamily, Member 2)*, mapeado em Xp11.4, tinha sido interrompido pela translocação t(X;2)(p11.4;p21.3) em uma paciente com deficiência mental não sindrômica. A expressão do fenótipo foi resultado da inativação do cromossomo X normal. O gene *TM4SF2* é altamente expresso no sistema nervoso central, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo, sendo indicado candidato ao quadro clínico. Isso foi confirmado com a detecção de mutações no gene *TM4SF2* em três

famílias em que a deficiência mental não sindrômica tinha sido mapeada no segmento Xp11.4. Posteriormente mutações nesse gene foram descritas em outros homens afetados (Abidi et al., 2002; Maranduba et al., 2004). Além do gene *TM4SF2*, 13 genes candidatos a deficiência mental sindrômica e não sindrômica foram identificados no cromossomo X em estudos de translocações equilibradas. A associação causal está confirmada para 10 deles, pela identificação de mutações em outros pacientes com deficiência mental (revisão em Vandeweyer et al., 2009).

Genes localizados em cromossomos autossômicos também foram identificados em estudos de rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos. Esses genes são sensíveis a dosagem e os quadros clínicos estão associados a haploinsuficiência dos genes interrompidos pelas quebras cromossômicas.

Um dos exemplos mais conhecidos é o do gene da neurofibromatose tipo 1 (NF1; MIM 162200). O estudo de duas translocações com pontos de quebra em 17q11.2 levou à identificação do gene da doença nesse segmento. Schmidt et al. (1987) descreveram uma família com afetados por NF1 associada a uma translocação t(1;17)(p34;q11.2) e Ledbetter et al. (1989) descreveram uma translocação t(17;22)(q11.2;q11.2) em uma afetada por NF1. Wallace et al. (1990) verificaram que o gene *NF1 (neurofibromin 1)* tinha sido interrompido pelas quebras dessas translocações no cromossomo 17 e descreveram uma mutação no gene *NF1* em outro afetado pela doença.

Um exemplo mais recente é a síndrome de Cornelia de Lange (CDLS1; MIM 122470). Tonkin et al. (2004) descreveram uma criança com CDLS1, portadora de translocação equilibrada t(5;13)(p13.1;q12.1). A caracterização do ponto de quebra no cromossomo 5 mostrou que o gene *NIPBL (Nipped-B-like)* tinha sido interrompido. A função desse gene em células de mamíferos não era conhecida, mas o padrão de expressão era compatível com o fenótipo da síndrome. Considerando o gene como candidato, os autores estudaram outros afetados pela síndrome e identificaram nove mutações de ponto no gene *NIPBL*.

O estudo de rearranjos equilibrados tem sido importante também na identificação de genes candidatos a deficiência mental não ligada ao X. Vandeweyer et al. (2009), em sua revisão sobre rearranjos equilibrados entre autossomos, associados a deficiência mental, realacionam 15 genes candidatos, mas apenas *GLI3 (GLI family zinc finger 3)* foi validado, pela presença de mutações em outros indivíduos com deficiência mental (Johnston et al., 2005). Cacciagli et al. (2010) descreveram uma paciente com

deficiência mental moderada a grave e hipotonia, portadora de translocação t(10;13) (p12.1;q12.13). A caracterização do rearranjo mostrou que o gene *ATP8A2 (ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2)*, mapeado em 13q12.13, foi interrompido pelo ponto de quebra. Esse foi o único gene alterado pelo rearranjo e a análise por a-CGH não identificou desequilíbrios submicroscópicos. O gene *ATP8A2*, que codifica uma ATPase, é altamente expresso no cérebro humano e de camundongo. Os autores não detectaram mutações nesse gene em uma amostra pequena de 38 pacientes com quadros similares ao da portadora da translocação, isso significando que mutações no gene *ATP8A2* não é causa frequente de deficiência mental, o que também acontece com a maioria dos genes já relacionados a deficiência mental.

A síndrome da deleção terminal 22q13.3 é caracterizada por grave atraso de linguagem, deficiência mental moderada, hipotonia e dismorfismos faciais (MIM 606232). Bonaglia et al. (2001) identificaram uma criança com quadro típico da síndrome, portadora de translocação equilibrada t(12;22)(q24.1;q13.3). O ponto de quebra no cromossomo 22 interrompia o gene *SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3)*, que é altamente expresso no córtex cerebral e cerebelo. Os autores sugeriram que a haploinsuficiência desse gene seria responsável pela síndrome da deleção terminal em 22q13.3. Posteriormente, Wilson et al. (2003) identificaram uma região crítica de 130 kb comum a 46 pacientes, que incluía o gene *SHANK3*.

Além da identificação de genes candidatos para doenças monogênicas, o estudo de rearranjos equilibrados também pode contribuir para elucidar os mecanismos genéticos responsáveis por doenças complexas. Bache et al. (2006) avaliaram o potencial da associação entre translocações equilibradas e essas doenças. Para isso, investigaram a presença de várias doenças complexas em portadores de translocações equilibradas sem histórico de doença de manifestação precoce. Foram considerados como potencialmente associados a doenças complexas, as translocações que cossegregavam com o quadro clínico com um *lod score* significativo ou aquelas translocações cujos pontos de quebra estavam localizados em regiões que já haviam sido associadas às doenças. Os autores identificaram 42 pontos de quebra potencialmente associados a doenças complexas. A associação mais consistente ocorreu entre um ponto de quebra em 1p36 em uma translocação t(1;18)(p36.1;q21) familial que segregava com dislexia. O loco DYX8, também mapeado em 1p36, já havido sido associado à dislexia em estudo de ligação (Tzenova et al., 2004). Outra associação muito provável ocorreu entre uma translocação t(9;17)(q33;q25.3) e distúrbio bipolar

famílial. A associação entre o segmento 17q25.3 e o distúrbio bipolar foi apoiada pela identificação, no mesmo trabalho, de dois pacientes com depressão e pontos de quebra de translocação nesse segmento.

• Formação de gene híbrido

Os rearranjos cromossômicos podem formar genes híbridos, cujos produtos estão associados geralmente ao desenvolvimento de tumores. Para que ocorra a formação de transcrito hibrido, ambos os genes precisam estar orientados na mesma direção e o quadro de leitura deve ser preservado. O exemplo mais conhecido é o da leucemia mielóide crônica (MIM 608232), caracterizada pela presença da translocação t(9;22)(q34;q11) na linhagem tumoral. No ponto de quebra do cromossomo 9, o gene *ABL (Abelson tyrosine kinase)* está interrompido. O gene codifica uma tirosina quinase que atua na regulação do ciclo celular. O gene *BCR (Breakpoint Cluster Region)*, cuja função não é conhecida, é interrompido pelo ponto de quebra no cromossomo 22. No cromossomo 22 derivativo, o cromossomo Filadélfia, ocorre a justaposição dos genes *ABL* e *BCR*, formando um gene híbrido que codifica um polipeptídio similar ao produto do *ABL*. No entanto, a substituição da porção N-terminal de ABL pela porção N-terminal de BCR faz com que o produto híbrido tenha atividade desregulada e constitutiva de tirosina quinase. Essa proteína estimula a proliferação de células precursoras hematopoiéticas e impede que sofram apoptose.

Apesar de raros, existem relatos de formação de transcritos híbridos associados a translocações em afetados por deficiência mental e malformações congênitas (Nothwang et al., 2001, Ramocki et al., 2003, Backx et al., 2011). Nothwang et al. (2001) descreveram o primeiro caso de formação de gene quimérico não associado a câncer. Uma translocação (1;19)(q21.3;q13.2) *de novo* foi detectada em uma criança com deficiência mental, ataxia e atrofia do cérebro. O rearranjo interrompeu nos cromossomos 1 e 19, respectivamente, os genes *CLK2 (cdc-like kinase 2)* e *PAFAH1B3 (platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 3*). No cromossomo derivativo 1 formou-se um gene híbrido composto pelos exons 2 a 13 do *CLK2* e pelos exons 1 a 4 do *PAFAH1B3*, que codifica uma proteína formada pelos 136 aminoácidos iniciais de PAFAH1B3 e pelo polipeptídio completo e não modificado codificado pelo *CLK2*, já que o exon 1 desse gene não é transcrito. Os autores avaliaram se as funções dos polipeptídios ficaram conservadas no híbrido. O *CLK2* codifica uma quinase que atua na regulação da atividade de fatores de *splicing* ricos em serina e arginina, função

que ficou conservada no polipeptídeo híbrido. Já o *PAFAH1B3* codifica um polipeptídio que se liga a LIS1, formando um complexo com atividade de proteína G heterotrimérica. No polipeptídeo híbrido houve perda de capacidade de ligação a LIS1 e perda da atividade hidrolítica de PAFAH1B3. Os autores sugerem que o fenótipo do paciente está relacionado a haploinsuficiência de *PAFAH1B3*.

Em uma paciente com manifestações neurológicas, incluindo agenesia do corpo caloso, foi identificada uma translocação t(2;9)(p24;q32) (Ramocki et al., 2003). O estudo por FISH e a análise por PCR revelou que dois genes Zn-finger (*KIAA1803* e *ASXL2*), expressos em todos os tecidos, tinham sido interrompidos. Consequentemente, o rearranjo originou um transcrito híbrido em cada cromossomo derivativo. Apesar de os genes *KIAA1803* e *ASXL2* serem candidatos a atuarem no desenvolvimento do sistema nervoso, o mecanismo associado ao fenótipo pode ser a haploinsuficiência de um ou ambos os genes ou de ganho de função dos polipeptídeos híbridos.

Recentemente, Backx et al. (2011) estudaram um paciente com deficiência mental e agenesia do corpo caloso, portador de uma translocação recíproca esporádica t(6;14)(q25.3;q13.2). A caracterização molecular do rearranjo revelou um genótipo complexo com a interrupção dos genes ARID1B (AT rich interactive domain 1B (SWI1like)) e MRPP3 (mitochondrial RNase P protein 3) e consequente formação de genes híbridos nos cromossomos derivativos. A presença dos transcritos híbridos foi detectada por RT-PCR e confirmada por sequenciamento. O mecanismo patogênico mais provável seria a haploinsuficiência de um ou de ambos os genes alterados. O gene ARIRID1B, que atua na remodelagem da cromatina, constituí um bom candidato devido a seu padrão de expressão; além disso, mutações em outro gene da mesma família, KDM5C (lysine (K)-specific demethylase 5C), causa deficiência mental sindrômica e não sindrômica (Jensen et al., 2005). Adicionalmente, um paciente incluído no DECIPHER (registro 4662), é portador de uma microdeleção que inclui apenas o ARIRID1B. O paciente tem atraso de fala, retardo mental e comportamento autístico. No entanto, o ganho de função ou efeito dominante negativo dos transcritos híbridos não pode ser descartado.

Assim, nessas translocações constitutivas, mesmo diante da formação de produtos híbridos, a haploinsuficiência de genes interrompidos pelas quebras cromossômicas parece ser a causa dos quadros clínicos.

• Efeito de posição

O efeito de posição é definido como uma alteração da expressão gênica devida a mudança de posição do gene do seu ambiente cromossômico, não estando associado a mutação ou deleção intragênica, mantendo-se portanto, a unidade transcricional e o promotor intactos (Kleinjan e Heyningen, 1998). O efeito de posição pode estar associado a alterações fenotípicas por dois mecanismos principais: heterocromatização ou alteração da relação espacial do gene com elementos reguladores em cis. No último caso, o rearranjo pode afastar um gene de elementos reguladores próprios ou de um elemento de fronteira ou ainda pode aproximá-lo de elementos reguladores de outro gene. Com raras exceções, os genes já associados ao efeito de posição codificam fatores de transcrição que atuam no desenvolvimento, refletindo a importância do controle temporal e espacial da expressão desses genes. O estudo de rearranjos com pontos de quebra 3' ou 5' a esses genes tem contribuído para elucidar a complexidade das regiões reguladoras de genes que atuam no desenvolvimento em mamíferos (revisão em Kleinjan e Lettice, 2008).

Recentemente, Kleinjan e Coutinho (2009) propuseram que doenças causadas por interrupção da arquitetura em cis da região reguladora de um loco gênico sejam chamadas de "cis-ruption disorders". Um exemplo é a displasia campomélica (CD, MIM 114290), doença rara e frequentemente letal, caracterizada por alterações esqueléticas, entre as quais se destacam o encurvamento e a diminuição do comprimento dos ossos longos. A maioria dos afetados são portadores de mutações na região codificadora do gene SOX9 (Sry-related hmg-box gene 9), mapeado no braço longo do cromossomo 17. Todavia existem relatos de afetados que não possuem essas mutações, mas são portadores de rearranjos equilibrados cujos pontos de quebra se localizam upstream ao SOX9. Leipoldt et al. (2007) classificou os pontos de quebra desses rearranjos em clusters proximais e distais, localizados, respectivamente, a 50-375 kb e 789-932 kb upstream ao gene SOX9. A curvatura anormal dos ossos longos, característica principal da CD, está ausente nos portadores de rearranjos cujos pontos de quebra se localizam no cluster distal. Nesses casos, a doença é chamada de displasia campomélica acampomélica (ACD). Mais recentemente, Benko et al. (2009), descreveram pontos de quebra localizados a mais de 1Mb upstream ao SOX9 em afetados pela sequência de Pierre Robin (PRS; MIM 261800), caracterizada por fissura de palato, micrognatia e glossoptose. A sequência de PRS está frequentemente presente em algumas síndromes mendelianas, incluindo a CD e a ACD. Diante desse cenário,

Gordon et al. (2009) propõem que a região reguladora do *SOX9* se estenda além de 1,23 Mb *upstream* ao gene. Os rearranjos cromossômicos removeriam um ou mais elementos reguladores em cis, levando a alteração da expressão do *SOX9* e aos quadros clínicos.

Outro gene para o qual o efeito de posição já foi proposto é o *PAX6 (paired box* 6), mapeado em 11p13, cuja haploinsuficiência está associada a aniridia (NA, MIM 106210). Já foram descritos indivíduos afetados que eram portadores de rearranjos cromossômicos com pontos de quebra *downstream* ao gene, o mais distal localizando-se a 125 kb do último exon do *PAX6* (Fantes et al., 1995; Lauderdale et al., 2000; Crolla e van Heyningen, 2002). Todos os pontos de quebra se localizam no último intron do gene *ELP4* [*elongation protein 4 homolog (S. cerevisiae)*], que é expresso em todos os tecidos. Estudos em camundongos indicam que a interrupção do *ELP4* não contribui para o fenótipo.

O rearranjo pode também aproximar o gene de elementos reguladores de outro gene. Um exemplo clássico é o linfoma de Burkitt (BL; MIM 113970), caracterizado pela proliferação monoclonal de linfócitos-B5; em 80% dos casos a translocação t(8:14)(q24:q32) está presente na linhagem tumoral. No cromossomo derivativo 14 o gene *c-myc* [*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*], translocado do cromossomo 8, está justaposto aos de imunoglobulina e passa a estar sob o controle de seus reguladores, tendo sua expressão exacerbada. O gene *c-myc* atua em vários aspectos da biologia celular incluindo proliferação, diferenciação, metabolismo e apoptose. A superexpressão do gene *c-myc* no cromossomo derivativo (14) altera essas funções e, consequentemente, desenvolve-se o tumor.

Além da alteração de elementos reguladores em cis, o rearranjo cromossômico pode influenciar a expressão de gene(s) próximo(s) ao ponto de quebra devido a alteração da estrutura da cromatina. A heterocromatização pode ocorrer quando o rearranjo aproxima uma região de eucromatina a uma região de heterocromatina; o estado mais condensado do DNA da heterocromatina pode avançar para a região eucromática justaposta, silenciando genes, de forma aleatória, mas estável. Rees et al., (1994) descreveram uma translocação em mosaico, associada a β-talassemia, na qual o gene da cadeia β da hemoglobina foi translocado intacto do cromossomo 11 para o cromossomo 22, junto ao centrômero. Os autores sugerem que o gene estaria silenciado devido à proximidade com a região pericentromérica, de cromatina constitutiva.

• Dissomia uniparental (UPD)

A dissomia uniparental (UPD) é definida pela presença no cariótipo de um par de cromossomos homólogos ou de segmentos cromossômicos homólogos com mesma origem parental. É classificada como isodissomia uniparental quando o mesmo cromossomo ou segmento cromossômico está presente em duplicata. Quando são herdados dois cromossomos homólogos diferentes ou parte deles de um mesmo genitor, tem-se uma heterodissomia uniparental.

Cerca de 30% dos casos de UPD estão associados a cariótipos anormais, sendo 8% rearranjos equilibrados (Liehr, 2010). No caso de um portador de translocação equilibrada, uma não disjunção meiótica pode originar um gameta dissômico, com os dois cromossomos derivativos e um dos normais que, ao se juntar a um gameta normal, formará um zigoto trissômico. A trissomia poderá ser corrigida pela perda do cromossomo homólogo normal do outro genitor, e nesse caso, o embrião terá uma heterodissomia uniparental. Outra possibilidade de heterodissomia é ocorrer a fertilização entre o gameta dissômico do portador da translocação e o do outro genitor, com a nulissomia correspondente. Caso o gameta do portador da translocação, a união com um gameta normal originará um embrião monossômico. O resgate da monossomia pode ocorrer por duplicação do cromossomo homólogo do genitor não portador da translocação. Essa pode ser também a origem de UPD em associação com rearranjos equilibrados esporádicos, que se originem na formação dos gametas (Robinson, 2000).

A relação entre dissomia uniparental e fenótipo alterado pode decorrer da homozigose quanto a alelos recessivos detrimentais ou de *imprinting genômico*, ou seja, da expressão gênica dependente da origem parental (Wilkins et al., 2003).

Entre as doenças relacionadas ao mecanismo de *imprinting genômico* já foram descritos vários casos de UPD associada a rearranjos equilibrados. Dupont et al. (2002), por exemplo, descreveram uma menina afetada pela síndrome de Silver-Russell (SRS; MIM 180860), que herdou uma translocação equilibrada t(7;16)(q21;q24) de sua mãe fenotipicamente normal; na criança foi detectada uma UPD materna do cromossomo 7, como causa da síndrome. Explica-se a UPD como decorrência de não disjunção, o gameta materno que originou o zigoto possuindo os cromossomos 7 normal e derivativo e determinando uma trissomia do cromossomo 7; o resgate dessa trissomia no embrião, com perda do cromossomo 7 paterno, levou à UPD7 materna e à SRS.

Entre as ocorrências esporádicas, existem vários exemplos de isocromossomos de braço longo ou translocações entre homólogos dos acrocêntricos 14 e 15, associados a síndromes bem caracterizadas de *imprinting* paterno e materno do cromossomo 14 e do cromossomo 15 (síndromes de Prader-Willi e de Angelman) (Robinson, 2000).

• Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos

Os rearranjos cromossômicos equilibrados são detectados por técnicas de citogenética clássica, dessa forma são considerados equilibrados aqueles rearranjos nos quais não são identificadas alterações maiores que 5 Mb, que podem ser visualizadas ao microscópico óptico. A partir de 2005, foram publicados vários trabalhos que aplicam array-CGH no estudo de rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos (Gribble et al., 2005, De Gregori et al., 2007, Baptista et al., 2008; Fantes et al., 2008; Higgins et al., 2008; Sismani et al., 2008; Schluth-Bolard et al., 2009). Esses estudos têm mostrado que microdeleções e microduplicações de segmentos genômicos podem ser responsáveis por parte significativa dos fenótipos alterados associados a esses rearranjos (Tabela 1). Estima-se que 33,5% dos pacientes estudados eram portadores de desequilíbrios submicroscópicos.

Apesar de a maioria dos desequilíbrios submicroscópicos estarem localizados nos pontos de quebra que originam os rearranjos (15,5%), 9% estavam fora deles, mas localizados nos cromossomos rearranjados. As alterações nos pontos de quebras podem ter ocorrido durante a formação dos rearranjos, enquanto que aquelas distantes aos pontos de quebra podem não estar associadas aos rearranjos ou refletir um mecanismo mais complexo em sua formação (Higgins et al., 2008). Surpreendentemente, em 9% dos rearranjos equilibrados estudados foram detectadas alterações submicroscópicas em cromossomos que não participavam dos rearranjos (Tabela 1).

Como mostra a Tabela 1, houve diferenças nas frequências de alterações submicroscópicas entre os vários estudos que, pelo menos em parte, são atribuíveis às diferentes metodologias utilizadas. As menores frequências de alterações foram observadas nos trabalhos que utilizaram *arrays* de 1 Mb (Fantes et al., 2008; Sismani et al., 2008). Interessantemente, apenas um estudo (Fantes et al., 2008) detectou ganho de segmentos, todos os outros desequilíbrios sendo deleções. Isso pode ser resultado do mecanismo de formação dos rearranjos, levando preferencialmente à perda de material. Por outro lado, esse resultado pode refletir a menor patogenicidade das duplicações, que assim não estariam presentes nos indivíduos selecionados para os estudos (Schluth-Bolard et al., 2009).

O grande desafio, no entanto, consiste em determinar quais desequilíbrios, de fato, estão associados aos quadros clínicos, já que variações no número de cópias (CNV) também são encontradas em indivíduos da população geral (Redon et al., 2006).

Estudo	a-CGH (plataforma)	Portadores de desequilíbrios submicroscópicos	Desequilíbrio no ponto de quebra	Desequilíbrio em cis ao ponto de quebra	Desequilíbrio não associados ao rearranjo
1	BAC PAC 3500 clones/array painting	5/10	1/10	1/10	3/10
2	Oligo 44B/244K (Agilent)	11/27	7/27	1/27	3/27
3	Sanger 30K Whole Genome TilePath	4/14	3/14	1/14 (*)	1/14
4	1Mb 'CytoChip' BlueGnome	6/46	3/46	3/46	0/46
5	2600 BAC arrays/244K (Agilent)	6/11	2/11	3/11	1/11
6	Cytochip 1-Mb BlueGnome	3/12	1/12	1/12	1/12
7	Oligo 44K/244K (Agilent)	16/33	7/16	4/33	5/33

Tabela 1. Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos em portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados.

Estudo: (1) Gribble et al. (2005); (2) De Gregori et al. (2007); (3) Baptista et al. (2008); (4) Fantes et al. (2008); (5) Higgins et al. (2008); (6) Sismani et al.(2008); (7) Schluth-Bolard et al. (2009) (*)Paciente portador de desequilíbrios no ponto de quebra e em cis ao rearranjo

A caracterização de rearranjos aparentemente equilibrados não associados a quadros clínicos, evidenciando no que diferem daqueles associados com quadros clínicos, pode contribuir para a compreensão dessas associações. Baptista et al. (2008) e Fantes et al. (2008) analisaram translocações cromossômicas equilibradas presentes tanto em indivíduos normais quanto em portadores de sinais e sintomas clínicos. Mostraram que indivíduos fenotipicamente normais podem ter genes interrompidos pelos rearranjos, que não seriam sensíveis a dosagem ou que se localizam em regiões de variações no número de cópias (CNV). Entretanto, somente em rearranjos equilibrados associados a anormalidades clínicas foram detectados desequilíbrios submicroscópicos

nos pontos de quebra ou em cis a eles nos cromossomos rearranjados. Dessa forma os desequilíbrios submicroscópicos em cis podem ser responsáveis por grande parte dos fenótipos clínicos observados em pacientes com rearranjos equilibrados. Estabelecer a relação causal dessas perdas e ganhos de segmentos cromossômicos com os fenótipos dos portadores e entender sua relação com os rearranjos equilibrados associados a eles são desafios atuais.

Cox et al. (2003) estudaram uma criança com deficiência mental não sindrômica portadora de translocação t(X;8)(q28;q12). No ponto de quebra do cromossomo X foi detectada uma duplicação de 650 kb. Nessa região estão mapeados 11 genes, sendo nove expressos no cérebro. Os autores atribuem o quadro clínico a dosagem alterada de gene(s) mapeado(s) na região duplicada do cromossomo X.

Mademont-Soler et al. (2010) estudaram uma paciente com alterações faciais, malformações de Dandy-Walker, perda auditiva e hiperlaxia de pele, que também era portadora da translocação t(6;13)(q23;q32). O a-CGH revelou uma deleção de 2,5 Mb no ponto de quebra do cromossomo 13. O quadro clínico da paciente sobrepõe-se àqueles já descritos em portadores de deleções em 13q32, indicando que a perda desse segmento contribui para o fenótipo. Os autores sugerem que os genes *ZIC2 (Zic family member 2)* e *ZIC5 (Zic family member)*, mapeados nesse segmento, são os principais candidatos ao quadro clínico.

Assim como em rearranjos cromossômicos *de novo*, a análise por a-CGH mostra que rearranjos cromossômicos herdados também podem estar associados a desequilíbrios submicroscópicos nos cromossomos derivativos distantes aos pontos de quebra. Lybaek et al. (2008) utilizaram array-CGH e FISH para investigar uma inversão no braço longo do cromossomo 14 associada, em uma família, ao quadro de esferocitose, dificuldades de aprendizagem/deficiência mental. Foi identificada, em um dos afetados, uma deleção de 2,1 Mb mapeada a 1,6 Mb do ponto de quebra telomérico da inversão. A mãe e o tio materno também eram portadores da deleção. Nessa região estão mapeados 16 genes, dentre os quais, o gene *SPTB (beta-spectrin)*, em que mutações de perda de função já foram identificadas em pacientes com esferocitose. Os autores atribuem a dificuldades de aprendizagem/deficiência mental observada na família à haploinsuficiência de outro(s) gene(s) mapeado(s) na região da deleção no cromossomo 14, sendo os genes *PLEKHG3 [pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member]* e *MAX (MYC associated factor X)* os principais candidatos, devido à alta expressão no sistema nervoso. Como a avó do probando e outros prováveis portadores da inversão haviam falecido, os autores não puderam determinar se a deleção e a inversão originaram-se ou não independentemente.

Papadopoulou et al. (2010) investigaram um paciente com deficiência mental e malformações congênitas múltiplas, que era portador de translocação equilibrada t(9;15)(q31;q26). Aplicando a-CGH, foi identificada uma duplicação de 5-6 Mb, em 9q34 e três deleções de 8,1 a 12,2 Mb, no cromossomo 15. A validação desse resultado por FISH mostrou que o segmento duplicado do cromossomo 9 estava inserido no cromossomo derivativo 15 e que as deleções estavam no cromossomo 15 derivativo, portanto em cis ao ponto de quebra da translocação. Tanto a duplicação de gene(s) mapeado(s) no segmento duplicado do cromossomo 9, quanto a haploinsuficiência de gene(s) localizados(s) nos segmentos deletados do cromossomo 15 podem contribuir para o fenótipo.

Como a análise por *microarrays* permite a investigação global do genoma, pode detectar, em portadores de rearranjos equilibrados, alterações em cromossomos que não participam desses rearranjos. Em determinados casos, os rearranjos cromossômicos e as alterações detectadas em outros cromossomos podem contribuir para o fenótipo. Hayashi et al. (2007) descreveram uma translocação equilibrada t(5;13)(p13.1;q12.1) em uma criança portadora de síndrome de Cornelia de Lange, associada a outros sinais. O gene *NIPBL*, cuja haploinsuficiência causa a síndrome, foi interrompido pela translocação. Aplicando a-CGH, os autores identificaram uma deleção de 1 Mb no braço longo do cromossomo 1, incluindo seis genes (*FIBL-6, PRG4, TPR, OCLM, PDC* e *PTGS2*) e atribuíram as características não típicas de CDLS à haploinsuficiência de gene(s) mapeado(s) nesse segmento.

Entretanto, o rearranjo pode estar de fato equilibrado e o fenótipo ser causado por perda ou ganho de segmentos de cromossomos que não participam dele. Morales et al. (2009) descreveram uma paciente com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, retardo de crescimento, dismorfismos faciais, clinodactilia e miopia. A criança era portadora de inversão *de novo* no braço longo do cromossomo 7, inv(7)(q21.12q34). Genes próximos aos pontos de quebra não puderam ser associados aos sinais clínicos. Por meio de a-CGH foi identificada uma deleção no braço curto do cromossomo 3 del(3)(p12.3p13). As manifestações clínicas da paciente sobrepunham-se às de outros portadores de deleções nesse segmento cromossômico, apontando para a haploinsuficiência de gene(s) mapeado(s) no segmento deletado do cromossomo 3 como causa do quadro clínico. V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

II. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo identificar mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados possam estar associados de maneira causal a determinados quadros clínicos. Para isso estudamos seis translocações cromossômicas aparentemente equilibradas, detectadas em pacientes com malformações congênitas, comprometimento neuropsicomotor ou déficit intelectual. Os pontos de quebra desses rearranjos foram mapeados por hibridação in *situ* fluorescente (FISH). A busca por microdeleções e duplicações genômicas foi realizada por a-CGH.

Estudamos duas translocações esporádicas, t(7;17)(p.13;q24)e t(17;20)(q24.3;q11.2), nas quais os pontos de quebra no cromossomo 17 foram localizados, respectivamente, a 917-855 kb e 624-585 kb upstream ao gene SOX9, em segmentos sem genes mapeados. Ambos os portadores apresentavam alterações esqueléticas que indicaram o diagnóstico de displasia campomélica acampomélica. Não foram detectados desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos por a-CGH. Essas translocações podem levar à expressão alterada do gene SOX9, ao afetar a região reguladora desse gene. Sequências dos outros cromossomos participantes da translocação, que foram aproximadas ao gene pelo rearranjo, também podem ter afetado sua expressão. O estudo dos rearranjos t(7;17) e t(17;20) forneceu informação para o entendimento da região reguladora do gene. As manifestações clínicas associadas à t(17;20) permitiram redefinir o limite distal do *cluster* distal de rearranjos do cromossomo 17 associados ao espectro de manifestações clínicas do SOX9. A presença de testículo no portador dessa translocação indicou um elemento conservado candidato a atuar como enhancer do SOX9, para o desenvolvimento do testículo.

Duas outras translocações equilibradas estavam associadas a desequilíbrios submicroscópicos em cis aos pontos de quebra. Caracterizamos uma t(10;21)(p13;q22) esporádica associada a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia e espasticidade generaliza. Os pontos de quebra dos cromossomos 10 e 21, foram mapeados, respectivamente, em segmentos de 440 kb e 172 kb. Três genes estão mapeados no segmento que contém o ponto de quebra do cromossomo 10 e três outros, no intervalo delimitado para o ponto de quebra no cromossomo 21. O gene *CDNF*, que pode ter sido interrompido pelo ponto de quebra do cromossomo 10, é altamente expresso no sistema nervoso. A análise por meio de a-CGH detectou quatro deleções no

cromossomo 10 todas *de novo*, indicando a complexidade do rearranjo. Duas deleções estavam próximas ao ponto de quebra: uma deleção de 973 kb em 10p14 e uma outra de 1,15 Mb em 10p13, mapeadas a 3,27 Mb e 210 kb do ponto de quebra da translocação, respectivamente. Outras duas deleções no cromossomo 10 ocorreram no braço longo: uma deleção de 700 kb em 10q26.13 estaria a 110,10 Mb do ponto de quebra da translocação, mas não conseguimos mapeá-la por FISH; uma outra deleção de 1,66 Mb em 10q26.2-q26.3 foi mapeada a 114,68 Mb do ponto de quebra da translocação. Quatorze genes estão localizados nas regiões das microdeleções. Os genes *GPR26, OPTN*, CUGBP2 são altamente expressos no sistema nervoso e, assim como o *CNDF*, podem ser considerados candidatos ao efeito fenotípico. O modelo de *chromothripsis*, em que o rearranjo resulta de uma série de quebras na dupla fita do DNA, seguida de ligação aleatória dos fragmentos resultantes, pode explicar a formação da translocação t(10;21).

Aplicando a-CGH no estudo de uma translocação t(X;22)(q22;q13) esporádica, detectamos duplicações de 490 kb e 570 kb, respectivamente, em 22q13 e Xq22. A análise por FISH revelou que as cópias adicionais desses segmentos estavam localizadas nos pontos de quebra dos cromossomos derivativos X (segmento duplicado de 22q13) e 22 (segmento duplicado de Xq22). Não há genes mapeados no segmento duplicado do cromossomo 22. Um dos 14 genes duplicados no cromossomo X é o PLP1 (proteolipid protein 1), cujas mutações de ponto e duplicações causam a doença de Pelizaeus-Merzbacher, caracterizada pela hipomielinização do sistema nervoso central e afetando quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino. O exame neurológico, incluindo ressonância magnética, mostrou que o quadro clínico da paciente é compatível com o da doença de Pelizaeus-Merzbacher. A análise do padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico da paciente, com base na metilação do gene AR e também citologicamente em metáfases, após incorporação de 5-BrdU, revelou que, na maioria das células, o cromossomo X normal está inativo. Esse padrão de inativação torna as células funcionalmente equilibradas quanto aos segmentos translocados. O PLP1, entretanto, tem uma cópia adicional no cromossomo 22, além das cópias localizadas nos cromossomos X e der(X). Portanto, duas cópias ativas do gene estão presentes nas células da portadora da t(X;22). O mecanismo de formação de rearranjos cromossômicos baseado em bolhas de replicação explicaria a formação de

translocações com duplicação em ambos os pontos de quebra, como ocorreu nessa t(X;22).

Estudamos também uma aparente t(2;22)(p14;q12) familial que cossegregava com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado associados a dismorfismos craniofaciais e alterações de mãos. A identificação de duplicações e deleções submicroscópicas, por meio de a-CGH e sua validação por FISH revelaram que se tratava, na verdade, de rearranjo, complexo entre três cromossomos 2, 5 e 22: um segmento de 1,2 Mb de 2p14 inseriu-se no braço curto do cromossomo 5, um evento que pode ter causado a deleção de um segmento de 1,4 Mb em 5p15.1; no cromossomo derivativo der(22) um segmento adicional de 5q23.2-23.3 inseriu-se no ponto de quebra. Todos os afetados da família eram portadores do der(2) e do der(22). No entanto, o der(5) não segregava com o quadro clínico e foi detectado em um individuo fenotipicamente normal da família. Todos os afetados eram portadores da duplicação de 6,6 Mb do braço longo do cromossomo 5 (5q23.2-23.3). Os 17 genes duplicados são candidatos para o quadro clínico, por aumento da dosagem de seus produtos. Outra alteração comum a todos os afetados foi a haploinsuficiência do gene SLC1A4 mapeado em 2p14 e altamente expresso no sistema nervoso. É interessante que a deleção em 2p14, consequente à ausência do der(5), está restrita aos dois afetados que aparentam tem maior déficit cognitivo. Além do SLC1A4, quatro genes mapeados nesse segmento CEP68, RAB1A, ACTR2 e SPRED2 podem contribuir para a variabilidade clínica dos afetados. A translocação t(2;5;22) pode ter-se originado a partir de duas quebras no braço curto do cromossomo 2, duas no braço curto e duas outras no braço longo do cromossomo 5 e uma quebra no braço longo do cromossomo 22. As quebras teriam ocorrido simultaneamente em um único evento. Após reunião de extremidades quebradas, formaram-se os cromossomos derivativos.

Investigamos por a-CGH uma t(2;16)(q35;q24.1) esporádica cujos pontos de quebra foram mapeados anteriormente por FISH; nenhum gene estava mapeado nos segmentos que continham esses pontos de quebra. Não detectamos desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos. A paciente portadora da translocação t(2;16) tinha quatro dígitos nas duas mãos e hexadactilia nos pés. A cerca de 1 Mb do ponto de quebra do cromossomo 2 está mapeado o gene *IHH*, que atua no desenvolvimento dos membros. A translocação pode ter interrompido elemento regulador do *IHH* ou

separado o gene de elemento(s) regulador(es), levando à alteração de sua expressão e ao fenótipo.

Este estudo fornece evidência adicional da importância da busca de desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos em associação com rearranjos aparentemente equilibrados. Em três das seis translocações estudadas - t(10;21), t(2;22), t(X;22) - foram detectados desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos em cis aos pontos de quebra, que podem ser responsáveis pelas manifestações clínicas dos portadores. Este estudo ressalta ainda a importância da técnica de FISH na análise dos desequilíbrios cromossômicos detectados por *array*, permitindo determinar a relação entre as perdas ou ganhos de segmentos submicroscópicos e os rearranjos equilibrados. A caracterização de rearranjos equilibrados neste estudo também contribuiu para sugerir mecanismos para sua formação.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

III. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study aimed at identifying mechanisms that lead to phenotypic abnormalities in carriers of balanced chromosomal rearrangements. We studied six apparently balanced chromosomal translocations detected in patients with congenital malformations, intellectual impairment or neuropsychomotor delay. Breakpoint mapping of apparently balanced chromosomal rearrangements was performed by fluorescence in situ hybridization (FISH), and cryptic genomic imbalances were investigated by array comparative genomic hybridization (a-CGH).

We studied two sporadic translocations, t(7;17) (p13;q24) and t(17;20) (q24.3,q11.2). The breakpoints were located on chromosome 17, respectively, 917-855 kb and 624-585 kb upstream the *SOX9* gene. There are no genes mapped to these segments. Patients had skeletal abnormalities that led to the diagnosis of acampomelic campomelic dysplasia. No submicroscopic chromosomal imbalances were detected by a-CGH. These translocations can alter gene expression by directly disrupting regulatory elements or by a position effect. The translocation t(7;17) and (17;20) provided additional information regarding the regulatory region of SOX9. The clinical manifestations associated with the translocation t(17;20) allowed the redefining of the limits of the distal breakpoint cluster of rearrangements on chromosome 17, which are associated with *SOX9*-related disorders. A conserved element was identified as a candidate *SOX9* enhancer for testis development.

Two additional sporadic translocations were associated with submicroscopic imbalances in cis to the breakpoints: t(10;21) and t(X;22). The translocation t(10;21)(p13;q22) was present in a girl with delayed motor development, microcephaly and generalized spasticity. The breakpoints on chromosomes 10 and 21 were mapped to 440 kb and 172 kb segments, respectively. Among the genes mapped to these breakpoint regions, only *CDNF* on chromosome 10, is highly expressed in the nervous system. Four *de novo* deletions on chromosome 10 were identified by a-CGH, revealing the complexity of the rearrangement. Two deletions were located at the vicinity of the translocation breakpoint: a 973 kb deletion on 10p14 and a 1.15 Mb deletion on 10p13 located, respectively, 3.27 Mb and 210 kb distal to the translocation breakpoint. Two other deletions were detected on the long arm of chromosome 10: a 700 kb deletion on 10q26.13, located 110.10 Mb distal to the translocation breakpoint, which we could not

mapped by FISH; and a 1.66 Mb deletion on 10q26.2-q26.3, located 114.68 Mb distal to the translocation breakpoint. Fourteen genes are mapped to the microdeletion regions. Among these genes, *GPR26, OPTN, CUGBP2* are highly expressed in the nervous system and, together with *CNDF*, are candidates for having clinical effects. The *chromothripsis* model, in which rearrangements result from a series of simultaneous double-stranded breaks followed by random joining of chromosomal fragments, might explain the formation of this t(10,21) translocation.

Applying a-CGH to the apparently balanced translocation t(X;22)(q22;q13)carried by a girl, we detected duplicated segments on 22q13 and Xq22, encompassing 490 kb and 570 kb, respectively. FISH analysis revealed that the additional copies were located to the breakpoints of the derivative X chromosome (22q13 duplicated segment) and of the derivative 22 chromosome (Xq22 duplicated segment). No genes are mapped to the duplicated segment of chromosome 22. One of the 14 duplicated genes on the X chromosome is PLP1 (proteolipid protein 1). PLP1 point mutations and duplications cause Pelizaeus-Merzbacher disease, characterized by hypomyelination of the central nervous system, and affecting almost exclusively males. Neurological examination of the patient, including MRI showed that her clinical manifestations were compatible with Pelizaeus-Merzbacher disease. The pattern of X chromosome inactivation was determined in peripheral blood lymphocytes, based on the AR gene methylation, and cytologically, in metaphases spreads, after 5-BrdU incorporation, and showed that the normal X chromosome was the inactive one in the majority of cells. This pattern of X inactivation makes cells functionally balanced for the translocated segments. A copy of the PLP1 gene, however, is present on chromosome 22, in addition to the copies located on the chromosomes X and der(X). Thus, two active copies of the gene are present in the cells, irrespective of the X-inactivation pattern. A mechanism based on replication bubbles can explain the formation of translocations with duplication at the breakpoints, such as this t(X;22).

An apparently balanced familial translocation t(2;22)(p13;q12.2) was detected in association with learning disability and craniofacial and hand dysmorphisms. The combination of a-CGH and FISH revealed that the rearrangement, identified by G-banding as a two-break balanced translocation, was a more complex three-chromosome rearrangement: a segment from chromosome 2 was inserted into chromosome 5 short arm, an event that probably caused a 5p15.1 deletion; on chromosome 22 a segment

from 5q23.2-23.3 was inserted into the breakpoint. Chromosomes der(2) and der(22) were present in all affected individuals. However, the der(5) did not segregate with the clinical phenotype, and was detected in a phenotypically normal individual. The 6.6 Mb duplication of the long arm of chromosome 5 was the imbalance common to all affected individuals. The 17 genes in this region are candidates for the clinical phenotypes through dosage effect. In addition, common to all affected individuals is the haploinsufficiency of SLC1A4, a gene highly expressed in the nervous system, which is encompassed by the deletion on chromosome 2. Interestingly, learning disabilities were more pronounced in those patients who also carried chromosome 2 deletion. *CEP68, RAB1A, ACTR2* and *SPRED2*, mapped to this deleted segment, might contribute to the variability of the clinical phenotype in the family. The translocation t(2;5;22) might have originated from a series of simultaneously occurring brakes, two on the short arm of chromosome 2, four breaks on the short arm and two on the long arm of chromosome 5, and one break on the long arm of chromosome 22.

We also investigated by a-CGH a sporadic translocation t(2;16)(q35;q24.1) whose carrier had hand and feet defects. Submicroscopic imbalances were not detected. Previously performed FISH delimited the breakpoints segments on chromosomes 2 and 16, which encompassed no genes. The *IHH* gene, which is involved in limb development, is located approximately 1 Mb upstream chromosome 2 breakpoint. Therefore, the translocation might have disrupted a regulatory element of IHH or, alternatively, separated the gene from a regulatory region, thus altering IHH expression.

This study provides further evidence for the occurrence of submicroscopic chromosomal imbalances in association with apparently balanced rearrangements. In three out of six translocations - t(10,21), t(2;5;22), t(X;22) - cryptic duplications/deletions in cis to the breakpoints were detected, which might account for the clinical manifestations of the patients. This study also highlights the importance of FISH in the analysis of genomic imbalances detected by array in determining how losses and gains of submicroscopic segments relate to the rearranged chromosomes. The characterization of the balanced translocations in this study also contributed to suggest mechanisms for their formation.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidi FE, Holinski-Feder E, Rittinger O, Kooy F, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. A novel 2 bp deletion in the TM4SF2 gene is associated with MRX58. **J Med Genet 39:**430-433, 2002.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev 16:2813–2828, 2002.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgenreceptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet 51:1229-1239, 1992.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. Am J Hum Genet 79:493-499, 2006.
- Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. **Prostaglandins Other Lipid Mediat 91**:104-112, 2010.
- Antonini S. Mapeamento de pontos de quebra em rearranjos cromossômicos. **Pós-Doutorado**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2005.
- Arens YH, Engelen JJ, Govaerts LC, van Ravenswaay CM, Loneus WH, van Lent-Albrechts JC, van der Blij-Philipsen M, Hamers AJ, Schrander-Stumpel CT. Familial insertion (3;5)(q25.3;q22.1q31.3) with deletion or duplication of chromosome region 5q22.1-5q31.3 in ten unbalanced carriers. Am J Med Genet A 130A:128-133, 2004.
- Babbs C, Furniss D, Morriss-Kay GM, Wilkie AO. Polydactyly in the mouse mutant Doublefoot involves altered Gli3 processing and is caused by a large deletion in cis to Indian hedgehog, **Mech Dev 125**:517-526, 2008.
- Bache I, Hjorth M, Bugge M, Holstebroe S, Hilden J, Schmidt L, Brondum-Nielsen K, Bruun-Petersen G, Jensen PK, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen K, Tommerup N. Systematic re-examination of carriers of balanced reciprocal translocations: a strategy to search for candidate regions for common and complex diseases.Eur J Hum Genet 14:410-417, 2006.
- Backx L, Seuntjens E, Devriendt K, Vermeesch J, Van Esch H. A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum.**Cytogenet Genome Res 132**:135-143, 2011.
- Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Gunther T, Schule R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G. Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. Dev Biol 291:382-397, 2006.
- Bailey JA, Eichler EE. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. **Nat Rev Genet 7**:552-564, 2006.

- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. **Am J Hum Genet 82**:927-936, 2008.
- Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. **Dev Cell 12**:931-941, 2007
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. Nat Genet 16:174-178, 1997.
- Belzil VV, Daoud H, Desjarlais A, Bouchard JP, Dupré N, Camu W, Dion PA, Rouleau GA. Analysis of OPTN as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiol Aging 32**:555.e13-4, 2011.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez MP, Vekemans M, Roest Crollius H, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, Fitzpatrick DR, Lyonnet S. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. Nat Genet 41:359-64, 2009.
- Bertini ES, Eymard-Pierre E, Boespflug-Tanguy O, Cleveland DW, Yamanaka K. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle (versão online), 1993-.2005 (atualizado em 2011).
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. J Med Genet 45: 309-313, 2008.
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O. Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. **Am J Hum Genet 69**:261-268, 2001.
- Bond C, Si X, Crisp M, Wong P, Paulson GW, Boesel CP, Dlouhy SR, Hodes ME. Family with Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia and a nonsense mutation in exon 6 of the proteolipid protein gene. Am J Med Genet 71:357-360, 1997.
- Boulay JL, Ionescu MC, Sivasankaran B, Labuhn M, Dolder-Schlienger B, Taylor E, Morin P Jr, Hemmings BA, Lino MM, Jones G, Maier D, Merlo A. The 10q25.3-26.1 G protein-coupled receptor gene GPR26 is epigenetically silenced in human gliomas. Int J Oncol 35:1123-1131, 2009.
- Boyd Y, Buckle V, Holt S, Munro E, Hunter D, Craig I. Muscular dystrophy in girls with X;autosome translocations. J Med Genet 23:484-490, 1986.
- Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Mauro A, Pradotto L, Daniele D, Di Gregorio E, Barberis M, Arduino C, Squadrone S, Abete MC, Migone N, Calabrese O, Brusco A. A novel family with Lamin B1 duplication associated with adult-onset leucoencephalopathy.J Neurol Neurosurg Psychiatry 80:237-240, 2009.

- Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Panza E, Seri M, Di Gregorio E, Scappaticci S, Camanini S, Daniele D, Bradac GB, Pinessi L, Cavalieri S, Grosso E, Migone N, Brusco A. A family with autosomal dominant leukodystrophy linked to 5q23.2– q23.3 without lamin B1 mutations. Eur J Neurol. 17:541–549, 2010.
- Bundschu K, Knobeloch KP, Ullrich M, Schinke T, Amling M, Engelhardt CM, Renné T, Walter U, Schuh K.Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. J Biol Chem. 280:28572-28580, 2005.
- Cacciagli P, Haddad MR, Mignon-Ravix C, El-Waly B, Moncla A, Missirian C, Chabrol B, Villard L. Disruption of the ATP8A2 gene in a patient with a t(10;13) de novo balanced translocation and a severe neurological phenotype. **Eur J Hum Genet 18**:1360-1363, 2010.
- Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, López-Otín C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. Gene 283:49-62, 2002.
- Cantagrel V, Lossi AM, Lisgo S, Missirian C, Borges A, Philip N, Fernandez C, Cardoso C, Figarella-Branger D, Moncla A, Lindsay S, Dobyns WB, Villard L. Truncation of NHEJ1 in a patient with polymicrogyria.**Hum Mutat 28**:356-364, 2007.
- Carrozzo R, Arrigo G, Rossi E, Bardoni B, Cammarata M, Gandullia P, Gatti R, Zuffardi O. Multiple congenital anomalies, brain hypomyelination, and ocular albinism in a female with dup(X) (pter-->q24::q21.32-->qter) and random X inactivation. **Am J Med Genet 72**:329-334, 1997.
- Carter AN, Cole CL, Playle AG, Ramsay EJ, Shervington AA. GPR26: a marker for primary glioblastoma? Mol Cell Probes 22:133-137, 2008.
- Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Shaw C, Peacock S, Pursley A, Tavyev YJ, Ramocki MB, Nawara M, Obersztyn E, Vianna-Morgante AM, Stankiewicz P, Zoghbi HY, Cheung SW, Lupski JR. Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by Fork Stalling and Template Switching. Hum Mol Genet 18:2188-2203, 2009.
- Carvalho CM, Bartnik M, Pehlivan D, Fang P, Shen J, Lupski JR. Evidence for disease penetrance relating to CNV size: Pelizaeus-Merzbacher disease and manifesting carriers with a familial 11 Mb duplication at Xq22. Clin Genet (versão online), 2011.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res 60**:315-319, 1970.
- Chen Y, Low TY, Choong LY, Ray RS, Tan YL, Toy W, Lin Q, Ang BK, Wong CH, Lim S, Li B, Hew CL, Sze NS, Druker BJ, Lim YP. Phosphoproteomics identified Endofin, DCBLD2, and KIAA0582 as novel tyrosine phosphorylation targets of EGF signaling and Iressa in human cancer cells. **Proteomics 7**:2384-2397, 2007.
- Consilvio C, Vincent AM, Feldman EL. Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? **Exp Neurol 187**:1-10, 2004.
- Courtens W, Wuyts W, Rooms L, Pera SB, Wauters J. A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. Am J Med Genet A 140:402-409, 2006.

- Cox JJ, Holden ST, Dee S, Burbridge JI, Raymond FL. Identification of a 650 kb duplication at the X chromosome breakpoint in a patient with 46,X,t(X;8)(q28;q12) and non-syndromic mental retardation. **J Med Genet 40**:169-174, 2003.
- Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. **N Engl J Med 364**:91-93, 2011
- Crolla JA, van Heyningen V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. **Am J Hum Genet 71**: 1138-1149, 2002.
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Guerneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. J Med Genet 44: 750-762, 2007.
- Del Bo R, Tiloca C, Pensato V, Corrado L, Ratti A, Ticozzi N, Corti S, Castellotti B, Mazzini L, Sorarù G, Cereda C, D'Alfonso S, Gellera C, Comi GP, Silani V; The SLAGEN Consortium. Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.J Neurol Neurosurg Psychiatry (versão online), 2011.
- Dermitzakis ET, Reymond A, Antonarakis SE. Conserved non-genic sequences an unexpected feature of mammalian genomes. Nat Rev Genet 6:151-157, 2005
- Dion PA, Daoud H, Rouleau GA. Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. Nat Rev Genet 10:769-782, 2009.
- Douyard J, Hawley P, Shaham M, Kimonis V. Duplication of 5q15-q23.2: case report and literature review. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 76**:272-276, 2006.
- Drachman DB, Rothstein JD. Inhibition of cyclooxygenase-2 protects motor neurons in an organotypic model of amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol 48:**792-795, 2000.
- Drets, M. E., & Shaw, M. W. Specific banding patterns of human chromosomes. **Proc** Natl Acad Sci 68:2073-2077, 1971.
- Dupont JM, Cuisset L, Cartigny M, Le Tessier D, Vasseur C, Rabineau D, Jeanpierre M. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. Am J Med Genet 111:405-408, 2002.
- Dutrillaux B, Lejeune J. Sur une novelle technique d'analyse du caryotype human. C R Acad Sci Paris 272:2638-2640, 1971.
- Emberger W, Petek E, Plecko-Starting B, Kroisel PM, Zierler H, Wagner K. A de novo complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3, and 10 associated with microcephaly and early onset spasticity. J Med Genet 37:892-896, 2000.

- Evans MI, White BJ, Kent SG, Levine MA, Levin SW, Larsen JW Jr. Balanced rearrangement of chromosomes 2, 5, and 13 in a family with duplication 5q and fetal loss. **Am J Med Genet 19**:783-790, 1984.
- Eymard-Pierre E, Lesca G, Dollet S, Santorelli FM, di Capua M, Bertini E, Boespflug-Tanguy O. Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. **Am J Hum Genet 71**:518-527, 2002.
- Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M, Danes S, van Heyningen V, Hanson I. Aniridia associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. Hum Mol Genet 4:415-422, 1995.
- Fantes JA, Boland E, Ramsay J, Donnai D, Splitt M, Goodship JA, Stewart H, Whiteford M, Gautier P, Harewood L, Holloway S, Sharkey F, Maher E, van Heyningen V, Clayton-Smith J, Fitzpatrick DR, Black GC. FISH mapping of de novo apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality. Am J Hum Genet 82:916-926, 2008.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome.**Nat Rev Genet 7:**85-97, 2006.
- Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, Carr P, Prigmore E, Porter KM, Clegg S, Crolla JA, Dennis NR, Jacobs P, Carter NP. Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. J Med Genet 40: 664-670, 2003.
- Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, Lee H, Field L, Zander K, Sibenaller Z, Ryken TC, Vibhakar R, Hood L, Madan A. Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. **Cancer Res 66**:6665-6674, 2006.
- Fonseca SAS. Alterações cromossômicas estruturais no mapeamento de regiões candidatas para quadros sindrômicos. **Tese de Doutorado** (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP) 2005.
- Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. **BMJ 332**:759-763, 2006.
- Fryns JP, van den Berghe H. Possible excess of mental handicap and congenital malformations in autosomal reciprocal translocations. **Ann Genet 22:**125-127, 1979.
- Fukuda H, Nakamura N, Hirose S. MARCH-III Is a novel component of endosomes with properties similar to those of MARCH-II. J Biochem 139:137-145, 2006.
- Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G, He L. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. Nat Genet 28:386-388, 2001.
- Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. Cell Mol Life Sci 64:50-65, 2007.
- Giardino D, Finelli P, Amico FP, Gottardi G, Civa R, Corona G, Nocera G, Larizza L. Unbalanced segregation of a complex four-break 5q23-31 insertion in the 5p13 band in a malformed child. **Eur J Hum Genet 12:**455-459, 2004.

- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. **Am J Hum Genet 68:**874-883, 2001.
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Guerneri S, Selicorni A, Stumm M, Tonnies H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wieczorek D, Rocchi M, Zuffardi O. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. Am J Hum Genet 71:276-285, 2002.
- Gimeno, RE, Ortegon, AM, Patel, S, Punreddy, S, Ge, Sun, Y, Lodish, HF, Stahl, A. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. J Biol Chem 278: 16039-16044, 2003.
- Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie PG. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. J Med Genet 46:649-656, 2009.
- Graser S, Stierhof YD, Nigg EA. Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. J Cell Sci 120:4321-4331, 2007.
- Grasshoff U, Singer S, Liehr T, Starke H, Fode B, Schöning M, Dufke A. A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q24-1q22 monosomy 4q27-q28. Cytogenet Genome Res 103:17-23, 2003.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. J Med Genet 42:8-16, 2005.
- Gruchy N, Barreau M, Kessler K, Gourdier D, Leporrier N. A paternally transmitted complex chromosomal rearrangement (CCR) involving chromosomes 2, 6, and 18 includes eight breakpoints and five insertional translocations ITs) through three generations. **Am J Med Genet 152:**185-190, 2009.
- Grunnet ML, Leicher C, Zimmerman A, Zalneraitis E, Barwick M. Primary lateral sclerosis in a child. Neurology 39:1530-1532, 1989.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. **Pathogenetics 1**:4, 2008.
- Hanson D, Murray PG, Sud A, Temtamy SA, Aglan M, Superti-Furga A, Holder SE, Urquhart J, Hilton E, Manson FD, Scambler P, Black GC, Clayton PE. The primordial growth disorder 3-M syndrome connects ubiquitination to the cytoskeletal adaptor OBSL1. Am J Hum Genet 84:801-806, 2009.
- Hayashi S, Ono M, Makita Y, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Fortuitous detection of a submicroscopic deletion at 1q25 in a girl with Cornelia-de Lange syndrome carrying t(5;13)(p13.1;q12.1) by array-based comparative genomic hybridization. Am J Med Genet A 143A:1191-1197, 2007.

- Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ, Eisenman R, Fan Y, Farra CG, Ferguson HL, Gusella JF, Harris DJ, Herrick SR, Kelly C, Kim HG, Kishikawa S, Korf BR, Kulkarni S, Lally E, Leach NT, Lemyre E, Lewis J, Ligon AH, Lu W, Maas RL, MacDonald ME, Moore SD, Peters RE, Quade BJ, Quintero-Rivera F, Saadi I, Shen Y, Shendure J, Williamson RE, Morton CC. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. Am J Hum Genet 82:712-722, 2008.
- Hill-Harfe KL, Kaplan L, Stalker HJ, Zori RT, Pop R, Scherer G, Wallace MR. Fine mapping of chromosome 17 translocation breakpoints > or = 900 kb upstream of SOX9 in acampomelic campomelic dysplasia and a mild, familial skeletal dysplasia. Am J Hum Genet 76: 663–671, 2005.
- Hodes ME, Woodward K, Spinner NB, Emanuel BS, Enrico-Simon A, Kamholz J, Stambolian D, Zackai EH, Pratt VM, Thomas IT, Crandall K, Dlouhy SR, Malcolm S. Additional copies of the proteolipid protein gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease arise by separate integration into the X chromosome. Am J Hum Genet 67:14-22, 2000.
- Horowitz DS e Krainer AR. A human protein required for the second step of pre-mRNA splicing is functionally related to a yeast splicing factor. **Genes Dev 11**:139-151, 1997.
- Howarth KD, Pole JC, Beavis JC, Batty EM, Newman S, Bignell GR, Edwards PA. Large duplications at reciprocal translocation breakpoints that might be the counterpart of large deletions and could arise from stalled replication bubbles. **Genome Res 21**:525-534, 2011.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. Am J Med Genet 87:349-353, 1999.
- Ida T, Miharu N, Hayashitani M, Shimokawa O, Harada N, Samura O, Kubota T, Niikawa N, Matsumoto N. Functional disomy for Xq22-q23 in a girl with complex rearrangements of chromosomes 3 and X. Am J Med Genet A 120A:557, 2003
- Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, Ikegawa S.Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry (versão online), 2011.
- Inoue K, Tanaka H, Scaglia F, Araki A, Shaffer LG, Lupski JR. Compensating for central nervous system dysmyelination: females with a proteolipid protein gene duplication and sustained clinical improvement. **Ann Neurol 50**:747-754, 2001.
- Inoue K, Osaka H, Thurston VC, Clarke JT, Yoneyama A, Rosenbarker L, Bird TD, Hodes ME, Shaffer LG, Lupski JR. 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**:838-53, 2002.
- Inoue K. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. **Neurogenetics 6**:1-16, 2005.
- ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds.). S Karger, Basel 2009.
- Jacobs PA, Hassold TJ. Chromossome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. Human Genetics: Proceedings of the 7th International Congress: 234-244, 1986.

- Jakubiczka S, Schröder C, Ullmann R, Volleth M, Ledig S, Gilberg E, Kroisel P, Wieacker P. Translocation and deletion around SOX9 in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. **Sex Dev 4**:143-149, 2010.
- Jensen LR, Amende M, Gurok U, Moser B, Gimmel V, Tzschach A, Janecke AR, Tariverdian G, Chelly J, Fryns JP, Van Esch H, Kleefstra T, Hamel B, Moraine C, Gecz J, Turner G, Reinhardt R, Kalscheuer VM, Ropers HH, Lenzner S. Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. **Am J Hum Genet 76**: 227-236, 2005.
- Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol 57:**236-251, 2005.
- Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C, Elson E, Turner JT, Peters KF, Abbott MH, Aughton DJ, Aylsworth AS, Bamshad MJ, Booth C, Curry CJ, David A, Dinulos MB, Flannery DB, Fox MA, Graham JM, Grange DK, Guttmacher AE, Hannibal MC, Henn W, Hennekam RC, Holmes LB, Hoyme HE, Leppig KA, Lin AE, Macleod P, Manchester DK, Marcelis C, Mazzanti L, McCann E, McDonald MT, Mendelsohn NJ, Moeschler JB, Moghaddam B, Neri G, Newbury-Ecob R, Pagon RA, Phillips JA, Sadler LS, Stoler JM, Tilstra D, Walsh Vockley CM, Zackai EH, Zadeh TM, Brueton L, Black GC, Biesecker LG. Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. Am J Hum Genet 76:609-622, 2005.
- Jurevics H, Hostettler J, Sammond DW, Nave KA, Toews AD, Morell P. Normal metabolism but different physical properties of myelin from mice deficient in proteolipid protein. J Neurosci Res 71:826–834, 2003.
- Kent J, Wheatly SC, Andrews JE, Sinclair AE, Koopman P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development 122**:2813-2822, 1996.
- Kleinjan DJ, Coutinho P. Cis-ruption mechanisms: disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. **Brief Funct Genomic Proteomic 8:**317-332, 2009.
- Kleinjan DA, Lettice LA. Long-range gene control and genetic disease. Adv Genet 61:339-388, 2008.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. **Hum Mol Genet 7**:1611-1618, 1998.
- Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hochstenbach R, Poot M, Cuppen E. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. **Hum Mol Genet 20:**1916-1924, 2011.
- Klopocki E, Lohan S, Brancati F, Koll R, Brehm A, Seemann P, Dathe K, Stricker S, Hecht J, Bosse K, Betz RC, Garaci FG, Dallapiccola B, Jain M, Muenke M, Ng VC, Chan W, Chan D, Mundlos S. Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. Am J Hum Genet 88:70-75, 2011.

- Knower KC, Kelly S, Ludbrook LM, Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Sekido R, Lovell-Badge R, Harley VR.Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. **PLoS One 6**:e17751, 2011.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell 50**:509-517, 1987.
- Krepischi-Santos AC, Rajan D, Temple IK, Shrubb V, Crolla JA, Huang S, Beal S, Otto PA, Carter NP, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. Constitutional haploinsufficiency of tumor suppressor genes in mentally retarded patients with microdeletions in 17p13.1. Cytogenet Genome Res 125:1-7, 2009.
- Kurahashi H, Emanuel BS. Long AT-rich palindromes and theconstitutional t(11;22) breakpoint. **Hum Mol Genet 10**:2605-2617, 2001a.
- Kurahashi H, Emanuel BS. Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. **Nat Genet 29**: 139-140, 2001b.
- Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML. Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). **Hum Mol Genet 9**: 1665-1670, 2000.
- Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. **J Biol Chem 279**: 35377-35383, 2004.
- Kurahashi H, Inagaki H, Hosoba E, Kato T, Ohye T, Kogo H, Emanuel BS.Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. **Genome Res 17**: 461-469, 2007.
- Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS. The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements.**Clin Genet 78**:299-309, 2010.
- Kurth I, Pamminger T, Hennings JC, Soehendra D, Huebner AK, Rotthier A, Baets J, Senderek J, Topaloglu H, Farrell SA, Nürnberg G, Nürnberg P, De Jonghe P, Gal A, Kaether C, Timmerman V, Hübner CA. Mutations in FAM134B, encoding a newly identified Golgi protein, cause severe sensory and autonomic neuropathy. Nature Genet 41: 1179-1181, 2009.
- Lauderdale JD, Wilensky JS, Oliver ER, Walton DS, Glaser T. 30 deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA 97:**13755-13759, 2000.
- Lecointre C, Pichon O, Hamel A, Heloury Y, Michel-Calemard L, Morel Y, David A, Le Caignec C.Familial acampomelic form of campomelic dysplasia caused by a 960 kb deletion upstream of SOX9. **Am J Med Genet A 149A**:1183-1189, 2009.
- Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, CareyJC. Precise localization ofNF1 to 17ql 1.2 by balanced translocation. **Am J Hum Genet 44**:20-24, 1989
- Lee JA, Madrid RE, Sperle K, Ritterson CM, Hobson GM, Garbern J, Lupski JR, Inoue K. Spastic paraplegia type 2 associated with axonal neuropathy and apparent PLP1position effect. **Ann Neurol 59**: 398-403, 2006.

- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR.A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell 131:1235-1247, 2007.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrugghe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. **Mol Cell Biol 17:**2336-2346, 1997.
- Leipoldt M, Erdel M, Bien-Willner GA, Smyk M, Theurl M, Yatsenko SA, Lupski JR, Lane AH, Shanske AL, Stankiewicz P, Scherer G. Two novel translocation breakpoints upstream of SOX9 define borders of the proximal and distal breakpoint cluster region in campomelic dysplasia. Clin Genet 71:67-75, 2007.
- LeMaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA.Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. J Cell Biol 139:1611-1619, 1997.
- Leroy O, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Belarbi K, Delacourte A, Andreadis A, Sablonnière B, Buée L, Sergeant N, Caillet-Boudin ML. ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. J Neurosci Res 84:852-859, 2006.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. **Proc Natl Acad Sci USA 99:**7548-7553, 2002.
- Li SY, Gibson LH, Gomez K, Pober BR, Yang-Feng TL. Familial dup(5)(q15q21) associated with normal and abnormal phenotypes. Am J Med Genet 75:75–77, 1998.
- Liang X, Wu L, Wang Q, Hand T, Bilak M, McCullough L, Andreasson K. J Mol Function of COX-2 and prostaglandins in neurological disease. J Mol Neurosci 33:94-99, 2007.
- Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). Mol Cytogenet. 3:8,2010.
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. Nature 448:73-77, 2007.
- Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han AP, Blevins S, Mudbhary R, Barker JE, Walsh CA, Fleming MD. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. **Development** 137:1907-1917, 2010.
- Lodder EM, Hoogeboom AJ, Coert JH, de Graaff E. Deletion of 1 amino acid in Indian hedgehog leads to brachydactylyA1. **Am J Med Genet A 146A:**2152-2154, 2008.
- Lybaek H, Øyen N, Fauske L, Houge G. A 2.1 Mb deletion adjacent but distal to a 14q21q23 paracentric inversion in a family with spherocytosis and severe learning difficulties. **Clin Genet 74:**553-559, 2008.

- Ma G, Yu J, Xiao Y, Chan D, Gao B, Hu J, He Y, Guo S, Zhou J, Zhang L, Gao L, Zhang W, Kang Y, Cheah KS, Feng G, Guo X, Wang Y, Zhou CZ, He L. Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair Hedgehog signal transduction at multiple levels. **Cell Res (versão online)**, 2011.
- Mademont-Soler I, Morales C, Armengol L, Soler A, Sánchez A.Description of the smallest critical region for Dandy-Walker malformation in chromosome 13 in a girl with a cryptic deletion related to t(6;13)(q23;q32). **Am J Med Genet A 152:**2308-2312, 2010.
- Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. J Med Genet 32:415-420, 1995.
- Maranduba CM, Sá Moreira E, Müller Orabona G, Pavanello RC, Vianna-Morgante AM, Passos-Bueno MR.Does the P172H mutation at the TM4SF2 gene cause X-linked mental retardation? **Am J Med Genet A 124:**413-415, 2004.
- Martin NJ, Cartwright DW, Harvey PJ. Duplication 5q(5q22-5q33): From an intrachromosomal insertion. Am J Med Genet 20:57-62, 1985.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature 465:223-226, 2010.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. Cell Death Differ 13:852-60, 2006.
- Meer B, Wolff G, Back E. Segregation of a complex rearrangement of chromosomes 6, 7, 8 and 12 through three generations. **Hum Genet 58:**221-225, 1981.
- Meijer IA, Simoes-Lopes AA, Laurent S, Katz T, St-Onge J, Verlaan DJ, Dupré N, Thibault M, Mathurin J, Bouchard JP, Rouleau GA. A novel duplication confirms the involvement of 5q23.2 in autosomal dominant leukodystrophy. Arch Neurol 65:1496-1501, 2008.
- Millecamps S, Boillée S, Chabrol E, Camu W, Cazeneuve C, Salachas F, Pradat PF, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Corcia P, Le Forestier N, Lacomblez L, Bruneteau G, Seilhean D, Brice A, Feingold J, Meininger V, LeGuern E. Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging 32:e11-3, 2011
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 86:749-764, 2010.
- Miller G, Neilan M, Chia R, Gheryani N, Holt N, Charbit A, Wells S, Tucci V, Lalanne Z, Denny P, Fisher EM, Cheeseman M, Askew GN, Dear TN. ENU mutagenesis reveals a novel phenotype of reduced limb strength in mice lacking fibrillin 2. PLoS One 5:e9137, 2010.

- Mimault C, Giraud G, Courtois V, Cailloux F, Boire JY, Dastugue B, Boespflug-Tanguy. Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher Disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. The Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. Am J Hum Genet 65:360-369, 1999.
- Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. J Biol Chem 279:11327-11335, 2004.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. **Nat Genet 14:**62-68, 1996.
- Morales C, Mademont-Soler I, Armengol L, Milà M, Badenas C, Andrés S, Soler A, Sánchez A. Characterization of a 5.8-Mb interstitial deletion of chromosome 3p in a girl with 46,XX,inv(7)dn karyotype and phenotypic abnormalities. **Cytogenet Genome Res 125:**334-340, 2009.
- Morokuma Y, Nakamura N, Kato A, Notoya M, Yamamoto Y, Sakai Y, Fukuda H, Yamashina S, Hirata Y, Hirose S. MARCH-XI, a novel transmembrane ubiquitin ligase implicated in ubiquitin-dependent protein sorting in developing spermatids. J Biol Chem 282: 24806-24815, 2007.
- Mourão A, Varrot A, Mackereth CD, Cusack S, Sattler M. Structure and RNA recognition by the snRNA and snoRNA transport factor PHAX. **RNA 16:**1205-1216, 2010.
- Mrowka R, Blüthgen N, Fähling M. Seed-based systematic discovery of specific transcription factor target genes. **FEBS J 275:**3178-192, 2008.
- Muncke N, Wogatzky BS, Breuning M, Sistermans EA, Endris V, Ross M, Vetrie D, Catsman-Berrevoets CE, Rappold G. Position effect on PLP1 may cause a subset of Pelizaeus-Merzbacher disease symptoms. J Med Genet 41:e121, 2004.
- Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD, Caldas C.BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. **Cancer Res. 67**:6725-6736, 2007.
- Ninomiya S, Isomura M, Narahara K, Seino Y, Nakamura Y. Isolation of a testisspecific cDNA on chromosome 17q from a region adjacent to the breakpoint of t(12;17) observed in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. **Hum Mol Genet 5:**69-72, 1996.
- Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, Takizawa M, Okita K, Yoshimura A, Taga T. Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation. **J Exp Med 199:**737-742, 2004.
- Nonami A, Kato R, Taniguchi K, Yoshiga D, Taketomi T, Fukuyama S, Harada M, Sasaki A, Yoshimura A. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. J Biol Chem 279:52543-52551, 2004.

- Nothwang HG, Kim HG, Aoki J, Geisterfer M, Kübart S, Wegner RD, van Moers A, Ashworth LK, Haaf T, Bell J, Arai H, Tommerup N, Ropers HH, Wirth J. Functional hemizygosity of PAFAH1B3 due to a PAFAH1B3-CLK2 fusion gene in a female with mental retardation, ataxia and atrophy of the brain. **Hum Mol Genet 10:**797-806, 2001.
- Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H. Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22)(q23;q11). **Eur J Hum Genet 18:**783-787, 2010.
- Osztovics M, Kiss P. Trisomy 5q15-q31 due to maternal insertion, ins(6;5) (q21;q15q31). Acta Paediatr Acad Sci Hung 23:231-237, 1982.
- Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. Nucleic Acids Res 32 (versão online): W280-W286, 2004.
- Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptácek LJ, Fu YH. Lamin B1duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. Nat Genet 38:1114-1123, 2006.
- Page SL, Shaffer LG. Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. Nat Genet 15:231-232, 1997.
- Panzeri C, De Palma C, Martinuzzi A, Daga A, De Polo G, Bresolin N, Miller CC, Tudor EL, Clementi E, Bassi MT. The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. Brain 129:1710-9, 2006.
- Papadopoulou E, Sismani C, Christodoulou C, Ioannides M, Kalmanti M, Patsalis P.Phenotype-genotype correlation of a patient with a "balanced" translocation 9;15 and cryptic 9q34 duplication and 15q21q25 deletion. Am J Med Genet A 152A:1515-1522, 2010.
- Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush B III. Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. J Biol Chem. 270: 17977-17985, 1995.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. **Hum Reprod 17:**476-494, 2011.
- Peretz A, Gil-Henn H, Sobko A, Shinder V, Attali B, Elson A. Hypomyelination and increased activity of voltage-gated K(+) channels in mice lacking protein tyrosine phosphatase epsilon. **EMBO J 19:**4036-4045, 2000.
- Pfeifer D, Kist R, Dewar K, Devon K, Lander ES, Birren B, Korniszewski L, Back E, Scherer G. Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. Am J Hum Genet 65:111-124, 1999.
- Pop R, Conz C, Lindenberg KS, Blesson S, Schmalenberger B, Briault S, Pfeifer D, Scherer G. Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. J Med Genet 41:e47, 2004.

- Ramocki MB, Dowling J, Grinberg I, Kimonis VE, Cardoso C, Gross A, Chung J, Martin CL, Ledbetter DH, Dobyns WB, Millen KJ. Reciprocal fusion transcripts of two novel Zn-finger genes in a female with absence of the corpus callosum, ocular colobomas and a balanced translocation between chromosomes 2p24 and 9q32. Eur J Hum Genet 11:527-534, 2003.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. Nature 444:444-454, 2006.
- Rees MI, Worwood M, Thompson PW, Gilbertson C, May A. Red cell dimorphism in a young man with a constitutional chromosomal translocation t(11;22)(p15.5;q11.21). Br J Haematol 87:386-395, 1994.
- Refai O, Friedman A, Terry L, Jewett T, Pearlman A, Perle MA, Ostrer H. De novo 12;17 translocation upstream of SOX9 resulting in 46,XX testicular disorder of sex development. **Am J Med Genet A 152:**422-426, 2010.
- Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. **Science 295:**1077-1079, 2002.
- Robinson WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. **Bioessays 22:**452-459, 2000.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ: Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **J Med Genet 43:**180-186, 2006.
- Röthlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, Schinzel A. Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. **Eur J Hum Genet 7:**873-883, 1999.
- Sagai T, Hosoya M, Mizushina Y, Tamura M, Shiroishi T. Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. **Development 132:**797-803, 2005.
- Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. **J Cell Biol 169:**285-295, 2005.
- Sakai D, Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. **Development 133:**1323-1333, 2006.

- Salomons GS, Bok LA, Struys EA, Pope LL, Darmin PS, Mills PB, Clayton PT, Willemsen MA, Jakobs C. An intriguing "silent" mutation and a founder effect in antiquitin (ALDH7A1). Ann Neurol 62: 414-418, 2007.
- Saugier-Veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. **Nat Genet 6:**257-262, 1994.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, Dubourg C, Henry C, Lucas J, Odent S, Pasquier L, Copin H, Latour P, Cordier MP, Nadeau G, Till M, Edery P, Andrieux J. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases.Eur J Med Genet 52:291-296, 2009.
- Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW. Cases of neurofibromatosis with rearrangements of Chromosome 17 involving band 17q11.2. Am J Med Genet 28:771-777, 1987.
- Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. **Am J Med Genet 42:**161-169, 1992.
- Schuster J, Sundblom J, Thuresson AC, Hassin-Baer S, Klopstock T, Dichgans M, Cohen OS, Raininko R, Melberg A, Dahl N. Genomic duplications mediate overexpression of lamin B1 in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) with autonomic symptoms. Neurogenetics 12:65-72, 2011.
- Schwanitz G, Schmid P, Berthold HJ, Grosse KP. Partial trisomy 13 with clinical signs of Patau syndrome resulting from a complex paternal rearrangement of chromosome 6, 10 and 13. Ann Genet Paris 21:100-103, 1978.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2:971-97 1971.
- Seki N, Azuma T, Yoshikawa T, Masuho Y, Muramatsu M, Saito T. cDNA cloning of a new member of the Ras superfamily, RAB9-like, on the human chromosome Xq22.1-q22.3 region. **J Hum Genet 45:**318-22, 2000.
- Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature 453:**930-934, 2008
- Seong HA, Gil M, Kim KT, Kim SJ, Ha H. Phosphorylation of a novel zinc-finger-like protein, ZPR9, by murine protein serine/threonine kinase 38 (MPK38). Biochem J 361:597-604, 2002.
- Shaffer LG, Lupski JR.Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. Annu Rev Genet 34:297-329, 2000.
- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangementbased disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet 13:**R57-R64, 2004.
- Shirakawa K, Suzuki H, Ito M, Kono S, Uchiyama T, Ohashi T, Miyajima H. Novel compound heterozygous ALS2 mutations cause juvenile amyotrophic lateral sclerosis in Japan. **Neurology 73:**2124-2126, 2009.
- Singh TD, Park SY, Bae JS, Yun Y, Bae YC, Park RW, Kim IS. MEGF10 functions as a receptor for the uptake of amyloid-β. **FEBS Lett 584:**3936-3942, 2010.

- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. **Mol Cytogenet 1:**15, 2008.
- Sivakumar K, Sambuughin N, Selenge B, Nagle JW, Baasanjav D, Hudson LD, Goldfarb LG. Novel exon 3B proteolipid protein gene mutation causing late-onset spastic paraplegia type 2 with variable penetrance in female family members. **Ann Neurol 45:**680-683, 1999.
- Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nat Rev Genet 6:**782-792, 2005.
- Spokony RF, Aoki Y, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint-Jeannet JP. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus. **Development 129:**421-432, 2002.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell 144:27-40, 2011.
- Sudbeck P, Lienhard Schmitz M, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. **Nat Genet 13:**230-232, 1996.
- Sugihara K, Maruyama H, Kamada M, Morino H, Kawakami H. Screening for OPTN mutations in amyotrophic lateral sclerosis in a mainly Caucasian population. Neurobiol Aging (versão online), 2011.
- Sureban SM, Murmu N, Rodriguez P, May R, Maheshwari R, Dieckgraefe BK, Houchen CW, Anant S. Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation. Gastroenterology 132:1055-1065, 2007.
- Swarup G, Nagabhushana A. Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling. **J Biosci 35:**501-505, 2010.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, Kirby A, Liu S, Muddukrishna B, Ohsumi TK, Shen Y, Borowsky M, Daly MJ, Morton CC, Gusella JF. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. Am J Hum Genet 88:469-481, 2011.
- Tharapel AT, Summitt RL. A cytogenetic survey of 200 unclassifiable mentally retarded children with congenital anomalies and 200 normal controls. **Hum Genet 37:**329-338, 1977.
- Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. Mol Cell Biol 21:6927-6938, 2001.
- Tjio JH, Levan A. The chromosome numbers of man. Hereditas 42:1-6, 1956.

- Tominaga K, Leung JK, Rookard P, Echigo J, Smith JR, Pereira-Smith OM. MRGX is a novel transcriptional regulator that exhibits activation or repression of the B-myb promoter in a cell type-dependent manner. **J Biol Chem 278:**49618-49624, 2003.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. **Nat Genet 36:**636-641, 2004.
- Tzenova J, Kaplan BJ, Petryshen TL, Field LL. Confirmation of a dyslexia susceptibility locus on chromosome 1p34-p36 in a set of 100 Canadian families. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 127B:**117-124, 2004.
- Usarek E, Kuźma-Kozakiewicz M, Schwalenstöcker B, Kaźmierczak B, Münch C, Ludolph AC, Barańczyk-Kuźma A. Tau isoforms expression in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurochem Res 31:**597-602, 2006
- van Bakel, I; Holt, S; Craig, I.; Boyd, Y. Sequence analysis of the breakpoint regions of an X;5 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. **Am J Hum Genet 57:**329-336, 1995.
- van Blitterswijk M, van Vught PW, van Es MA, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, Veldink JH, van den Berg LH. Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. **Neurobiol Aging (versão online)**, 2011.
- Vandeweyer G, Kooy RF. Balanced translocations in mental retardation. **Hum Genet 126**:133-147, 2009.
- Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, Lockhart LH, Hawkins JC, Jalal SM, Withers M, Lupski JR, Stankiewicz P. Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two individuals with campomelic dysplasia. Am J Hum Genet 76: 652-662, 2005
- Vianna-Morgante AM, Kerkis IE, Krepischi-Santos ACV. Sequencing of the breakpoint junction fragments of an X;autosome translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. The American Society of Human Genetics. 54th Annual Meeting. Toronto, Canada. 947/W, 2004.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. Science 273:613-622, 1996.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Diff 10:45-65, 2003.
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science 249:181-186, 1990.
- Walter MC, Reilich P, Huebner A, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Kress W, Born C, Schoser BG, Krause KH, Klutzny U, Bulst S, Frey JR, Lochmüller H. Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. Brain 130:1485-1496, 2007.

- Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, Liu S, Jiang Y, Yang F, Wu Y, Cao X. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. Blood 103:1747-1754, 2004.
- Wang HT, Chang JW, Guo Z, Li BG.In silico-initiated cloning and molecular characterization of cortexin 3, a novel human gene specifically expressed in the kidney and brain, and well conserved in vertebrates. Int J Mol Med 20:501-510, 2007.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. **Am J Hum Genet 49:** 995-1013, 1991.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proc Natl Acad Sci USA 72:**1858-1862, 1975.
- Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. Nat Rev Genet 4:359-368, 2003.
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. J Med Genet 40:575-584, 2003.
- Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW. A family of mammalian F-box proteins. **Curr Biol 9:**1180-1182, 1999.
- Wirth J, Wagner T, Meyer J, Pfeiffer RA, Tietze HU, Schempp W, Scherer G. Translocation breakpoints in three patients with campomelic dysplasia and autosomal sex reversal map more than 130 kb from SOX9. Hum Genet 97:186-93, 1996.
- Wohlleber E, Kirchhoff M, Zink AM, Kreiss-Nachtsheim M, Küchler A, Jepsen B, Kjaergaard S, Engels H. Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. Eur J Med Genet 54:67-72, 2011.
- Wolf NI, Sistermans EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S, Endziniene M, Wu Y, Chong WK, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY, Woodward KJ. Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. Brain 128:743-751, 2005.
- Woodward K, Kirtland K, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Malcolm S, Abeliovich D. X inactivation phenotype in carriers of Pelizaeus-Merzbacher disease: skewed in carriers of a duplication and random in carriers of point mutations. **Eur J Hum Genet 8:**449-454, 2000.
- Woodward K, Cundall M, Palmer R, Surtees R, Winter RM, Malcolm S. Complex chromosomal rearrangement and associated counseling issues in a family with Pelizaeus-Merzbacher disease. **Am J Med Genet A 118:**15-24, 2003.
- Woodward KJ, Cundall M, Sperle K, Sistermans EA, Ross M, Howell G, Gribble SM, Burford DC, Carter NP, Hobson DL, Garbern JY, Kamholz J, Heng H, Hodes ME, Malcolm S, Hobson GM. Heterogeneous duplications in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease suggest a mechanism of coupled homologous and nonhomologous recombination. Am J Hum Genet 77:966-9887, 2005.

- Woodward KJ. The molecular and cellular defects underlying Pelizaeus-Merzbacher disease. Expert Rev Mol Med 10:e14, 2008.
- Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, Smith SF, North P, Callaway H, Kelly K, Walter K, Abnizova I, Gilks W, Edwards YJ, Cooke JE, Elgar G. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. PLoS Biol 3:e7, 2005.
- Wunderle VM, Critcher R, Hastie N, Goodfellow PN, Schedl A. Deletion of longrange regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. Proc Natl Acad Sci USA 95:10649-10654, 1998.
- Yada T, Sato T, Kaseyama H, Gotoh M, Iwasaki H, Kikuchi N, Kwon YD, Togayachi A, Kudo T, Watanabe H, Narimatsu H, Kimata K. Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. J Biol Chem 278:39711-39725, 2003.
- Yiu EM, Farrell SA, Soman T. Classic Pelizaeus-Merzbacher disease in a girl with an unbalanced chromosomal translocation and functional duplication of PLP1. **Mov Disord 24:**2171-2172, 2009.
- Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. **J Med Genet 18**:442-447, 1981.
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, McDonell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Chelly J. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation.Nat Genet 24:167-170, 2000.
- Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNF alphainduced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. **Curr Biol 17:**1438-1443, 2007.

Recursos da Internet

Children's Hospital Oakland Research Institute, CHORI- http://www.chori.org

Database of Genomic Variants, DGV - http://projects.tcag.ca/variation

Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl

Resources, DECIPHER - http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher

Ensembl - http://www.ensembl.org

ECR browser - http://ecrbrowser.dcode.org

National Center for Biotechnology Information, NCBI - http://www.ncbi.nih.gov

University of California, Santa Cruz, UCSC Genome Browser - http://genome.ucsc.edu